

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes.

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Anderson Proust Gonçalves de Souza
Ouro Preto, outubro de 2010

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes.

Anderson Proust Gonçalves de Souza
ORIENTADOR: PROF. DR. ROGELIO LOPES BRANDÃO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular

Ouro Preto, outubro de 2010.

S729c

Souza, Anderson Proust Gonçalves .

Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes [manuscrito] / Anderson Proust Gonçalves Souza. - 2010.

91f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Cachaça. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Compostos aromáticos. I. Brandão , Rogelio Lopes . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 663.543



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Caracterização Bioquímico-Molecular de Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas e Seleccionadas para a Produção de Cachaça com Ênfase na Produção de Compostos Aromatizantes”

Aos 09 dias do mês de novembro de 2010, às 14:00h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Anderson Proust Gonçalves de Souza. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Lopes Brandão
Presidente

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Examinador (UFPE)

Prof. Dr. William de Castro Borges
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 09/11/2010

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

*Dedico este trabalho com todo meu amor
aos meus ídolos e pais,
Jordevir e Joguimar e ao
Jedrean,
meu querido irmão mais velho
que veio depois de mim.*

Agradecimentos

A Deus por todas as graças recebidas e pelo presente de ter a família que tenho.

A UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino público gratuito de qualidade e por minha formação acadêmica e pessoal.

A eterna cidade de Ouro Preto que tanto me ensinou e acrescentou em minha vida, me proporcionando os melhores anos.

Ao Dr. Rogelio Brandão, pelo exemplo de pesquisador, por seu rigor científico e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Ieso de Castro pelos ensinamentos diários, pela disponibilidade, pelo exemplo de dedicação nas longas horas de trabalho e porque não, pelos momentos agradáveis de “happy hour” sempre muito divertidos.

Ao Dr. Mauricio Coutrim, não apenas pelos ensinamentos, mas pela amizade e apoio além do exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao Dr. Robson Afonso pelos ensinamentos profissionais, pessoais, e por ter tornado minha permanência em seu laboratório algo realmente prazeroso e divertido.

Ao Dr. Luciano Fietto por toda a ajuda, apoio, incentivo, disponibilidade e boa acolhida em seu laboratório.

A Dra. Renata Guerra pelo incentivo constante, amizade, palavras sábias e motivadoras desde os tempos da graduação até o fim desta etapa.

A Dra. Leoneide pela atenção, carinho e força de vontade que muito me servem como referencial.

A Zezé por sua sempre disposição em ajudar e por sua alegria realmente contagiante.

Ao amigo de graduação Matheus de Souza, pela amizade sincera e sua simplicidade, além do exemplo de pessoa perseverante e dedicada.

Aos alunos de iniciação científica, Juliane, Douglas, Mônica e Wesley pelo grande apoio, paciência, dedicação, esforço e grande amizade de todos vocês.

Aos amigos de todas as horas, Filipe Gadiolli e Thiago Mafra pelas risadas, pelo ótimo convívio ao longo destes anos, pelos cafés na cantina, pela torcida e amizade eterna. Lembrem-se sempre: “Dápáfazê”!

A amiga “Cris” pelas palavras de ânimo e carinho.

Aos amigos do LBCM Igor, Soraia, Bruna, Laura, Aninha, Max, Carol, Renata, Natália, Érica, Eriquinha, Simone, Pilar, Luizáurea, Sr. Bráz, enfim, a todos que passaram por aqui, meu muito obrigado!

Aos amigos de Salinas, em especial Thiago, Edilene, Magalhães e Andréia pela partilha de experiências e pela amizade. Muito sucesso a todos vocês.

Aos amigos de Viçosa, Rafael, Mary Hellen e Ramon pela acolhida e pela ajuda inestimável.

A amiga Monica Martiniano pelo carinho e alegria contagiantes.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC), Laboratório de Doença de Chagas, e no Laboratório de Enzimologia e Biofísica, obrigado pelo ótimo convívio durante este trabalho.

A Cida, alma do NUPEB, obrigado por ser tão prestativa, amiga, e estar sempre tão alegre e com um sorriso encantador!

Aos amigos do laboratório de caracterização molecular, Miriany, Keila, Fernanda, Fernanda Caramaschi, e em especial a Júlio pelo aprendizado e companheirismo.

Aos amigos irmãos da república Sonegada em especial, Humberto, Sergio e Felipe, vocês foram parte de minha família ao longo de todo este tempo. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Ao amigo e irmão de infância de todas as horas Daniel Taboza, por sua lealdade, amizade e pela torcida sempre.

Finalmente à minha família, minha mãe Joguimar, meu pai Jordevir, e meu irmão Jedrean, por ser minha referência de amor e dedicação. Tudo que faço na vida é por vocês e pra vocês sempre. Amo muito vocês.

No Brasil, a cachaça é a mais popular bebida destilada produzida pela destilação de caldo de cana fermentado. A produção nacional é estimada em torno de 1,3 bilhões de litros por ano, dos quais menos de 1% é exportado. Como consequência desta pequena exportação, grandes esforços tem sido realizados para aumentar a qualidade deste produto e aumentar a participação deste produto no mercado internacional. Usualmente o processo de fermentação do caldo de cana é conduzido por uma sucessão de cepas de leveduras, sendo que a espécie de levedura predominante é a *Saccharomyces cerevisiae*. Na cachaça e em outras bebidas como o vinho, tem sido incorporado o uso de cepas selecionadas no processo fermentativo para melhorar as características das bebidas e gerar um produto de melhor qualidade.

Neste trabalho, utilizamos quatro cepas oriundas de diferentes localidades geográficas, porém selecionadas e isoladas pelo mesmo procedimento conforme metodologia desenvolvida em nosso laboratório (INPI-MG Protocolo-315) que seleciona leveduras com características desejáveis para a produção de cachaça. Além destas cepas outras duas cepas previamente identificadas como resistente e sensível a cerulenina e TFL foram utilizadas nos experimentos. Neste trabalho, as cepas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 e LBCM 632, selecionadas por tal metodologia foram identificadas como *S. cerevisiae* pela análise com enzimas de restrição da região ITS (*internal transcribed spacer region*). O polimorfismo do DNA das cepas foi analisado com as técnicas de RAPD-PCR, COX-PCR e análises de microssatélites. Nossos resultados demonstraram que a análise de microssatélites permitiu uma nítida distinção dentre todas as cepas analisadas, ao contrário das técnicas de RAPD-PCR e COX-PCR. Isto demonstrou ser necessário o uso de diferentes técnicas combinadas na análise do polimorfismo das cepas. Posteriormente as cepas foram analisadas quanto à produção de alcoóis superiores e ésteres através de cromatografia gasosa, demonstrando que as cepas produzem elevada quantidade de álcool isoamílico, octanoato e decanoato de etila. Por fim os genes *BAP2*, *BAT1*, *BAT2*, *ATF2*, *ADH1* e *EEB1* foram analisados em suas expressões por qRT-PCR. Ao contrário do esperado, nenhuma correlação direta pôde ser estabelecida entre o nível de expressão destes genes e a produção de compostos aromáticos. Os resultados demonstram que a metodologia de seleção

desenvolvida precisa ser aperfeiçoada, sobretudo no que diz respeito à utilização de outras técnicas que possibilitem a identificação de características indicadoras por exemplo de uma maior capacidade de produção de compostos aromatizantes.

In Brazil, cachaça is the most popular beverage produced by distillation of fermented sugar-cane juice. The national production is estimated to be 1.3 billion liters per year of which less than 1% is exported. As a consequence of such small exportation, big efforts have been made to improve this products quality and increase its role in the international trade market. Usually the sugar-cane juice fermentation process has a succession of yeasts, with *Saccharomyces cerevisiae* being the predominant species. In the “cachaça”, and in other drinks as the wine, it has been incorporate the use of strains selected in the fermentative process to improve the characteristics of the beverage and to generate a product of better quality.

In this work, it were used four strains from different geographic locations, selected and isolated by the same procedure according to the methodology developed in our lab (INPI-MG Protocol-315) that selects yeast strains with desirable characteristics for the “cachaça” production. Besides these four yeast strains two other strains previously identified as resistant and sensible to cerulenin and TFL were used in the experiments. In this work the LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 and LBCM 632 yeast strains, selected by such methodology were identified as *S. cerevisiae* by an intergenic transcribed spacer region (ITS) restriction analysis. The yeast strains DNA polymorphism was analized with the RAPD-PCR, COX-PCR techniques and SSR analyzes. Our results demonstrated that the microsatellite analyzes allowed a clear distinction among all the analized yeasts, unlike the RAPD-PCR and COX-PCR techniques. This demonstrated the necessity to use combined techniques to analyze the yeast polymorphism. Subsequently the yeasts were analyzed for the production of higher alcohols and esters by gas chromatograph assays, demonstrating that the strains produce high amount of isoamyl alcohol, ethyl octanoate and ethyl decanoate. Finally the *BAP2*, *BAT1*, *BAT2*, *ATF2*, *ADH1* and *EEB1* genes were evaluated by its expression with qRT-PCR. Unless the expected, any direct correlation could be established between the expression levels of these genes and the aroma compound production. The results show that the selection methodology developed needs to be improved, particularly with

regard to the use of other techniques that allow the identification of features indicative of such a greater capacity for production of flavor compounds.

Índice

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A cachaça	1
1.2 Mercado econômico da cachaça	1
1.3 Produção de cachaça em Minas Gerais	2
1.4 Processo produtivo da cachaça de alambique	6
1.5 Processo fermentativo	9
1.6 Produção de ésteres e superiores	11
1.7 Leveduras selecionadas utilizadas no processo produtivo	17
1.8 Cromatografia gasosa	20
1.9 Identificação e caracterização molecular de leveduras	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Cepas utilizadas	31
3.2 Manutenção das leveduras	31
3.3 Meios de cultura	32
3.3.1 Meio YP	32
3.3.2 Meio mínimo	32

3.4	Fermentações em escala piloto	32
3.4.1	Preparo do inóculo	32
3.4.2	Extração líquido-líquido	34
3.4.3	Determinação dos compostos voláteis no caldo fermentado	34
3.4.4	Reagentes e Padrões para cromatografia	35
3.4.5	Identificação e quantificação dos álcoois e ésteres	37
3.5	Identificação molecular das cepas	37
3.5.1	PCR – ITS (colônia)	37
3.5.2	Eletroforese em gel de agarose	38
3.5.3	Purificação do produto de PCR	38
3.5.4	Digestão do fragmento de ITS	39
3.5.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida	39
3.6	Análise do polimorfismo molecular de cepas de leveduras	39
3.6.1	Extração do DNA genômico de leveduras	39
3.6.2	Quantificação do DNA	40
3.6.3	RAPD-PCR	41
3.6.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida	41
3.6.4	Extração e purificação do DNA mitocondrial (mtDNA)	41
3.6.5	COX-PCR	42
3.7	Análise de microssatélites	43
3.8	Extração de RNA total	45
3.8.1	Extração de RNA	45
3.9	Eletroforese em gel de agarose	46
3.9.1	Preparação das amostras de RNA para corrida no gel	46
3.9.2	Montagem do gel para corrida de RNA	46
3.10	Síntese de cDNA	46

3.11	Quantificação dos transcritos através de RT-PCR em tempo real	47
4.	RESULTADOS	50
4.1	Critérios de identificação das cepas	50
4.1.1	Identificação molecular das leveduras	50
4.2	Polimorfismo molecular das cepas	51
4.2.1	Análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	51
4.2.2	Método de Diferenciação por COX-PCR	56
4.2.3	Diferenciação por Microssatélites	56
4.3	Determinações de álcoois superiores e ésteres	60
4.4	Quantificação da expressão de genes de leveduras envolvidos na produção de substâncias aromatizantes	63
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÕES	82
	BIBLIOGRAFIA	83

α -IPM	α -isopropilmalato sintase
β -IPM desidrogenase	β -isopropilmalato desidrogenase
α -IPM isomerase	α -isopropilmalato isomerase
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
<i>ADH</i>	Gene que codifica a enzima álcool desidrogenase
<i>ATF</i>	Gene que codifica a enzima álcool acetiltransferase
<i>BAP2</i>	Gene que codifica para aminoácido permease
<i>BAT1</i>	Gene que codifica para aminoácido transferases citosólicas
<i>BAT2</i>	Gene que codifica para aminoácido transferases Mitocondriais
cDNA	DNA complementar
CoA	Coenzima A
<i>COXI</i>	Gene mitocondrial que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA ribossomal
DO _{600nm}	Densidade ótica
<i>EEB</i>	Gene que codifica a Etanol O-aciltransferase
EDTA	Etilenodiaminotetracético
<i>FAS2</i>	Gene responsável pela resistência a cerulenina
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”

<i>ITS</i>	Internal transcribed spacer region
kDa	Kilo daltons
<i>LEU1</i>	Gene que codifica para α -IPM isomerase
<i>LEU2</i>	Gene que codifica para β -IPM desidrogenase
<i>LEU4</i>	Gene que codifica para α -IPM
mt-DNA-RFLP	Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanometros
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reaao em Cadeia da Polimerase)
p/v	Peso por volume
RAPD	Randomly Amplified P EDTA olymorphic DNA
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotaoes por minuto
SIM	Selected on monitoring
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
TE	Tampão Tris/EDTA
TFL	5,5', 5''-trifluoro-DL-leucina
v/v	Volume por volume

Tabela 1	Produtores de cachaça de alambique por região no estado de Minas Gerais.....	5
Tabela 2	Monitoramento de íons para análise dos compostos nos modos SCAN e SIM.....	36
Tabela 3	Primers utilizados na amplificação de 6 locus de microssatélites para <i>S. cerevisae</i>	44
Tabela 4	Primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR.....	48
Tabela 5	Diversidade alélica de quatro cepas selvagens isoladas comparadas a uma cepa de laboratório <i>Saccharomyces boulardii</i>	59

Figura 1 – Principais países importadores de cachaça.	3
Figura 2 - Mecanismo de Ehrlich.	14
Figura 3 - Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila.....	15
Figura 4 - Biossíntese de ácidos graxos em leveduras.	19
Figura 5 - Esquema de um cromatógrafo a gás.	22
Figura 6 - Diagrama esquemático de um detector de massas	24
Figura 7 - Esquema de fermentação em escala laboratorial de leveduras selecionadas..	33
Figura 8 - Gel de poliacrilamida de ITS.	52
Figura 9 - Gel de poliacrilamida do fragmento de ITS com a enzima CfoI..	53
Figura 10 - Gel de poliacrilamida do fragmento de ITS com a enzima HaeIII.	54
Figura 11 - Gel de poliacrilamida do fragmento de ITS com a enzima HinfI.....	55
Figura 12 - Perfil de RAPD-PCR das cepas de leveduras isoladas de diferentes destilarias artesanais de cachaça..	57
Figura 13 - Perfil de COX-PCR após amplificação com os primers 3L, 3R, 4L e 5R... ..	58

Figura 14 - Cinética de formação de n-propanol	61
Figura 15- Cinética de formação de álcool isobutílico	62
Figura 16- Cinética de formação de álcool isoamílico	64
Figura 17- Cinética de formação do éster octanoato de etila.	65
Figura 18- Cinética de formação do éster decanoato de etila.	66
Figura 19- Expressão relativa de genes das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LBCM 422 e LBCM 427	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cachaça

De acordo com a legislação brasileira, 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 caldo de cana-de-açúcar fermentado com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L, expressos em sacarose” (BRASIL, 2005). A avaliação da cachaça é efetuada com base em legislação específica (BRASIL, 1997), atualizada pela Instrução Normativa nº 13 de 29/06/2005 (BRASIL, 2005). Esta norma estabelece, que os voláteis totais e não álcoois (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores) não podem ser inferiores a 200 mg por 100 mL de álcool anidro, nem superiores a 650 mg por 100 mL de álcool anidro.

1.2 Mercado econômico da cachaça

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores de Bebida (ABRABE, 2007), o Brasil possui cerca de cinco mil marcas de cachaça e algo em torno de trinta mil produtores, com faturamento girando em torno de seiscentos milhões de dólares ao ano e empregando diretamente cerca de quatrocentos e cinquenta mil pessoas no setor, número que chega a 1,4 milhões em toda a cadeia produtiva. O estado de São Paulo é o maior produtor (44%), seguido por Pernambuco (12%), Ceará (12%), Rio de Janeiro (8%), Minas Gerais (8%), Goiás (8%), Paraná (4%), Paraíba (2%) e Bahia (2%), sendo os três primeiros responsáveis por quase toda produção de cachaça industrial (Martinelli e cols; 2000). Atualmente o Brasil produz aproximadamente 1,3 bilhões de litros da bebida por ano, sendo a segunda bebida mais consumida do país, reconhecida como um produto de grande potencial de exportação pelo governo brasileiro com perspectivas de aumento significativo nos próximos anos. O consumo da bebida no país é de 11 litros per capita, só perdendo para

a cerveja (Maia, 2009). Em relação ao volume, o mercado de bebidas nacional se divide entre cerveja (88,8%), cachaça (6,6%) e demais bebidas (4,6%). Considerando apenas as bebidas destiladas, com relação ao volume, a cachaça ocupa a primeira posição no país, com mais de 87% do mercado (SEBRAE, 2008). Do total comercializado, cerca de 1 bilhão de litros são provenientes das indústrias e o restante (300 mil litros) é produzido em menor escala em alambiques. Deste montante de 1,3 bilhões de litros produzidos por ano, apenas 1% é exportado para mais de 45 países, demonstrando a baixa participação da bebida nas exportações, porém revelando o potencial de mercado do produto. Neste contexto, as exportações brasileiras de cachaça têm tido forte impulso nos últimos anos. Atualmente, as exportações chegaram a cerca de 20 milhões de litros produzindo uma renda de aproximadamente 20 milhões de dólares.

A cachaça constitui a terceira bebida destilada mais consumida no planeta de acordo com o ranking mundial do consumo de destilados publicado pelo Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça (PBDAC). A bebida é atualmente consumida em mais de sessenta países, entre eles, alguns que têm população consideradas como as mais sofisticadas e ricas do mundo. A Figura 1 traz o ranking dos principais países importadores de cachaça. A bebida é exportada praticamente para todos os continentes do mundo, ainda que estes números não estejam demonstrados.

1.3 Produção de cachaça em Minas Gerais

Embora não haja uma diferenciação legal entre a cachaça industrial e a cachaça de alambique, um ponto chave na distinção entre a cachaça industrial e a cachaça de alambique está na forma de obtenção de cada uma, sendo que a primeira é obtida do destilado alcoólico simples adicionado de açúcares e também hidratado para chegar à graduação alcoólica estabelecida em lei. Já a cachaça de alambique é obtida pela destilação do mosto fermentado da cana-de-açúcar. Outra diferença está no processo de destilação, sendo que a cachaça industrial é destilada em coluna de destilação contínua (equipamento peculiar na produção de álcool) e a cachaça artesanal destilada em alambique de cobre (SEBRAE, 2001). Estima-se que do total de cachaça produzido no mercado nacional, 70%

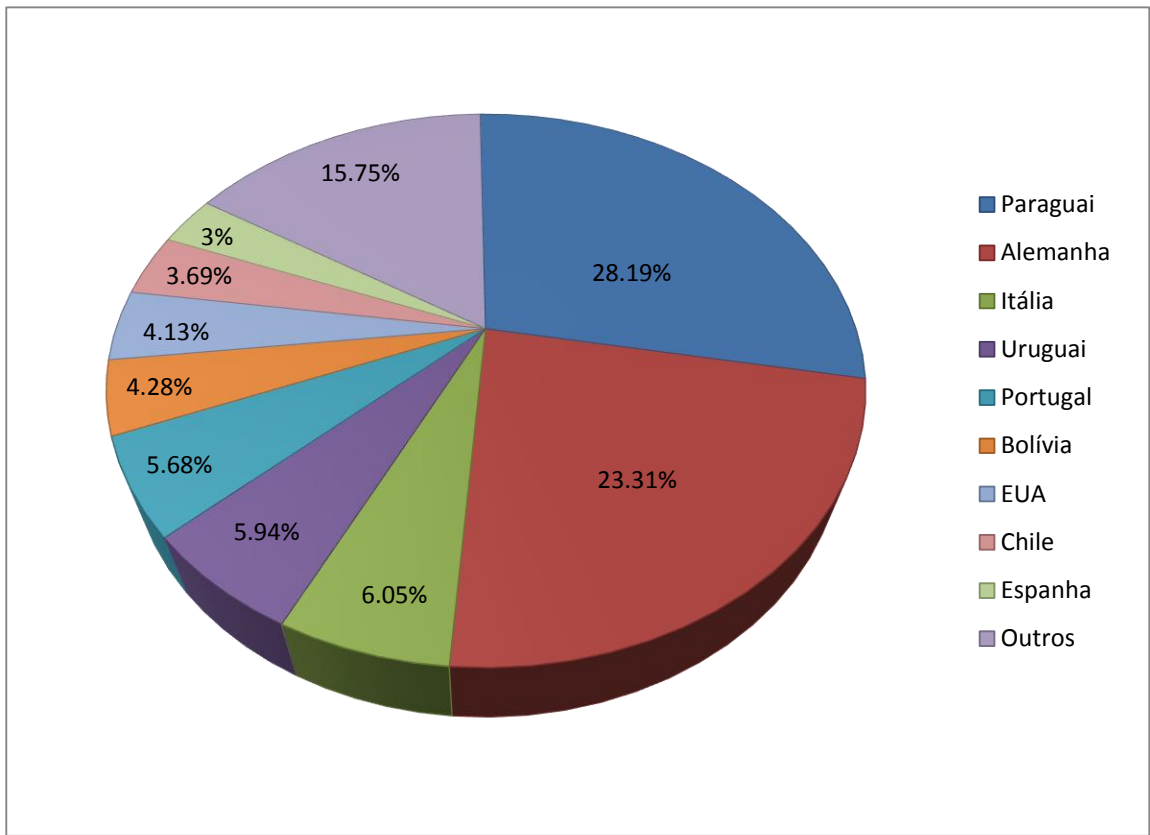


Figura 1 – Principais países importadores de cachaça. Fonte: Rodrigues e cols., 2006.

represente a cachaça industrial (980 milhões de litros) e 30% a cachaça de alambique (COOCACHAÇA, 2007). Dentro do contexto da produção em pequena escala, Minas Gerais é o estado que mais se destaca de acordo com a Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade (AMPAQ). Apesar dos altos índices de informalidade apresentados, o agronegócio da cachaça desempenha um importante papel na estruturação de milhares de propriedades rurais do interior de Minas Gerais.

Em termos econômicos, os 8.466 alambiques mineiros apontados pelo IBGE (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – 1995) geram cerca de 240.000 empregos, diretos e indiretos gerando uma renda anual estimada de R\$ 1,5 bilhão. Os estudos do SEBRAE-MG indicaram ainda que 43% da cachaça produzida provém de estabelecimentos registrados e 57% dos clandestinos (SEBRAE, 2002). Regionalmente, o número de alambiques concentra-se principalmente nas regiões Norte, no Vale do Jequitinhonha e no Vale do Rio Doce (Tabela 1). Estas são regiões reconhecidamente carentes, a nível econômico, onde a produção mais organizada da cachaça poderia representar um forte impulso rumo ao desenvolvimento das mesmas (SEBRAE, 2002).

Com o intuito de aumentar a formalidade da produção e regulamentar o produto no estado de Minas Gerais foi editada a 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”. Esta lei proporciona ao produtor a possibilidade da profissionalização e remodelagem dos estabelecimentos tradicionais, além de maiores facilidades de comercialização do produto e legitimação dos padrões de identidade e igualdade da cachaça de Minas (SEBRAE, 2002). Neste contexto, a cachaça de alambique produzida em Minas conterá a indicação de sua origem em seu rótulo. Esta indicação se refere à região geográfica que produza um destilado alcoólico com características naturais, culturais e qualitativas, particulares, cujo nome da região será utilizado na menção da proveniência da cachaça (Oliveira e cols; 2002). As áreas de referência para a demarcação da produção da cachaça de alambique de Minas são as microrregiões homogêneas definidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Então, de acordo com as características geográficas e culturais de cada uma das regiões produtoras do estado, os produtores, empresas ou instituições que adotarem o processo de elaboração da Cachaça Artesanal de Minas, poderão obter o direito de uso da expressão “Cachaça Artesanal de

Região	Estabelecimentos	%
Estado Minas Gerais	8.466	100,0
Norte	2.591	30,6
Jequitinhonha	1.527	18,0
Rio Doce	1.192	14,1
Metropolitana de Belo Horizonte	1.134	13,4
Zona da Mata	804	9,5
Vale do Mucuri	347	4,1
Oeste	219	2,6
Sul-Sudeste	197	2,3
Vertentes	183	2,2
Triângulo Mineiro	136	1,6
Central	114	1,3
Noroeste	22	0,3

Fonte: IBGE (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-1995).

Tabela 1: Produtores de cachaça de alambique por região no estado de Minas Gerais.

Minas” e também o “Certificado de Controle de Origem”, que será emitido pelo órgão fiscalizador.

A regulamentação da qualidade da cachaça assim como seu padrão de identidade, foi estabelecido pelo Decreto Federal nº42.644 de 05/06/2002 que regulamentou a Lei nº 13.949 de 11/07/2001. A cachaça, de acordo com a legislação federal deve apresentar sua composição química de acordo com os seguintes valores máximos demonstrados:

Acidez volátil em ácido acético.....	0,150g/100ml de álcool anidro
Ésteres em acetato de etila.....	0,200g/100ml de álcool anidro
Aldeídos em aldeído acético.....	0,030g/100ml de álcool anidro
Álcoois superiores.....	0,300g/100ml de álcool anidro
Furfural.....	0,005ml/100ml de álcool anidro
Metanol.....	0,010ml/100ml de álcool anidro
Cobre.....	5,00mg/l do produto

Outra medida adotada pelo governo mineiro que 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 ocorreu com 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. Esta medida estimulou a organização e mobilização dos produtores de cachaça em entidades ou cooperativas.

1.4 Processo produtivo da cachaça de alambique

Apesar de se tratar de um produto de fácil fabricação, o processo de produção da cachaça vem se aperfeiçoando ao longo do tempo. Do plantio da cana ao envase do produto, há uma busca crescente de qualidade no sentido de agregar valor ao produto. Para avaliar a contribuição da evolução técnica agregada a cada etapa, é preciso evidenciar os

parâmetros de cada etapa produtiva. Para a fabricação da cachaça de alambique, a matéria prima utilizada é a cana de açúcar na sua fase ideal de maturação. A cana utilizada no processo deve ser cultivada em solos leves, sem excesso de umidade, ricos em matéria orgânica e minerais. Além disto, deve ser levada em consideração a escolha das variedades de cana a serem utilizadas na formação do canavial. A utilização de mudas certificadas garante ao produtor material genético de boa qualidade, devendo-se escolher as variedades que possuam características definidas em relação à maturação, teor de açúcar, exigência em relação ao tipo de solo, resistência a doenças e também quanto ao porte da mesma. Apesar disto, em Minas Gerais, a cana-de-açúcar é plantada em todas as regiões, mesmo em condições desfavoráveis de solo. A cana utilizada é inicialmente cortada manualmente, despalhada e transportada para uma instalação onde passará pelo processo de moagem. Após a colheita, a cana limpa deve ser moída em até 12 horas após o corte, sendo que este período nunca deverá ultrapassar 48 horas (SEBRAE, 2008).

O caldo extraído é recolhido em um reservatório onde permanece para decantação das impurezas do líquido (pequenos fragmentos da cana-de-açúcar – bagacilho, fragmentos de solo e outras impurezas). Após a decantação, o caldo é filtrado e encaminhado até as dornas de fermentação. O processo fermentativo ideal se inicia com o caldo de cana numa concentração de açúcares em torno de 16° Brix (a escala numérica Brix mede o teor de sólidos solúveis em uma solução de sacarose) e com valores de pH entre 5,2 e 5,8. Normalmente, o caldo apresenta uma concentração de açúcares de 14° a 22° brix. Teores de açúcar acima de 16° brix acarretam uma fermentação mais lenta e freqüentemente incompleta, além de dificultar a multiplicação do fermento. Portanto, se torna necessário diluir o caldo de cana, para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o período fermentativo. (Pataro e cols; 2002).

No processo tradicional de produção da cachaça, utiliza-se como “pé-de-cuba” o chamado “fermento caipira”, normalmente preparado no próprio local de produção da bebida que tem como agente fermentativo uma mistura de leveduras presentes no ambiente (provenientes principalmente da cana-de-açúcar) e nos equipamentos utilizados na produção da bebida (Maia e cols; 1994). Seguindo as tradições locais, cada produtor adota uma fórmula, mas geralmente ao “pé-de-cuba” são adicionados o farelo de arroz e fubá de milho para enriquecimento nutricional do mosto e ainda a adição de suco de limão ou

laranja azeda para corrigir o pH. Normalmente, os produtores levam de 5 a 30 dias na preparação do fermento, sendo que após este tempo a biomassa é obtida pela propagação sucessiva no caldo de cana e distribuída para as dornas da destilaria, iniciando o ciclo fermentativo (Ribeiro, 1997; Cardoso, 2001). Uma alternativa ao uso do “fermento caipira” é o uso do fermento de panificação prensado que pode ser usado como inóculo apesar deste tipo de fermento ter sido desenvolvido para atender as características da indústria de panificação (Pataro e cols., 2002).

De forma geral, a fermentação é conduzida por um processo de fermentação descontínuo também conhecido por fermentação em batelada, tendo como característica principal o fato de no instante inicial o caldo de cana ser inoculado com microrganismos e incubado de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. Ao longo do processo fermentativo não é adicionado voluntariamente nenhum outro tipo de fermento, sendo o mesmo utilizado sucessivamente (Carvalho & Sato, 2001). O processo fermentativo tem uma duração média de 24 horas, (Pataro e cols., 2002) e o volume inicial do inóculo inicial é de normalmente 20% do volume total da dorna de fermentação.

Ao fim da fermentação, o caldo fermentado é encaminhado através de tubulações para a destilação e um novo processo de fermentação é iniciado com o re-preenchimento da dorna com o caldo-de-cana, que pode estar pré-aquecido ou não de acordo com o clima da região. Tradicionalmente o alambique de cobre é adotado em Minas Gerais para a destilação do caldo fermentado que é aquecido até que a mistura entre em ebulição e se inicie a emissão de vapores, que uma vez condensados em uma serpentina de resfriamento resultam em um líquido formado (destilado) que é então recolhido.

O destilado é separado em três frações denominadas cabeça, coração e cauda. O destilado de coração, fração de melhor qualidade deverá apresentar o teor alcoólico em torno de 38° a 48° GL e deverá ser encaminhado para envelhecimento. O destilado de cabeça, obtido na fase inicial da destilação é mais rico em substâncias mais voláteis que o etanol e pode atingir graduação alcoólica entre 65° e 70° GL, devendo ser desprezado por conter grandes quantidades de metanol e outros compostos, os quais em grande quantidade podem ser prejudiciais à saúde do consumidor. Por sua vez, o destilado oriundo da “cauda” ou “água fraca”, obtido ao final da destilação, apresenta teor alcoólico abaixo de 38° GL e é rico em produtos indesejáveis, tais como furfural, ácido acético e outros, podendo ser re-

destilado ou desprezado por conter grandes quantidades de água e produtos menos voláteis. Desta maneira, os destilados provenientes da cabeça e da cauda comprometem o sabor da cachaça e podem ser nocivos à saúde do consumidor quando incorporados à bebida.

A etapa de envelhecimento pode propiciar boa qualidade sensorial de aroma e paladar à cachaça recém destilada de coloração branca, que pode apresentar paladar agressivo e levemente amargo, denunciando o caráter de bebida recém destilada, mas que ainda assim, pode levar a obtenção de um produto final com propriedades químicas e sensoriais típicas de uma bebida de qualidade. O envelhecimento permite aprimorar as características da cachaça recém destilada tornando-a mais refinada em aroma e paladar, além de modificar a coloração de branca para amarelada e tornar a cachaça macia, atenuando a sensação desidratante do álcool presente. O produtor determina o tempo de envelhecimento e o tipo de madeira empregada nos barris. Ao fim do envelhecimento, amostras do destilado devem ser 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 Processo fermentativo

Retornando ao tema fermentação, foco principal desta dissertação, no processo de produção da cachaça, após o preparo do inóculo, a fermentação é a segunda e principal etapa do processo produtivo, onde o açúcar e outros compostos presentes no mosto constituído de caldo de cana e nutrientes são transformados em etanol, gás carbônico e outros metabólitos secundários responsáveis pelas qualidades ou deficiências da bebida final. A fermentação é conduzida em recipientes apropriados chamados de dornas (Janzanti e cols; 2004). Normalmente, uma grande diversidade de microorganismos, tais como leveduras e bactérias são responsáveis pela fermentação do caldo de cana (Sabate e cols; 1998). Estes organismos são altamente tolerantes a ambientes diversos do ponto de vista osmótico, a altas concentrações de etanol, assim como a variações de pH (Angelis, 1992; Pataro e cols; 1998). A fermentação espontânea se caracteriza por ser conduzida pela

microbiota presente naturalmente nos substratos e/ou equipamentos utilizados no processo de produção, sendo que este tipo de fermentação é tradicionalmente utilizado na produção da cachaça no Brasil, assim como nos vinhos na Europa e outras bebidas tais como a tequila Mexicana e o sukete Africano (Querol e cols; 1992a e b; Sanni & Lonner, 1993; Lachance, 1995; Morais e cols; 1997; Sefa-Dedeh e cols., 1999).

Assim que a levedura entra em contato com o caldo de cana inicia-se o processo fermentativo que é dividido em três fases: fase preliminar ou pré-fermentação, onde as leveduras se adaptam ao meio e ocorre a multiplicação celular; fase de fermentação principal, com amplo desprendimento de gás e produção de etanol e por fim a etapa de pós fermentação, onde se observa redução da atividade fermentativa (Janzanti e cols., 2004). No final do processo fermentativo espontâneo, ocorre invariavelmente uma dominância de cepas tolerantes a altas concentrações de etanol, as quais pertencem ao grupo de leveduras *Saccharomyces sensu stricto* (Pretorius e cols., 2000). Este grupo é formado por quatro espécies de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces paradoxus* (Vaughan-Martini e Martini 1987). Apesar de que no processo de fermentação espontânea estarem envolvidas diferentes espécies de leveduras, há uma predominância de *Saccharomyces cerevisiae*, uma espécie normalmente utilizada durante a fermentação para obtenção tanto da cachaça quanto do vinho (Reed & Nagodawithana, 1991; Pataro, 2000). Sabe-se ainda que a população de leveduras ao longo da multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de cachaça está em constante mudança, devido à introdução de novas cepas pela adição de caldo de cana e especialmente por ser um processo conduzido em condições não estéreis. (Morais e cols., 1997). Aliado a este fato, as práticas operacionais nos alambiques também contribuem para que safras distintas possam produzir cachaças com perfis diferentes e de grande variedade.

Objetivando a melhoria das características organolépticas, aumento da produtividade e vantagens tecnológicas, alguns estudos tem sido realizados para utilização de leveduras selecionadas no processo fermentativo da produção de cachaça (Pataro e cols; 2000; Guerra e cols; 2001; Oliveira e cols; 2001). Outros estudos têm sido conduzidos em destilarias de cachaça em diferentes localidades do estado de Minas Gerais, visando a caracterização molecular e fisiológica da microbiota envolvida no processo fermentativo

(Morais e cols; 1997; Pataro e cols; 1998; Vicente e cols; 2006). Os resultados destes estudos têm demonstrado uma sucessão de espécies de leveduras ao longo do processo fermentativo, culminando com a predominância de *S. cerevisiae* (Corrêa; 1999) e também que os perfis moleculares das linhagens isoladas no final da safra são diferentes dos perfis das linhagens que iniciaram a safra do ano seguinte, sugerindo que as linhagens presentes ao final de uma safra não estavam envolvidas no processo fermentativo do ano seguinte. O estudo do cariótipo das linhagens de *S. cerevisiae* predominantes nas dornas durante a fermentação evidenciou que existe uma grande variação do perfil molecular tanto entre linhagens isoladas de uma mesma destilaria quanto entre linhagens isoladas de destilarias diferentes (Pataro e cols; 2000). Em outro estudo, durante um ciclo de 24 horas, três destilarias estudadas apresentaram um aumento das populações de *S. cerevisiae* do início ao fim do processo fermentativo além de uma grande sucessão de leveduras. Observou-se que a maioria das espécies presente no início do processo fermentativo desapareceu até o final do mesmo, possivelmente devido à diminuição de nutrientes, altas temperaturas e à presença de metabólitos secundários, que podem provocar a inibição do crescimento de cepas de espécies diferentes. Um alto grau de polimorfismo dentre as cepas foi observado, mas a espécie responsável pela condução da fermentação acabou sendo caracterizada como *S. cerevisiae*, sendo verificada a presença de diferentes linhagens ao longo do ciclo fermentativo de 24 horas (Guerra e cols; 2001).

1.6 Produção de ésteres e álcoois superiores

Assim como todas as outras bebidas fermentadas, a cachaça é formada por uma mistura complexa de substâncias que representam menos de um por cento em massa de todos os componentes e que conferem o aroma e o sabor que diferenciam, identificam e oferecem qualidade ao produto final (Nonato e cols; 2001). Estas substâncias podem ser agrupadas como álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Em vinhos e “brandies”, os álcoois superiores e ésteres são importantes produtos da fermentação produzidos por leveduras, sendo que o aroma de frutas presente no vinho, cachaça, sake e outras bebidas é atribuído a compostos como acetato de isoamila (banana), acetato de etila (frutado), hexanoato de etila (conhaque, maçã verde, octanoato de etila

(damasco, vinho, floral) acetato de 2-feniletil (flores e mel) e decanoato de etila (uva, doce, frutado) (Yoshizawa e cols; 1999; Lilly e cols; 2000; Nonato e cols; 2001; Falqué e cols; 2001).

Durante o processo produtivo, apesar da contribuição de fatores tais como composição do mosto e condições de fermentação e destilação, a levedura usada desempenha importante efeito na formação do “flavor” primário (Gomes e cols; 2002). Desta maneira, sabe-se que as grandes mudanças e diferenças na produção de compostos secundários em vinhos correspondem às diferentes espécies de leveduras utilizadas (Zironi e cols; 1993), e que dentro de mesmas espécies, as mudanças são devidas às diferentes linhagens presentes no meio (Zea e cols; 1994). Portanto, a linhagem da levedura utilizada é de fundamental importância e deve ser levada em consideração na seleção das leveduras iniciadoras do processo fermentativo (Longo e cols; 1992; Romano e cols; 1994).

Durante a fermentação são produzidos os álcoois superiores que constituem quantitativamente o maior grupo responsável pelas características organolépticas das bebidas. Há duas vias distintas que levam a produção destes compostos. Uma das vias consiste da Via de Ehrlich, também conhecida como via catabólica, pela qual ocorre a conversão de aminoácidos presentes no meio como valina, leucina, isoleucina, treonina e fenilalanina em álcoois superiores. Neste mecanismo, os aminoácidos extracelulares são absorvidos pelas leveduras via transportadores (transportadores específicos, transportadores de alta e baixa afinidade para aminoácidos, Bap2p e Bap3p), e sofrem transaminação a seus respectivos α -cetoácidos, em reações catalisadas por aminoácido transferases citosólicas e mitocondriais, codificadas pelos genes *BAT1* e *BAT2*, respectivamente. Os α -cetoácidos são descarboxilados e reduzidos a superiores como o álcool isoamílico n-propanol, e álcool isobutílico (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). O álcool isoamílico é um exemplo de álcool superior que pode ser sintetizado tanto pelo mecanismo de Ehrlich, através do qual ocorre a descarboxilação e redução de α -cetoácidos, (Figura 2); ou a partir do α -cetoisocaproato, um precursor do álcool isoamílico sintetizado na via de síntese de L-leucina a partir de glicose (Figura 3).

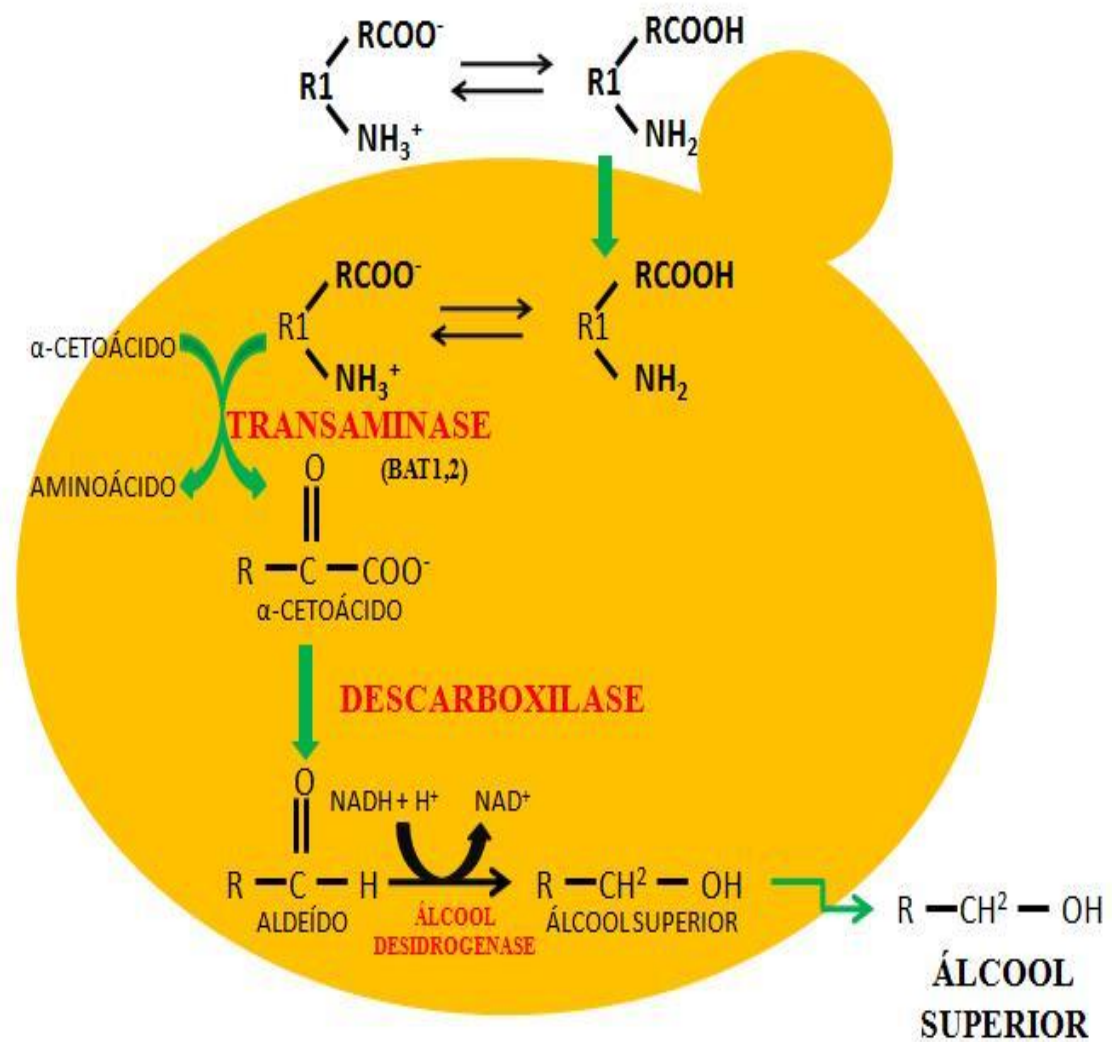


Figura 2 - Mecanismo de Ehrlich. A formação de superiores ocorre com a trasaminação de aminoácidos, seguida de descarboxilação e redução de α -cetoácidos.
 Fonte: (Lilly M. e cols., 2006) (Adaptado)

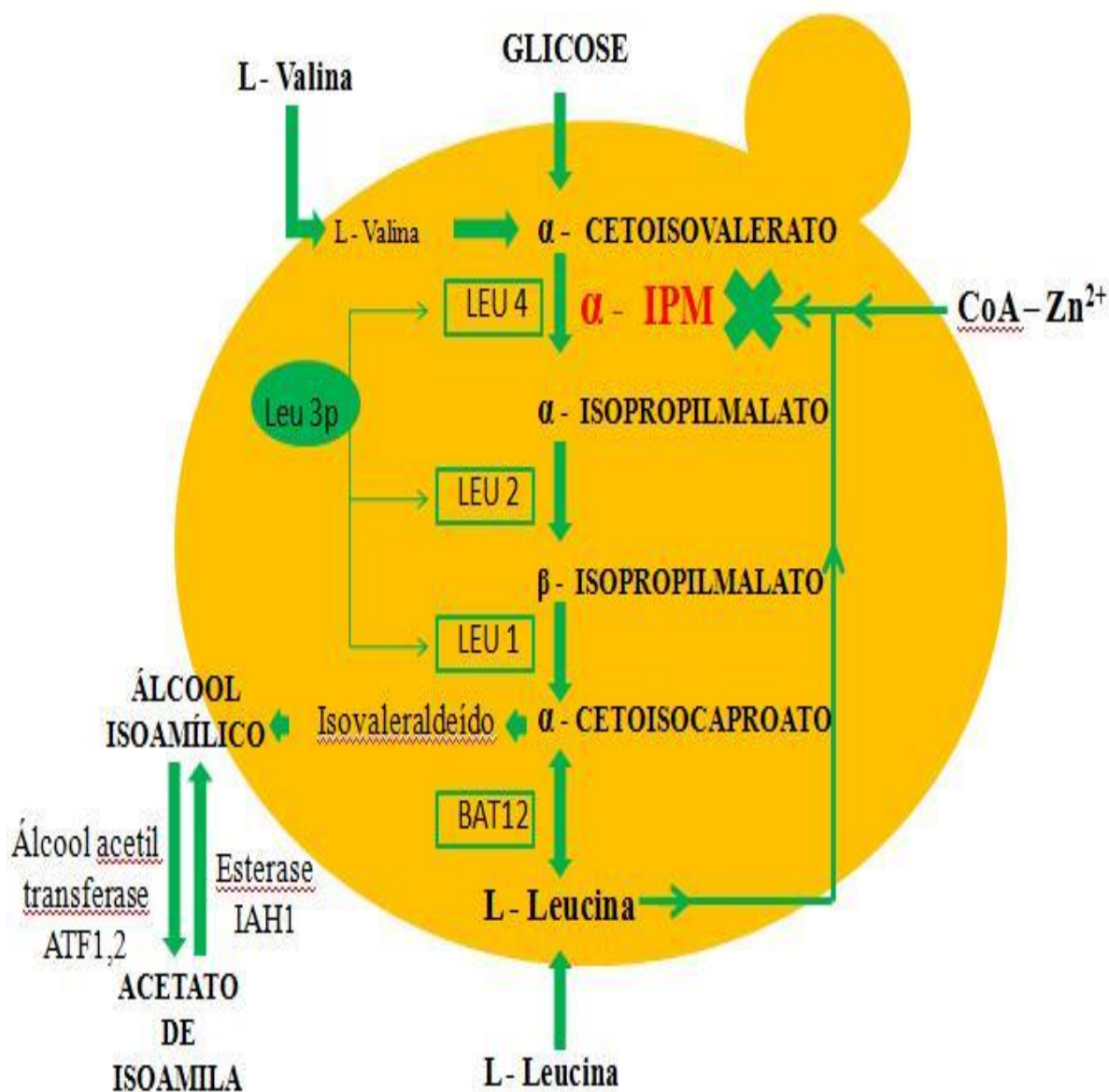


Figura 3 - Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila. A α -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via sintética. O α -cetoisocaproato pode ser convertido tanto em L-leucina quanto a álcool isoamílico. O acúmulo de L-leucina inibe a atividade da α -IPM, assim como o Zn^{2+} complexado a CoA. Fonte: (Ashida e cols., 1987; Kohlhaw, 2003; Oba e cols., 2006) (Adaptado).

A via de biossíntese de L-leucina a partir de glicose via α -isopropilmalato, é catalisada respectivamente pela α -isopropilmalato sintase (α -IPM), (gene *LEU4*), α -IPM isomerase (gene *LEU1*), e β -IPM desidrogenase (gene *LEU2*). Os respectivos substratos destas enzimas são o α -cetoisovalerato, α -isopropilmalato e β -isopropilmalato. O α -cetoisocaproato pode ser convertido em L-leucina ou álcool isoamílico, sendo a α -IPM sintase a enzima chave no controle desta via sintética, já que o acúmulo de L-leucina inibe a atividade da α -IPM por “feedback” negativo. A transcrição dos genes *LEU4*, *LEU1* e *LEU2* é induzida pelo fator transcricional Leu3 p que atua como um repressor na ausência e ativador na presença de α -IPM (Kohlhaw, 2003; Oba e cols., 2006). A atividade da enzima α -IPM pode também ser regulada pela Coenzima – A (CoA) (Figura 3). O controle exercido por CoA é dependente de uma complexação com Zn^{2+} (Cavalieri e cols; 1999). Desta maneira, apenas quando o Zn^{2+} está presente, o aumento da concentração de CoA, desencadeia uma inativação temporária da biossíntese de álcool isoamílico e um aumento no consumo de acetil –CoA, permitindo assim a sua canalização para o ciclo de Krebs (Tracy & Kohlaw,1977).

Objetivando uma maior produção e acúmulo de álcool isoamílico por leveduras, alguns estudos foram realizados com a intenção de selecionar cepas mutantes resistentes a 5, 5, 5’ –trifluoro – DL – Leucina (TFL), um análogo de L-Leucina. Estas cepas demonstrando resistência à retro inibição por L-Leucina conseqüentemente poderiam acumular álcool isoamílico (Yoshizawa e cols; 1999). Ainda segundo Yoshizawa (1999), cepas selvagens em presença de TFL promovem sua incorporação em proteínas que passam a não funcionar normalmente e a síntese de L-leucina é inibida com conseqüente morte celular. Mutantes por sua vez, resistentes a TFL que não apresentam a inibição por L-leucina não somente sobrevivem como também acumulam maiores quantidades de L-leucina e álcool isoamílico. Em adição aos álcoois superiores, outro importante produto secundário intracelular do metabolismo de açúcares durante a fermentação são os ésteres, também encontrados em outras bebidas alcoólicas e que contribuem diretamente com o aroma e sabor do produto. Os ésteres são derivados dos ácidos carboxílicos onde o grupo OH é substituído por um grupo -OR e apesar de constituírem importante fração dos compostos orgânicos que conferem sabor e aromas diversos aos alimentos e bebidas, são substâncias geralmente de baixo limite de detecção e percepção. Nas bebidas alcoólicas, os

ésteres podem ser diferentemente classificados quanto a parâmetros tais como ponto de ebulição (baixo, médio e alto), odor (floral e frutas etc.) e polaridade (polar e apolar).

Os ésteres podem ainda ser classificados quanto à sua estrutura, onde ocorrem:

a) os ésteres de acetato (o grupo ácido é acetato e o grupo alcoólico é etanol ou um complexo alcoólico derivado de metabolismos de aminoácidos) tais como acetato de etila (solvente), acetato de isoamila (banana) e acetato de fenil etila (rosas, mel);

b) os ésteres de etila: (o grupo ácido é um ácido graxo de cadeia média [MCFA – sigla em inglês] e o grupo alcoólico é etanol e inclui hexanoato de etila (maça), octanoato de etila (maça azeda) e decanoato de etila (floral) (Lambrechts e Pretorius, 2000).

A formação dos ésteres de acetato se dá intracelularmente através de uma reação catalisada por uma enzima e dois substratos. Ocorre uma condensação entre um álcool superior derivado do metabolismo de aminoácidos e uma molécula de acetil coenzima A. O grupo de enzimas utilizadas por *S.cerevisiae* e que participam da síntese de ésteres são chamadas de álcool O-acetiltransferases (AATs), e as envolvidas que utilizam como substratos os álcoois e acetil coenzima A. São descritas quatro diferentes álcool acetiltransferases: Atf1p, Atf2p, Eeb1 e Eht1p (etanol hexanoil transferase), sendo esta última responsável possivelmente 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; Saerens e cols., 2006; Verstrepen e cols., 2003b; Verstrepen e cols., 2003a; Verstrepen e cols., 2004; Yoshikawa e cols., 1995; Yoshizawa e cols., 1999).

Destas enzimas, a mais estudada é a Atf1p (Verstrepen e cols; 2003a). A álcool acetiltransferase I (Atf1p) é codificada pelo gene ATF1 e consiste de 525 aminoácidos com massa molecular de 61kDa. A Atf1p é apontada como responsável por 80% da formação de acetato de isoamila e 40% da produção de acetato de etila em bebidas alcoólicas. Experimentos com a superexpressão de Atf1 resultaram em pronunciado aumento dos níveis de acetado de etila e acetato de isoamila corroborando com a indicação do importante papel desta enzima na produção destes ésteres. A ausência de fontes de ácidos graxos insaturados de cadeia média, nitrogênio e carbono além de traços de oxigênio reprimem o gene ATF1 e conseqüentemente à diminuição na síntese de ésteres de acetato (Fujii e cols., 1997; Lilly e cols., 2000; Mason e Dufour, 2000). A quantidade final de

ésteres produzidos é dependente da abundância relativa dos álcoois e acil – CoAs correspondentes produzidos pelas leveduras, além do controle das atividades das enzimas envolvidas na síntese e na hidrólise destes compostos. Para avaliar a real influência destes genes na produção de ésteres, os genes ATF1 e ATF2 foram clonados e superexpressos em leveduras utilizadas na produção do vinho, com conseqüente fermentação utilizando destes transformantes. A conseqüência foi um aumento da concentração de acetato de isoamila e de acetato de etila (Fukuda e cols., 1996; Fukuda e cols., 1998; Lilly e cols., 2000; Mason e Dufour, 2000; Swiegers e cols., 2005). Em outro estudo, Verstrepen e cols; (2003a) através de análise por cromatografia gasosa do produto fermentado de diferentes cepas de *S. cerevisiae* confirmaram que o nível de expressão de ATF1 e ATF2 afeta de grande maneira a produção de acetato de etila e de acetato de isoamila. Na busca por leveduras que produzissem maiores teores de ésters, Ichikawa e cols; (1991) isolaram cepas de leveduras resistentes a cerulenina, com maior capacidade de produção de hexanoato de etila e ácido caprótico e sugeriram que o ácido caprótico tem relação com a síntese de ácidos graxos. Embora a via de síntese de ácido caprótico não esteja totalmente elucidada em leveduras, acredita-se que este metabólito seja resultante da síntese de ácidos graxos em geral, e não da degradação de ácidos graxos de cadeia longa. Esta síntese em leveduras é catalisada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. A alteração no balanço da atividade catalítica desta enzima afeta o comprimento da cadeia de ácidos graxos sintetizados, e sendo a cerulenina um inibidor específico desta enzima, o uso deste inibidor é uma estratégia proposta para seleção de mutantes com maior capacidade de produção e acumulação de ésteres (Figura 4). Nas cepas resistentes à cerulenina, foi observada uma mutação no gene FAS2, o qual codifica para a enzima ácido graxo sintetase, o que pode explicar a maior produção de ésteres por parte destas cepas mutadas (Arikawa e cols; 2000; Akada e cols; 1999 e 2001).

1.7 Leveduras selecionadas utilizadas no processo produtivo

Há mais de dois séculos existem relatos do uso de leveduras selecionadas utilizadas no início do processo fermentativo da produção de cerveja e vinho (Pretorius e cols; 2000). Desde a década de 1970, a inoculação de culturas puras selecionadas de



Figura 4 - Biosíntese de ácidos graxos em leveduras. Esta síntese em leveduras é catalizada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. Alterações na atividade catalítica da ácido graxo sintetase tem como resultado a mudança de comprimento dos ácidos graxos formados, os quais funcionam como precursores na formação de ésteres de etila. A cerulenina é um inibidor específico desta enzima. Fonte: (Beltran e cols., 2006; Dufour e cols., 2003; Saerens e cols., 2006; Ichikawa e cols., 1991) (Adaptado).

leveduras no mosto de vinho ou cerveja, tem melhorado a qualidade destes produtos. Deste momento em diante algumas pesquisas tem objetivado a busca por leveduras que melhorem as características do processo fermentativo ou do produto final. Um ponto importante na busca de leveduras que melhorem as características do produto final está na própria exigência e demanda do mercado externo. Recentemente o mercado tem atravessado profundas transformações, especialmente devido à elitização do consumo e na busca crescente por qualidade. Embora a produção da cachaça seja ela toda praticamente consumida pelo mercado interno, tem-se verificado um crescimento acentuado da sua aceitação no mercado internacional, sendo que hoje ela representa o terceiro destilado mais consumido no mundo (Estanislau e cols; 2002). Levando em conta a grande aceitação e a pequena participação no mercado externo (apenas cerca de 1% da produção nacional é exportada, Estanislau e cols; 2002), o uso de cepas selecionadas que contribuam para a manutenção da qualidade e identidade da cachaça pode ser uma alternativa importante no aprimoramento do processo fermentativo e controle das qualidades do produto. Evidências desta importância do uso de cepas selecionadas na produção da cachaça provém da produção do vinho, onde os compostos que proporcionam sabor e aroma são formados durante a fermentação alcoólica e sua produção depende principalmente da espécie de levedura usada e das condições de fermentação (Pretorius e cols; 2000). Alguns estudos demonstraram que o uso de cepas selecionadas contribui para as características do vinho, assim sendo é importante identificar as diferentes capacidades de produção de compostos voláteis das cepas de *S. cerevisiae* para escolher a melhor cepa para a produção de um vinho com melhores propriedades (Cardoso e cols., 2004; Fraile e cols., 2000; Ostergaard e cols., 2000; Patel e Shibamoto, 2002; Pretorius e Bauer, 2002; Pretorius e Hoj, 2005).

Segundo Lambrechts e Pretorius (2000), culturas iniciadoras têm sido desenvolvidas para fermentar com maior rapidez e eficiência, produzindo vinhos com características desejáveis. O uso de inóculo com cepas de leveduras selecionadas pode aumentar a produtividade e eficiência da fermentação, assim como a produção de certos componentes do aroma da bebida. Além destas propriedades, estas cepas selecionadas possuem maior tolerância ao etanol e à temperaturas mais elevadas, assim como resistência a altas concentrações de açúcar e também a capacidade de flocular, o que torna mais dinâmico o processo de separação do mosto e das cepas ao fim da fermentação (Vicente e cols; 2006).

Em conjunto a estas características desejáveis a cepas selecionadas, é possível também pela seleção de cepas, excluir aquelas produtoras de sulfeto de hidrogênio, composto este indesejável nas bebidas alcoólicas devido a seu odor repugnante (Ostergaard e cols, 2000; Pretorius, 2000; Ribeiro e Horii, 2004).

Apesar dos recentes esforços para identificação, seleção e identificação de cepas com características adequadas à produção de cachaça de melhor qualidade, (Vicente e cols; 2006) ainda há um grande número de alambiques que trabalham com leveduras de panificação prensadas, e com fermentos naturais. Ao longo dos ciclos de fermentação, que dura normalmente entre 20 a 24 horas, o caldo de cana-de-açúcar vai sendo lentamente “contaminado” pelas leveduras indígenas, que se sobrepõem e dominam o processo fermentativo. Isso ocorre em qualquer região do país, com predominância de microrganismos adaptados às condições locais (Lima, 2001). Pesquisas têm sido realizadas em diversas partes do mundo para desenvolver tecnologias que agreguem ao produto uma alta qualidade para enfrentar as exigências do mercado consumidor. Os resultados dessas pesquisas têm demonstrado que a qualidade das bebidas está relacionada com a padronização do processo e com a ecologia microbiana presente no mosto fermentado. Ainda restam muitos pontos não elucidados quanto à participação de leveduras não *S. cerevisiae* assim como outros microrganismos contaminantes no processo fermentativo para produção da cachaça, especialmente quanto à quantidade ou proporção ideal entre eles para a formação das várias substâncias que contribuem para o sabor e aroma ideais para a cachaça (Lambrechts e cols; 2000; Schawn e cols; 2001).

1.8 Cromatografia gasosa

A palavra cromatografia é oriunda do grego kroma [cor] + graph [escrever] quando no passado, foi uma técnica utilizada para separação de misturas de pigmentos vegetais em colunas recheadas com adsorventes sólidos e solventes variados pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett. A definição de cromatografia dada pela IUPAC em 1993 é a seguinte: “é o método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais, estacionária, enquanto a outra se movimenta numa direção definida”. O princípio básico da cromatografia está na separação

de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido ou sólido) e uma fase móvel (líquido ou gás). De acordo então com a fase móvel utilizada, a cromatografia pode ser classificada como cromatografia líquida, ou cromatografia gasosa respectivamente quando a fase móvel é um líquido ou um gás.

Considerando a cromatografia gasosa, esta pode ser dividida quanto à sua fase estacionária em cromatografia gasosa sólida, ou cromatografia gasosa líquida. Na cromatografia gasosa então, a separação ocorre pela partição da amostra entre duas fases distintas: a fase estacionária que possui uma grande área superficial, e o gás que percola através da fase estacionária. O equilíbrio então da distribuição da amostra entre as fases se dá pela sua solubilidade e pela temperatura da fase estacionária. Assim sendo os componentes da amostra (solutos ou analitos), separam-se uns dos outros através de suas afinidades pela fase estacionária (Mc Nair e cols; 1997). Um cromatógrafo é constituído basicamente por um reservatório de gás e controladores de vazão ou pressão, gás de arraste, injetor de amostra, coluna cromatográfica e forno da coluna, eletrônica de tratamento (amplificação) de sinal, e por fim registro de sinal (registrador ou computador), conforme mostra a Figura 5.

Um dos requisitos da fase móvel é que a mesma não reaja com a amostra, com a fase estacionária ou superfícies do instrumento apenas a carregando através da coluna, assim sendo usualmente referida como gás de arraste. Mais que isto o gás deve ser puro e isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária. O uso de cromatografia gasosa somente pode ser aplicado a substâncias voláteis e termicamente estáveis, ou caso contrário um derivado com estas qualidades deverá ser obtido antes de ser analisado. Um grande problema no emprego desta técnica talvez resida na falta de conhecimentos concretos prévios quanto às propriedades dos compostos a serem analisados. Outro problema é que na maioria dos detectores utilizados, como exemplo no detector por ionização de chama (D.I.C.), a detecção é fundamentada apenas no tempo de retenção do analito na coluna, o que pode gerar confusões quanto à pureza e natureza do composto caso algum analito tenha tempo de retenção idêntico ou similar a outro.

Este problema pode ser contornado com o uso de padrões de referência e com diferentes colunas ou detectores. Como forma de obter dados mais apurados tanto quantitativamente quanto qualitativamente, pode-se usar de espectrometria de massas como detector para

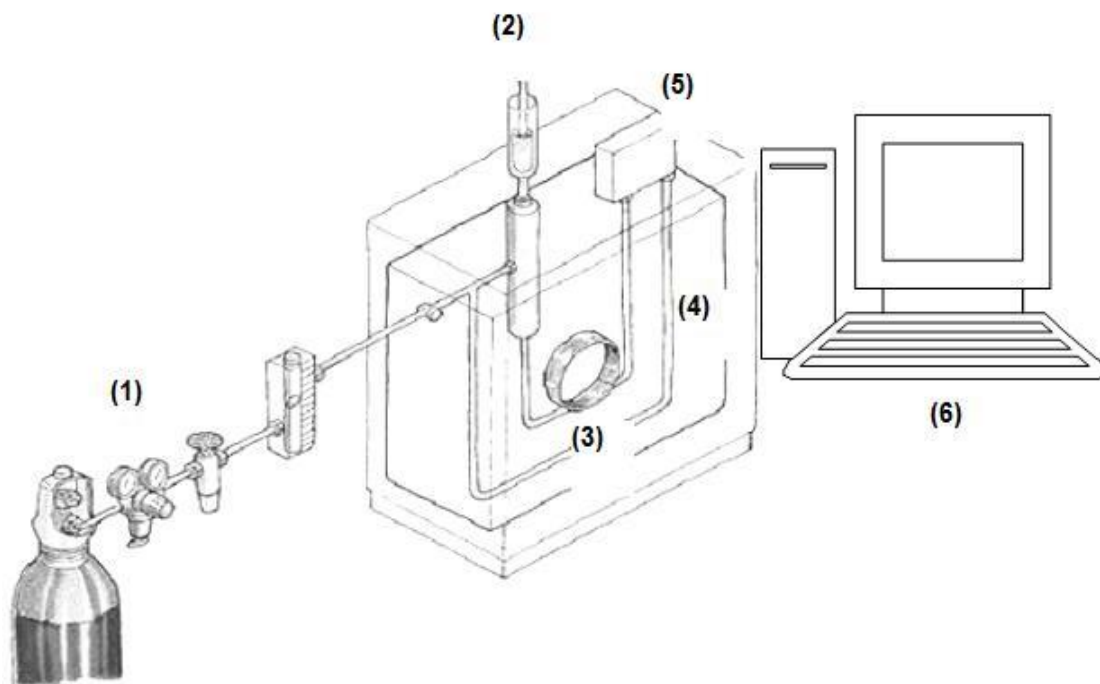


Figura 5 - Esquema de um cromatógrafo a gás. (1) Reservatório de gás e controles de vazão ou pressão do gás de arraste. (2) Injetor de amostra, (3) Coluna cromatográfica e (4) Forno da coluna, (5) Detector e eletrônica de tratamento (amplificação) de sinal, e por fim (6) Registro de Sinal (registrador ou computador),

análises cromatográficas. O espectrômetro pode ser altamente seletivo para o analito de interesse, facilitando as exigências no preparo das amostras e diminuindo a necessidade da separação cromatográfica completa dos constituintes presentes em uma mistura (Harris D.C. e cols; 1995). Cada analito eluído da coluna cromatográfica é bombardeado por uma fonte de íons (normalmente impacto por elétrons) que fragmenta o composto gerando um grande número de íons. Os íons resultantes são separados em um analisador de massas (quatro cilindros metálicos denominados em conjunto como quadrupolo, empregando radiofrequência alternante entre eles). Quando o espectrômetro possui este analisador do tipo quadrupolo, o mesmo é responsável por filtrar os íons, com base em sua relação massa carga (m/z). Os íons são separados com base na estabilidade de suas trajetórias em um campo elétrico, sendo este criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos. Esta estabilidade baseada na relação de interação dos fragmentos iônicos com a radiofrequência, faz com que apenas íons de determinada relação massa carga (m/z) passem intactos pelo quadrupolo sem colidirem com as barras ou fendas de localização (Figura 6).

Variando-se a radiofrequência, é possível efetuar uma varredura através de ampla faixa do espectro de massas de interesse (Lanças F.M. e cols; 1993). Uma das formas de aumentar a seletividade da espectrometria de massas para determinado analito e melhorar a detectabilidade é utilizar o monitoramento seletivo de íons (SIM – Selected Ion Monitored). Este aumento de seletividade se dá pelo ajuste no monitoramento de apenas alguns poucos valores de m/z (geralmente não mais que 4 ou 5 no mesmo intervalo de tempo). O principal motivo do aumento da detecção no SIM está no maior tempo de aquisição espectral gasto na aquisição de dados em uma faixa pequena de massa (Harris D.C. e cols; 1995). No SIM, a seleção de íons é feita de acordo com o espectro de massas de cada analito, onde os íons escolhidos são geralmente os de maior intensidade (pico base) e relevância, e que não tenham interferência com nenhum outro íon presente na amostra na mesma faixa de tempo de retenção. Quando comparados a outros detectores o detector de massa possui a desvantagem do maior custo quando comparado a detectores “clássicos”, porém apresenta como vantagens relevantes sua sensibilidade, seletividade e o fato de poder fornecer informações quanto à estrutura dos compostos eluídos da coluna (Lanças F.M. e cols; 1993).

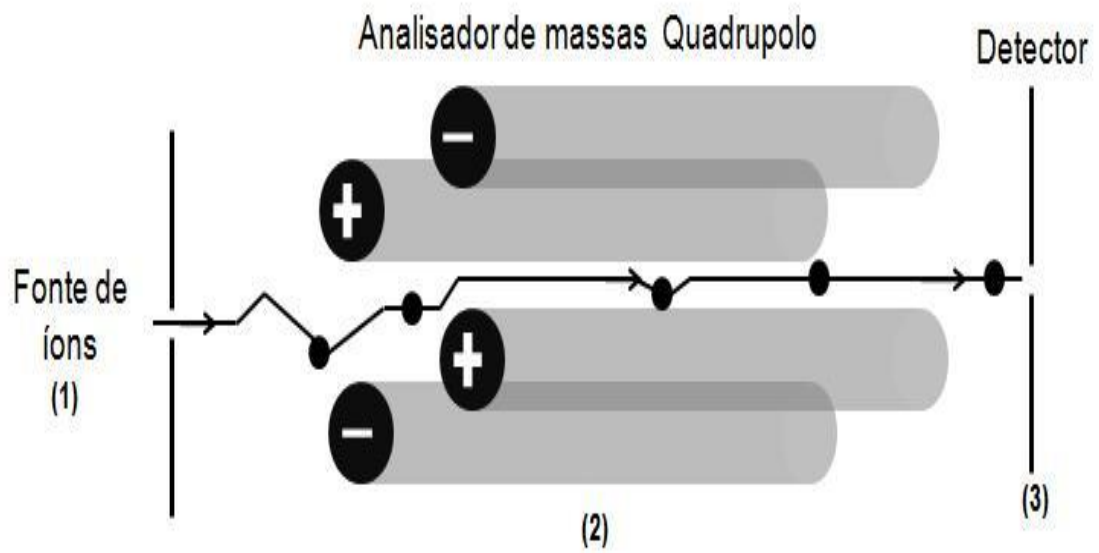


Figura 6 - Diagrama esquemático de um detector de massa: (1) Íons, (2) analisador de íons (quadrupolo), (3) Detector de íons.

1.9 Identificação e caracterização molecular de leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um micro organismo unicelular, com formato elipsoidal, medindo aproximadamente 5 a 10 μm de diâmetro, sendo um dos modelos de organismo eucarióticos mais estudados em biologia celular e molecular. As cepas haplóides deste microorganismo contêm aproximadamente 12 a 13 megabases de DNA nuclear distribuídos ao longo de 16 cromossomos lineares e com cerca de 6000 genes que são traduzidos em proteínas. A facilidade de trabalho com este organismo aliado ao amplo uso na indústria de bebidas e alimentos, leva ao desejo de conhecimento a nível molecular deste microorganismo, com objetivo de facilitar o entendimento dos processos produtivos que envolvem estas leveduras. Na indústria de vinhos já data de algum tempo o reconhecimento da levedura como de fundamental importância no processo de obtenção do vinho, e deste reconhecimento nasce a necessidade de controlar as propriedades metabólicas e genéticas das leveduras empregadas nos processos fermentativos enológicos, assim como desenvolver sistemas de análises que permitam distinguir as leveduras utilizadas no processo, dos contaminantes.

Uma das formas de se controlar as propriedades metabólicas e genéticas das leveduras está justamente no uso de cepas selecionadas de leveduras *S. cerevisiae* na produção de bebidas alcoólicas, já que estas diferem significativamente em seu desempenho fermentativo, assim como na contribuição no sabor e qualidade de vinhos e destilados. Uma das formas de isolamento e seleção de leveduras está na caracterização e distinção de cepas selecionadas baseada apenas no uso de métodos morfológicos, fisiológicos, e bioquímicos clássicos, mas estes se tornam limitantes uma vez que a maioria das cepas pertence à espécie *S. cerevisiae* (De Barros Lopes e cols; 1996; Fernández-espina e cols; 2001). Estes motivos têm levado ao desenvolvimento de metodologias para a identificação e diferenciação molecular de cepas de leveduras, permitindo assim o estudo da relação das diferenças entre elas com características que contribuam favoravelmente para a qualidade da bebida (Lambrechts e Pretorius, 2000; Pretorius e Bauer, 2002; Pretorius e Hoj, 2005).

Além da identificação e caracterização molecular das cepas usadas como inóculo no processo fermentativo, é de importância também que para controle da qualidade do

produto final, o processo fermentativo seja ao máximo controlado, e isto implica na segurança de que este foi realmente realizado pelas cepas inoculadas e selecionadas (Querol e cols; 1992a), o que motiva o uso de técnicas moleculares eficientes e rápidas que possibilitem as distinções entre as cepas inoculadas e as cepas remanescentes presentes na flora indígena (Plengvidhya e cols; 2004). Na produção da cachaça, o acompanhamento das leveduras presentes no processo fermentativo se torna ainda mais importante visto que o mesmo ocorre em sistema aberto, sendo assim mais sensível a microorganismos contaminantes. Além destas possíveis contaminações, durante a fermentação do caldo de cana, existe uma sucessão de espécies de leveduras sendo *S. cerevisiae* prevalente no final do processo fermentativo.

O alto polimorfismo genético e a especificidade local de populações de leveduras de diferentes destilarias de acordo com trabalhos anteriores (Guerra e cols., 2001; Morais e cols., 1997; Pataro e cols., 2000) sugerem também a necessidade da utilização de técnicas rápidas e precisas que acompanhem a presença de leveduras *S. cerevisiae* iniciadoras de um processo fermentativo até o final do processo para garantir agilidade em possíveis intervenções, caso haja alguma contaminação, objetivando melhoras na qualidade do produto final (Lopez e cols., 2001; Schuller e cols., 2004; Valero e cols., 2005).

Um grande passo em direção ao desenvolvimento de técnicas que permitissem a caracterização e diferenciação de linhagens de leveduras fermentadoras foi o desenvolvimento da PCR (Polymerase chain reaction), utilizando a amplificação de sequências aleatórias ou específicas. Esta reação consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região particular da fita simples de DNA. Resumidamente esta reação envolve um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio ($MgCl_2$) e uma DNA polimerase termoestável. As concentrações de dNTP, íons magnésio e iniciadores são variáveis de acordo com a reação desejada. Durante a reação de PCR, três eventos diferentes devem ocorrer a cada ciclo. O primeiro é a desnaturação da fita dupla de DNA seguido pelo anelamento dos iniciadores à fita de DNA que será sintetizada, sendo que o sucesso do anelamento dependerá de sua maior concentração no meio reacional em relação ao DNA e também de seu tamanho muitas vezes inferior permitindo assim sua hibridização com a sequência complementar antes que esta sofra renaturação. A última parte do ciclo consiste na extensão a partir dos

iniciadores por uma polimerase termoestável. O tempo para a cópia completa da fita de DNA depende do tamanho do produto de PCR.

De posse desta poderosa ferramenta molecular, a caracterização ao nível de espécie das leveduras fermentativas se torna possível, por exemplo, pela análise dos perfis resultantes da digestão com enzimas de restrição do DNA amplificado pelos iniciadores ITS1 e ITS4, que codifica o gene ribossomal 5.8S e a região não codificadora ITS (internal transcribed spacers) (Hopfer e cols; 1993; Molina e cols; 1993; Redecker e cols; 1997; Wyder e Puhan 1997). Ao nível polimórfico, outra técnica utilizando PCR que permite uma clara distinção entre as cepas é a RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica se baseia na amplificação de regiões randômicas usando iniciadores “específicos ou não”. De acordo com Guerra e cols; (2001) a vantagem desta técnica é a de analisar várias amostras rapidamente permitindo monitorar a propagação das leveduras no processo fermentativo. A utilização dos iniciadores EI1 e LA1 que contém seqüências complementares ao sítio de splicing dos introns se torna eficiente nesta tarefa uma vez que os introns não sendo essenciais para as funções gênicas apresentam seqüências não conservadas e variáveis que permitem a partir de sua amplificação, gerar diferentes perfis de bandeamento que podem ser usados para caracterização e diferenciação de indivíduos ao nível de espécie e intra-espécie.

Ainda utilizando-se da reação de PCR, outra técnica desenvolvida para análises polimórficas foi estruturada na variação de posição e número dos introns no gene mitocondrial COXI, o qual codifica a maior sub-unidade da citocromo oxidase C e tem sido descrito como o gene mais rico em introns presente em leveduras (Hardy e Clark-Walker, 1991; Sekito e cols; 1995; Foury e cols; 1998). De acordo com Lopez e cols; (2003) uma reação de PCR multiplex com quatro primers selecionados mostrou-se muito efetiva na análise de polimorfismos de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho.

Outra técnica utilizada na diferenciação de leveduras é a análise de microssatélites. Os microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR - “Simple Sequence Repeats”) são repetições “in tandem” de DNA, ou seja, seqüências consecutivas compostas de 1 a 6 pares de base (pb) de unidades longas (Li e cols; 2002). Estas seqüências se encontram tanto em eucariotos quanto em procariotos, e ainda em vírus, e são encontrados em diferentes

regiões do genoma, em regiões codificadoras ou em regiões não-codificadoras (Toth e cols; 2000). As seqüências em repetição no DNA podem induzir ao erro de pareamento durante a replicação do DNA, em que a DNA polimerase aumenta ou diminui o número das unidades repetidas “in tandem”, podendo levar a uma inserção ou deleção de um par de bases (Ellegren e cols; 2004). Apesar do sistema de reparo do DNA, alguns erros podem permanecer e se tornarem mutações (Griffiths e cols; 1999). O resultado disto é um novo polinucleotídeo com maior ou menor número de unidades repetidas, e conseqüentemente a razão pela qual os microssatélites são tão polimórficos em diferentes cepas de uma mesma espécie (Brown; 2002). Os microssatélites são usados para estudos de tipagem e genética de populações porque possuem muitas vantagens como marcadores genéticos, sendo altamente polimórficos, reprodutíveis e detectáveis por PCR (Saghai Maroof e cols; 1994). Para a reação de amplificação do DNA utilizam-se “primers” que flanqueiam as seqüências repetidas “in tandem” dos microssatélites e desta maneira ocorre a amplificação in vitro de uma região altamente polimórfica do DNA contendo as SSRs. Os produtos da amplificação são identificados por eletroforese conforme seus tamanhos de fragmentos correspondentes de cada alelo. A técnica é muito rápida além de muito sensível. (Gomes e cols; 2000). Em *S. cerevisiae*, o entendimento de seu genoma completo facilitou a identificação dos microssatélites e o seu uso para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a identificação e diferenciação de linhagens (Hennequim e cols; 2001).

A evolução da técnica de PCR tem ajudado muito na tarefa de identificar o nível de expressão de determinados genes. O PCR convencional não apresenta valores quantitativos de amplificação e por esta razão foi desenvolvido o PCR em tempo real, que é uma técnica descrita como quantitativa por conseguir realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo. As características relevantes do PCR em tempo real são a rapidez, especificidade, sensibilidade e especialmente a quantificação. A amplificação é dividida em 3 fases: a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase log em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos. (Schaad e cols; 2002). Atualmente os métodos de detecção da amplificação em tempo real são divididos em detecção não-específica e específica. O corante intercalante Syber Green é um exemplo de corante que permite uma detecção não-específica assim como as sondas Taqman e

molecular beacons são altamente específicas e conseqüentemente permitem uma detecção específica (Ginzinger e cols; 2002).

Neste trabalho, pretende-se proceder uma caracterização bioquímico-molecular de diferentes cepas isoladas de unidades de produção de cachaça, avaliando o perfil de produção de substâncias aromatizantes e a expressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na produção de ésteres e de superiores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Proceder a caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Caracterizar e diferenciar a nível molecular as cepas utilizadas nos experimentos, avaliando as diferenças existentes entre elas através do uso de diferentes técnicas.
- 2.2.2** Determinar como diferentes cepas produzem diferentes níveis de álcoois superiores e ésteres através de cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa.
- 2.2.3** Quantificar os compostos que conferem aroma e sabor em produtos de fermentação com a utilização de cepas selecionadas.
- 2.2.4** Comparar os diferentes níveis de expressão dos genes *ATF2*, *EEB1*, *ADH1*, *BAT1*, *BAT2* e *BAP2* entre as cepas utilizadas durante a fermentação em laboratório.
- 2.2.5** Verificar a correlação entre diferentes níveis de expressão gênica com os níveis de compostos aromáticos detectados por cromatografia gasosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas utilizadas

As seis cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e utilizadas neste trabalho estão relatadas a seguir:

Identificação	Perfil
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)
LBCM 600	Cepa isolada de caldo fermentado de uma destilaria de cachaça da região do estado do Rio de Janeiro
LBCM 601	Cepa isolada de caldo fermentado de uma destilaria de cachaça da região de Divinópolis – MG
LBCM 613	Cepa isolada de caldo fermentado de uma destilaria de cachaça da região Araguari – MG
LBCM 632	Cepa isolada de caldo fermentado de uma destilaria de cachaça da região de Januária – MG
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Cepa selvagem de laboratório
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Cepa selvagem de laboratório

3.2 Manutenção das leveduras

As cepas de leveduras foram mantidas em Meio YP dextrose 2% (p/v) acrescido de glicerol 10% (p/v) e estocadas em freezer a -80°C em criotubos estéreis.

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Meio YP

O meio YP (Yeast Peptone) é composto por extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e Agar 2% (p/v) (para meio sólido) e fonte de carbono. Ao longo dos experimentos foram utilizadas diferentes fontes de carbono (Ex: sacarose e glicose).

3.3.2 Meio mínimo

O meio mínimo é composto de base nitrogenada sem aminoácidos e sem sulfato de amônio 0,2% (p/v), pH 5,2. A fonte de nitrogênio utilizada foi Triptona na quantidade de 0,3% (p/v). A fonte de carbono utilizada durante a fermentação foi Sacarose 8% (p/v). As fontes de nitrogênio e carbono foram autoclavadas separadamente.

3.4 Fermentações em escala piloto

3.4.1 Preparo do inóculo

As leveduras foram retiradas dos tubos de preservação estocados em freezer -80°C e uma alíquota de 200 μl de cada cepa foi inoculada em 3 ml de caldo YPD 2% e incubadas a 30°C durante 72 horas. Após o crescimento, as leveduras foram inoculadas em 50 ml de caldo YPD 2% e incubadas a 30°C por 24 horas. As células foram então re-inoculadas em 150 ml de caldo YPD 2%, até a fase estacionária. O início da fermentação ocorreu com o inóculo de 10^7 células/ml em frascos de 500 ml com sistema de bloqueio de entrada de ar. O meio utilizado foi o meio mínimo no volume de 300 ml contendo 15% (p/v) sacarose em volume final total. Os frascos foram mantidos durante o processo fermentativo a 30°C por 36 horas. Previamente ao inóculo, as células foram lavadas por três vezes com água destilada estéril até total remoção de resíduos do meio de cultura YPD 2% (p/v). Ao longo da fermentação nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas, alíquotas de 25 ml foram retiradas do meio fermentativo para extração dos compostos voláteis e obtenção de RNA. (Figura 7).

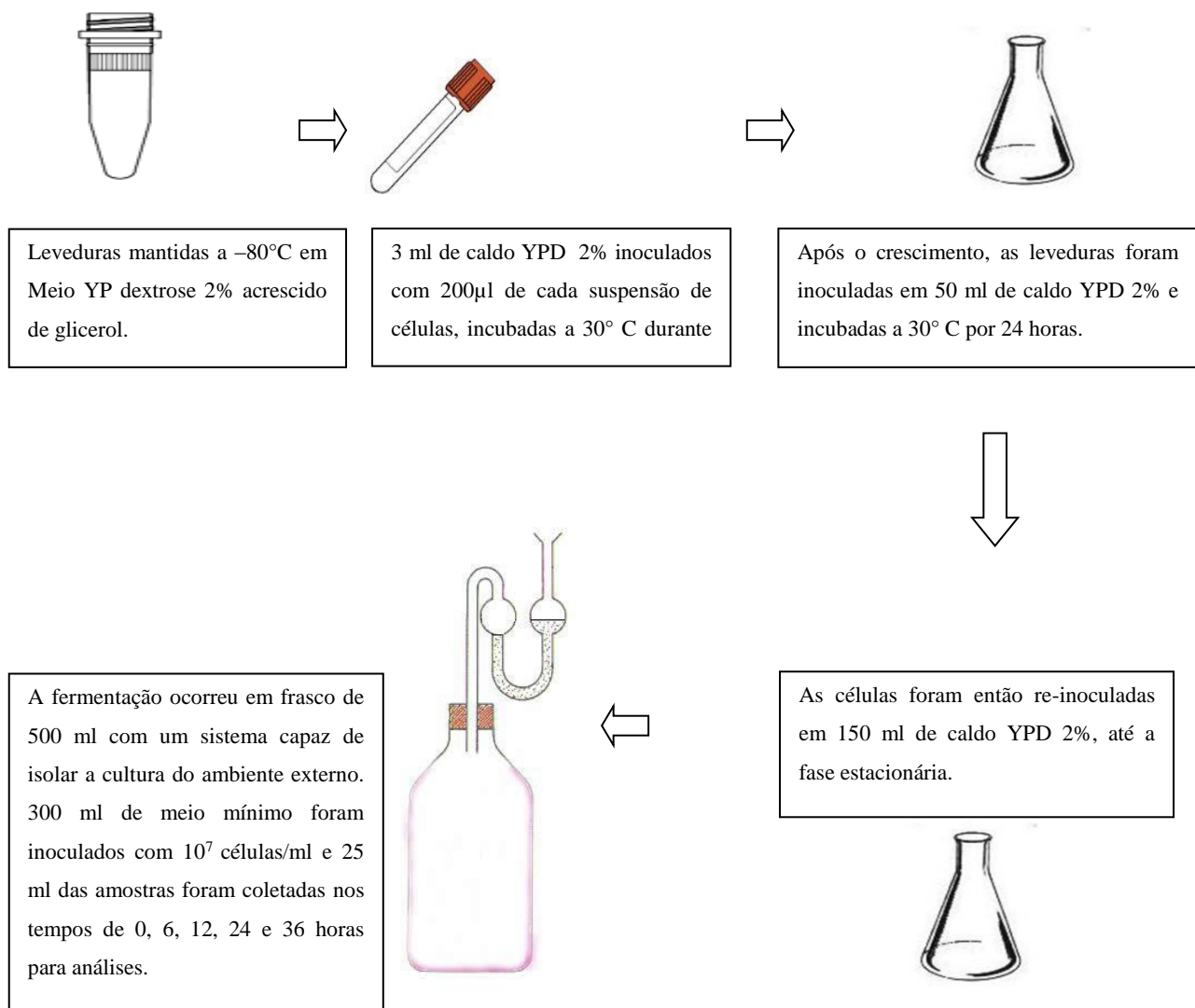


Figura 7 – Esquema para fermentação, em escala laboratorial, das leveduras selecionadas.

3.4.2 Extração líquido-líquido

Para extração dos compostos orgânicos a serem identificados e quantificados por cromatografia gasosa, a cada tempo de coleta nos intervalos de 0, 6, 12, 24, e 36 horas, 25 ml de caldo fermentado foram coletados em tubos cônicos de vidro de 50ml, previamente identificados (Bertrand e cols; 1981). As amostras foram centrifugadas a 3.700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos cônicos de 50ml contendo 5 gr de NaCl e um volume de 3 ml de uma mistura éter etílico/hexano (1:1) foi adicionada ao meio e a mistura agitada em vortex por 2 minutos. Após agitação, a mistura foi centrifugada a 3.700 rpm por 3 minutos e a fase orgânica coletada e armazenada em tubo de 15 ml. Uma re-extração foi realizada adicionando nova quantidade de 3 ml da mistura éter etílico/hexano (1:1) ao caldo fermentado e os procedimentos de agitação e centrifugação repetidos da mesma forma anteriormente descrita assim como a coleta e transferência da fase orgânica para armazenamento em tubo de 15 ml. Do volume total coletado resultante da extração, 3 ml foram transferidos para novos tubos de ensaio, e concentrado sob atmosfera de nitrogênio gasoso até a secagem total. Ao produto de secagem, adicionou-se 490 µl de éter etílico/hexano (1:1) e o volume final desejado de 500 µl corrigido com solução de 4 metil 2 – pentanol diluída 500x. (Mamede e cols; 2006)

3.4.3 Determinação dos compostos voláteis no caldo fermentado

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo Shimadzu GCMS – QP2010 plus, equipado com um detector de massas quadrupolo operando no modo de impacto eletrônico com 70 eV, com escaneamento e monitoramento de íon seletivo (SIM).

A coluna cromatográfica empregada foi uma coluna capilar de polietileno glicol (J & W Scientific) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura de filme. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: A temperatura do injetor e da interface do injetor foi igual a 240 °C, elevada a 10 °C min⁻¹ até 120 °C, seguida de uma elevação de 20°C min⁻¹ até 240 °C e mantida por 5 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1,24 ml/ min⁻¹ e taxa de “split” de 1:50. A injeção das

amostras foi feita no modo direto com 2 μ l de cada amostra. As injeções foram realizadas em triplicata.

Para a análise quantitativa, o método de adição de padrão foi utilizado com um padrão interno (4 metil 2 – pentanol) e com propósito de análise qualitativa, foi utilizado além do monitoramento dos íons selecionados (Tabela 2), o tempo de retenção. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.4 Reagentes e Padrões para cromatografia

Foram utilizados os seguintes padrões Merck: Alcool Isoamílico (grau PA), 1-propanol (grau PA), Isobutanol (grau PA), Hexanoato de etila (grau PA), Octanoato de Etila (grau PA) e Decanoato de Etila (grau PA). Para o preparo da solução alcoólica (etanol/água) 40% v/v foi utilizado álcool etílico grau HPLC (Fisher Scientific) e água destilada deionizada em sistema MilliQ (Milipore). Foi utilizada água do Sistema de Purificação Milli-Q em todas as etapas de uso necessário.

Janelas	Tempo de aquisição (min)	Modo de Aquisição	Íons (m/z)	Compostos
1	5 - 6.1	SCAN	31	Propanol
1	5 - 6.1	SCAN	43	Álcool Isobutílico
2	7 - 7.9	SCAN	55	Alcool Isoamílico
1	5 - 6.1	SIM	43	Acetato de Isoamila
2	7 - 7.9	SIM	88 - 101	Hexanoato de Etila
3	8 - 19	SCAN	88 - 101	Octanoato de Etila
3	8 - 19	SCAN	88 - 101	Decanoato de Etila

Tabela 2 - Monitoramento de íons para análise dos compostos nos modos SCAN e SIM.

3.4.5 Identificação e quantificação dos álcoois e ésteres

Os compostos foram identificados através de comparação com os tempos de retenção dos padrões e do monitoramento dos íons selecionados. A princípio os padrões foram injetados separadamente para determinação dos tempos de retenção. O método de padronização interna foi utilizado para quantificação dos compostos nas amostras utilizando o 4 metil 2 – pentanol como padrão interno para todas as análises. As curvas de calibração para os compostos em análise foram construídas plotando-se a razão da área do composto padrão e a área do padrão interno versus a concentração daquele, para os seguintes compostos: n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila. Para construção da curva de calibração, diferentes quantidades conhecidas de cada composto padrão foram adicionadas a 25 ml de meio mínimo e após esta adição, todas as etapas de extração, líquido-líquido foram procedidas conforme descrito previamente. As curvas de calibrações foram construídas utilizando cinco níveis de concentração como descrito para cada composto: n-propanol (50, 100, 150, 200, 300 µg/mL), isobutanol (50, 100, 200, 300, 500 µg/mL), álcool isoamílico (50, 500, 750, 1000, 1500 µg/mL), hexanoato de etila (500, 1000, 1500, 2000, 2500 ng/mL) octanoato de etila (500, 1500, 2500, 3500, 5000 ng/mL) e decanoato de etila (100, 500, 1500, 2500, 3500 ng/mL).

3.5 Identificação molecular das cepas

3.5.1 PCR – ITS (colônia)

A amplificação da região ITS (*internal transcribed spacer region*) correspondente à região intergênica do DNA ribossomal de leveduras, foi realizada em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler) (White e cols; 1990) usando os seguintes primers:

ITS1 (T CCG TAG GTG AAC CTG CGG)

ITS4 (T CCT CCG CTT ATT GAT ATG C)

A reação de amplificação foi realizada com 2,5µl do tampão 10X, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, 0,25mM de dNTP, 20 pmol de cada primer, 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen) em um volume final de 25 µl e 1 colônia como DNA template. A amplificação foi feita conforme o ciclo: uma desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 52° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 10 minutos, seguido de um extensão final de 10 min a 72° C.

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Ao produto de PCR (10 µl) foi adicionado 1 µl de loading buffer (6X – azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e sacarose 40% p/v). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2% (p/v) e a eletroforese conduzida em tampão TAE 1x (0,04M TRIS, 1mM EDTA, pH 8,0 ajustado com ácido acético). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (2µg/ml) sob agitação por 30 minutos. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular.

3.5.3 Purificação do produto de PCR

A 15 µl do produto de PCR foi acrescentado 400 µl de TE1X (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) e 400 µl de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 25:24:1). A mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 13.000 rpm por 10 min (Heraeus Spatech, Biofuge 13). A fase superior foi totalmente transferida para um novo tubo eppendorf. O DNA foi precipitado com 800 µl de etanol gelado 100%. O tubo foi mantido a - 80° C por 1 hora, e em seguida ocorreu uma centrifugação a 13.000 rpm por 10min (Heraeus Spatech, Biofuge 13). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 65° C e ressuspensão em 15 µl de água Milli-Q.

3.5.4 Digestão do fragmento de ITS

Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação e conseqüente purificação foram digeridos com as enzimas de restrição *Hhl*, *HaeIII* e *HinfI* (Heras Vasquez e cols; 2002). Para cada reação de digestão foram utilizados 15 µl de DNA, 2 µl de tampão de acordo com recomendações do fabricante, 0,7 µl de enzima e água estéril suficiente para um volume final de 20 µl por tubo. As amostras foram então armazenadas em estufa a 37° C “overnight”.

3.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os fragmentos resultantes da digestão foram aplicados e visualizados em gel de poliacrilamida (Acrilamida 30% e Bis-Acrilamida 1%) 8%, após 6 horas de corrida eletroforética a 80 volts. Após a corrida o gel foi corado com prata em uma solução inicial de fixação (etanol 10% e ácido acético 0,5%) por 10 minutos, em seguida a solução de fixação desprezada e adicionada a solução de coloração (etanol 10% e ácido acético 0,5% e nitrato de prata 12 mM) por 10 minutos. Logo após, a solução de coloração foi desprezada e o gel lavado com água Milli-Q por 30 segundos. Ao final uma solução de desenvolvimento (NaOH 0,75M e formaldeído 38%) foi adicionada até o aparecimento da cor. Um marcador de pares de base (1 Kb DNA - Invitrogen) foi utilizado como padrão.

3.6 Análise do polimorfismo molecular de cepas de leveduras

3.6.1 Extração do DNA genômico de leveduras

As diferentes cepas de leveduras foram inoculadas em 3 mL de meio YPD 2% e incubadas (Incubador New Brunswick Model G25) sob agitação de 200 rpm a 30° C até a fase estacionária. A cultura resultante foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 500 µl de água milli-Q estéril. A amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi novamente desprezado e as células foram ressuspensas em 280µl de

tampão de extração (sorbitol 1M, citrato de sódio 100mM, EDTA 60mM, pH 7) e 20µl de solução liticase (0,3mg/mL de liticase e 8µl/mL de β-mercaptoetanol em tampão de extração). A suspensão foi agitada e mantida a 37°C por 3 horas até a formação de esferoplastos (acompanhada por microscopia ótica). A esta suspensão foram adicionados 400µl de solução de lise (SDS 2% em Tris-HCl, 50mM - EDTA 10 mM, pH 8) e após agitação em vortex a mistura foi incubada por 10min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200µl de NaCl 5M e os tubos foram deixados no gelo por 2 horas. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o pellet foi ressuspensão em 400µl de TE (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e à esta suspensão foram adicionados 400µl de PCI (fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção 25:24:1). A mistura foi levada ao vortex por duas vezes, e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). Ao fim da centrifugação a fase superior foi transferida para um novo tubo eppendorf, e adicionada de 800µl de etanol 100% gelado. O tubo foi armazenado a -80° C por 12 horas. O DNA foi obtido após centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos(Heraeus Sepatech, Biofuge 13e lavagem com etanol gelado 70%. O DNA foi seco a 65° C e ressuspensão em 30µl de água Milli-Q (Sistema Milli-Q Millipore).

3.6.2 Quantificação do DNA

Cerca de 5µl de cada amostra de DNA de DNA genômico, preparada conforme o procedimento descrito no item 3.5.1, foi diluído em 950µl de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore). A amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo para aferir a absorbância a 260 e 280nm. Sabendo-se que uma absorbância de 1 à 260 nm corresponde a uma solução contendo 50 µg/mL de DNA calculou-se a concentração do DNA da amostra com a seguinte fórmula: $DO \times Diluição \times K = \mu g/mL$, sendo DO, a densidade ótica, K: constante que utiliza-se o valor 50 para DNA e a diluição utilizada. A Pureza do material foi avaliada pela razão entre os valores da absorbância a 260 e 280nm.

3.6.3 RAPD-PCR

O polimorfismo evidenciado por RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) foi resultado de uma amplificação em termociclador (Eppendorf-Mastercycler) (Pataro e cols., 2000), utilizando-se dois *primers*:

EII (CTGGCTTGGTGTATGT); LA1 (GCGACGGTGTACTAAC)

A reação foi procedida em um volume final de 25µl, o qual continha 1µl de DNA genômico (300 ng), 40 pmol de cada primer, 0,25mM de dNTP, 2,5µl do tampão 10X, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, e 1,0 U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen). A amplificação ocorreu com uma desnaturação inicial de a 94° C por 4 minutos, seguida por 34 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. Após o último ciclo ocorreu uma extensão final a 72° C por 5 minutos. (De Barros e cols., 1996; Pataro e cols., 2000).

3.6.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Ao produto de RAPD-PCR (12µl) foi adicionado 3µl de loading buffer (6X – azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e sacarose 40% p/v). A eletroforese foi realizada conforme o protocolo descrito anteriormente.

3.6.4 Extração e purificação do DNA mitocondrial (mtDNA)

Para extração do DNA mitocondrial das leveduras, inicialmente foi realizado um inóculo em 3 mL de meio YPD 2% e as células incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm em incubador New Brunswick Model G25 até a fase estacionária de crescimento. A cultura foi centrifugada a 3.000rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1000 µl de água milli-Q estéril. A suspensão de células foi transferida um novo tubo eppendorf e centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). Novamente o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular ressuspenso em 500µl 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 incubados a 37° C por 3 horas e a formação dos esferoplastos monitorada através de microscopia ótica. Os esferoplastos foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos e o precipitado ressuspensão em 500µl de 50 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA, pH 7,4. A estes tubos foram adicionados 13µl de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) 10%, e a mistura incubada a 65°C por 15 minutos. Imediatamente, foram adicionados 200µl de acetato de potássio 1M, e os tubos armazenados no gelo por 5 minutos e subsequentemente centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13) e colocados à temperatura de -20° C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf e o DNA precipitado pela adição de igual volume de isopropanol. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o DNAm lavado com etanol 70% gelado. Após uma nova centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o DNA seco a 65° C. O DNA foi ressuspensão em 30µl milli-Q estéril (Lopez e cols., 2001; Querol e cols., 1992b; Querol e cols., 1992a)

3.6.5 COX-PCR

A técnica descrita como COX- PCR fundamenta-se na análise do gene mitocondrial COX1 que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase. Nesta técnica analisa-se a variação no número e posição dos íntrons do gene COX, peculiar a cada cepa (Lopez e cols., 2003). Como molde foi utilizado amostras de DNA mitocondrial extraído de acordo com o item 3.5.4. A amplificação dos íntrons do COXI ocorreu em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler) utilizando os seguintes primers:

3L (GCTTTAATTGGWGGWTTTGG)

3R (ATTGTCATACCATTGTGTYCTYAT)

4L (GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA)

5R(GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT).

A reação de amplificação continha 3µl de DNAm (300 ng), 50 pmol de cada primer, 0,25 mM de dNTP, 2,5 µl do tampão 10X, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, 1,0 U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen) e um volume final de 25µl. A amplificação ocorreu com uma desnaturação inicial de 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, e com extensão final a 72° C por 5 minutos. Para visualização dos produtos de amplificação, o produto de COX-PCR (12µl) foi misturado a 3µl de loading buffer e separado em gel de poliacrilamida 6% como descrito previamente.

3.7 Análise de microssatélites

Em *S. cerevisiae*, seis micro-satélites foram descritos como abundantes e altamente polimórficos e têm sido usados como método de identificação de cepas (Legras e cols, 2005; Pérez e cols, 2001; Schuller e cols, 2004). Neste sentido, seis pares de primers foram utilizados conforme demonstrado na Tabela 3. As reações de amplificação foram feitas em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler) em dois sistemas multiplex utilizando 1µl de DNA genômico (30 ng), 2,0U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen), 2 µl do correspondente tampão 10X, 0,25 mM de cada dNTP, 1,6µl de MgCl₂ 25mM e 1µl de cada primer por reação. A reação de Multiplex “A” continha 2,5 pmol/µl de cada par de primer ScaAT4 e ScaAT6 assim como 15 pmol/µl do par de primer ScaAT1. Para a reação de Multiplex “B”, foram utilizados 5 pmol/µl de cada par de primer ScaAT2 e ScaAT3 assim como 7,5 pmol/µl do par de primer ScaAT5. Em ambos os casos o volume final da reação foi de 15µl corrigido com água Milli – Q. Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial de 95 °C por 4 min, 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 55 °C por um minuto, e extensão a 72 °C por 2,5 minutos (a cada repetição do ciclo a temperatura de anelamento diminuiu em 1 °C). A reação de amplificação prosseguiu com 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 °C, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram diluídos, (1:5 para Multiplex “A” e 1:20 para Multiplex “B”) e 2µl de cada alíquota foram adicionados a 7,75µl de Tween20 0,1% e 0,25µl de padrão de DNA (MegaBACE™ ET550-R Size Standard - GE Healthcare). As amostras foram desnatura-

Locus	Cromossomo	Primers (5'-3')	Fluorocromo
ScAAT1	XIII	AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT AGCATGACCTTTACAATTTGATAT	FAM
ScAAT2	II	CAGTCTTATTGCCTTGAACGA GTCTCCATCCTCCAACAGCC	HEX
ScAAT3	IV	TGGGAGGAGGGAAATGGACAG TTCAGTTACCCGCACAATCTA	FAM
ScAAT4	VII	TGCGGAAGACTAAGACAATCA AACCCCCATTTCTCAGTCGGA	TET
ScAAT5	XVI	GCCAAAAAAAAATAAAAAAAAA GGACCTGAACGAAAAGAGTAG	TET
ScAAT6	IX	TTACCCCTCTGAATGAAAACG AGGTAGTTTAGGAAGTGAGGC	HEX

Tabela 3 - Primers utilizados na amplificação de 6 locus de microssatélites para *S. cerevisiae*.

das a 94°C por 5 minutos e separadas por eletroforese capilar (9 Kv, 60°C, por 75 minutos para ambas reações dos Multiplex A e B) em aparelho MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare). As análises foram realizadas no software Fragment Profiler versão 2.0 (GE Healthcare).

3.8 Extração de RNA total

3.8.1 Extração de RNA

Cerca de 4 ml de cultura foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas e centrifugadas (3000 rpm por 3 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e em seguida as células foram lavadas com 2 ml de sorbitol 1M, a 4°C. Após nova centrifugação (3000 rpm por 3 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o conteúdo restante foi ressuspensão em 0,5 ml de fenol e 0,5 ml de TES (10mM Tris HCl; 10mM EDTA; 0,5% SDS; pH 7,5) seguido de agitação vigorosa em vortex. Os tubos foram incubados em banho Maria a 70°C por 1 hora, sendo agitados vigorosamente em vortex em intervalos de 5 minutos. Os tubos foram centrifugados (3000 rpm por 10 min a 4°C) e a fase superior coletada em tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 600 µl de fenol, e após nova agitação os tubos foram centrifugados (3000 rpm por 10 min a 4°C). O sobrenadante foi coletado e foram adicionados novamente 600 µl de clorofórmio. Procedeu-se nova agitação em vortex e em seguida, os tubos foram centrifugados (3000rpm por 10 min a 4°C). O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 50µl de acetato de sódio (3M pH 5,3) e 1 ml de etanol gelado 100%. Em seguida os tubos foram incubados a -80° C por 10 minutos e após este período as amostras foram centrifugadas (10000 rpm por 10 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O RNA foi ressuspensão em 50 µl H₂O DEPC (200 ml H₂O milli Q estéril, 200µl DEPC). O RNA total foi tratado com 1 U/µL de DNase-RNase Free (Promega), para eliminação de DNA contaminante, seguindo especificações do fabricante. Para confirmar a ausência de contaminação por DNA total as amostras foram amplificadas por PCR convencional utilizando os primers ITS1 e ITS4, que codifica o gene ribossomal 5.8S e a região não codificadora ITS (Internal Transcribed

Spacers) de leveduras. Uma amostra contendo DNA genômico de *S. cerevisiae* foi utilizada como controle positivo. A concentração (A260 nm) e a pureza das amostras (A260/A280nm) foram determinadas pela leitura de 1 µL de amostra no aparelho no Nanovue (GE Healthcare). O RNA total foi armazenado a -80 °C. Foi obtido RNA de três repetições biológicas extraídas em separado.

3.9 Eletroforese em gel de agarose

3.9.1 Preparação das amostras de RNA para corrida no gel

Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 68°C por 5 minutos em aparelho termobloco. Uma alíquota de 5µl de cada amostra foi adicionada a 15µl de tampão de amostra (1x volume NBC 20x, 3x volume formaldeído 37%, 2x volume loading dye, 10x volume formamida). Após a desnaturação foi adicionado 1µl de brometo de etídio 10mg/ml. Antes da aplicação as amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos.

3.9.2 Montagem do gel para corrida de RNA

Todo o material utilizado para a corrida (cuba de eletroforese, pente e suporte para o gel) foi previamente tratado com NaOH 0,1M por duas horas e depois enxaguado por várias vezes com água milli Q. A eletroforese ocorreu em um gel de agarose preparado com 1% NBC 1x e formaldeído 1%. Antes da aplicação, o gel foi pré-corrido por 30 minutos a 100V em tampão NBC 1X. Após a pré-corrida, as amostras foram aplicadas e a eletroforese realizada nas mesmas condições. Em seguida os géis foram visualizados no transiluminador a 365 nm e fotografados (Sony-KAISER-RSI).

3.10 Síntese de cDNA

Para síntese e obtenção da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen), de acordo com as recomendações do

fabricante. As amostras de RNA total (1 µg) obtidas ao longo dos diferentes tempos de fermentação foram incubadas a 65 °C por 5 minutos com 1 µL de Oligo (dt)₂₀ 50 µM, 1 µL de tampão de anelamento e água para um volume final de 8 µL. A seguir foram adicionados 10 µL de 2X first strand Reaction mix e 2 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript III RNase OUT. As amostras foram novamente incubadas a 50 °C por 50 minutos para extensão da fita de DNA e em seguida a 85 °C por 5 minutos para inativação da transcriptase. As amostras foram então incubadas com 1 µl (2 U) de RNase- H a 37 °C por 20 minutos. Os cDNAs obtidos e tratados foram armazenados a -20°C.

3.11 Quantificação dos transcritos através de RT-PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen, (2001). Este método é baseado nos valores de Ct (Cycle threshold), que representa o ponto no qual a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído. O kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) foi utilizado para detecção. O nível de expressão dos genes alvo *BAP2*, *BAT1*, *BAT2*, *ATF2*, *ADH1* e *EEB1* foi normalizado de acordo com o gene RDN 18 que codifica a região 18s do DNAr. Todas as amostras foram quantificadas em corridas independentes, analisadas com duas repetições biológicas, assim como analisadas em duplicata em cada placa de reação. Primeiramente, foram realizados ensaios nos quais foram determinadas as concentrações ótimas dos primers e da eficiência da reação. Todas as reações realizadas continham 300ng de cDNA (sintetizados conforme descrito no item 3.8), 6 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) e primers nas concentrações de 400 nM. Para os teste de eficiência, foram utilizadas diluições seriadas de 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 do cDNA. A fórmula de eficiência da PCR = $(10^{(1/-slope)} - 1)$ x 100 foi utilizada para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (slope). As condições de amplificação foram as mesmas para todas as amostras, sendo 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s e anelamento e extensão a 60 °C durante 30 s. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras

foram aquecidas com aumento de 1 °C durante 30 s, partindo de 60 °C até atingir o limite de 94 °C. Os primers utilizados estão expostos na Tabela 4, e foram desenhados conforme dados da literatura (Saerens e cols; 2008).

Gene	Primers(5'-3')	Concentração	Referência
ATF2	F-AAGCCGTACTACGTTCG R-CGCT CATGTCCATGTTC	400 nM.	Saerens e cols., 2008a
EEB1	F-TCGTACACACTTGGGACAAGTTG R-CAGTCCTTGTTAGAAATTGTGTAAAGTTC	400 nM.	Saerens e cols., 2008a
ADH1	F-TCACGCTGACTTGTCTG R-GCCTTGTAGACGGTGAT	400 nM.	Saerens e cols., 2008b
BAT1	F-CCAAATCCATCCAAGCCAAG R-AGCAGATGGGTCAAGAGAAA	400 nM.	
BAT2	F-CCGGTCCATTGGCCAAA R-ACCAATTGCCATGCTCAGTCT	400 nM.	
BAP2	F-TGGTTGGCCTTTTACTTCGGA R-TTCGTCCTCTTGTCTCATTAG	400 nM.	
RDN18	F-CGGCTACCACATCCAAGGAA R-GCTGGAATTACCGCGGCT	400 nM.	Saerens e cols., 2008b

Tabela 4 - Primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR

4. RESULTADOS

4.1 Critérios de identificação das cepas

4.1.1 Identificação molecular das leveduras

Nos estudos de evolução, genética e melhoramento de organismos, grande atenção é dada ao DNA ribossomal, localizado nas regiões organizadoras do nucléolo, devido especialmente à estrutura dessas regiões. O rDNA é por natureza altamente repetitivo com sequências de nucleotídeos (core sequence) que se repetem lado a lado (em tandem) várias vezes, o que permite algumas aplicações (Elder e cols; 1995). Por ser repetitivo e estar situado em regiões específicas do genoma, a proporção de rDNA, é em geral, alta quando em comparação com o conteúdo total da espécie, que inclui DNA nuclear, mitocondrial e ribossômico. O rDNA é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. Ao contrário de outras regiões repetitivas, sem aparente função no genoma, o rDNA codifica o mRNA, implicado no processo de tradução de proteínas. Normalmente as regiões 5.8s, 18s e 28s das unidades de repetição não apresentam variação de sequência dentre uma mesma espécie, enquanto que as regiões ITS que são transcritas variam muito. Desta maneira, ITS-PCR com primers específicos para as regiões conservadas 18S e 28S resulta em amplificação das regiões intergênicas espécie – específicas que variam em tamanho de uma espécie para outra, permitindo uma identificação das leveduras ao nível de espécie (Gardes e cols; 1991; Henry e cols; 2000). Assim sendo, foram realizadas reações de PCR para amplificação da região ITS utilizando os primers ITS1 e ITS4, permitindo amplificação de uma simples banda característica de 850 pb correspondente a parte da subunidade 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 e parte de 28s rDNA (White e cols; 1990). De acordo com uma metodologia desenvolvida em nosso laboratório, para isolar e selecionar leveduras *S.cerevisiae* para serem utilizadas na produção de cachaça, (Vicente e cols., 2003; Vicente e cols., 2006) quatro cepas selvagens foram isoladas de diferentes destilarias e utilizadas neste experimento, sendo estas as cepas 600, 601, 613, 632, além de duas outras cepas usadas como padrão: *Saccharomyces boulardii* (*S.b*) e *Saccharomyces kluyveri* (*S.k*). O resultado da amplificação apresentou fragmentos de aproximadamente 850 pb, característico da espécie *S.cerevisiae*, para as quatro cepas analisadas e para a cepa de *S.*

boulardii (Vaughan-Martini e Martini, 1998). A espécie *S.kluyveri* apresentou um amplicon inferior a 850pb (Figura 8). Para confirmar a indicação de espécie, os produtos de amplificação da região ITS de todas as espécies foram digeridos com as endonucleases de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *Hinfl*. A digestão do produto de amplificação com *CfoI*, resultou em fragmentos de 135, 365 e 385 pb respectivamente (Figura 9). A digestão com *HaeIII* gerou fragmentos de 320, 220, 180e 145 pb (Figura 10) e realizada a digestão com *Hinfl* gerou fragmentos de 117, 362 e 393 pb (Figura 11). O tamanho dos fragmentos está de acordo com o previsto para a região ITS1-ITS4 de *S. cerevisiae* (<http://db.yeastgenome.org>). O perfil de restrição foi comum às quatro cepas estudadas e idêntico ao obtido para *S. boulardii*, confirmando as cepas como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*.

4.2 Polimorfismo molecular das cepas

4.2.1 Análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Muitos estudos têm utilizado a técnica de RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) já dito para determinar o grau de polimorfismo entre cepas de leveduras. Este método apresenta como vantagens a rapidez, e simplicidade de execução, sendo utilizado tanto para discriminar cepas presentes no processo fermentativo, bem como no monitoramento na persistência de leveduras iniciadoras durante a fermentação. Nesta técnica foram utilizados os primers EI1 e LA1 complementares ao sitio de *splicing* dos íntrons (De Barros e cols., 1996; Guerra e cols., 2001; Pataro e cols., 2000; Plengvidhya e cols., 2004). Esta técnica foi utilizada em nosso trabalho para demonstrar o grau de polimorfismo das cepas 600, 601, 613 e 632 utilizadas posteriormente em experimento de fermentação controlada. O perfil de bandas dentre as quatro diferentes cepas foi um pouco similar, não impedindo porem, a diferenciação das cepas. A natureza dominante dos marcadores RAPD não permitiu também estabelecer a diferença das cepas quanto ao caráter homozigótico ou heterozigótico das mesmas. De acordo com Ferreira e Grattapaglia

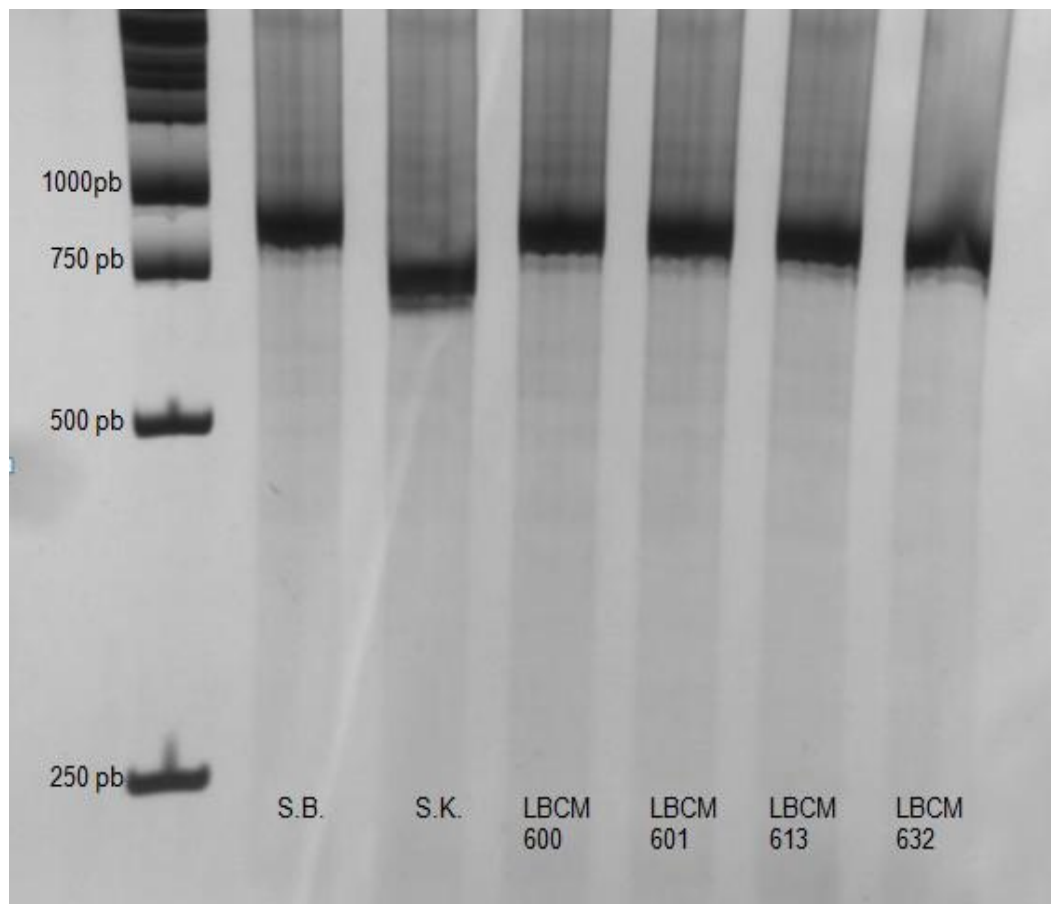


Figura 8 - Gel de poliacrilamida corado com prata apresentando os fragmentos de ITS das espécies *S. boulardii* e *S. kluyveri*, amplificado a partir dos primers ITS1 e ITS4. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

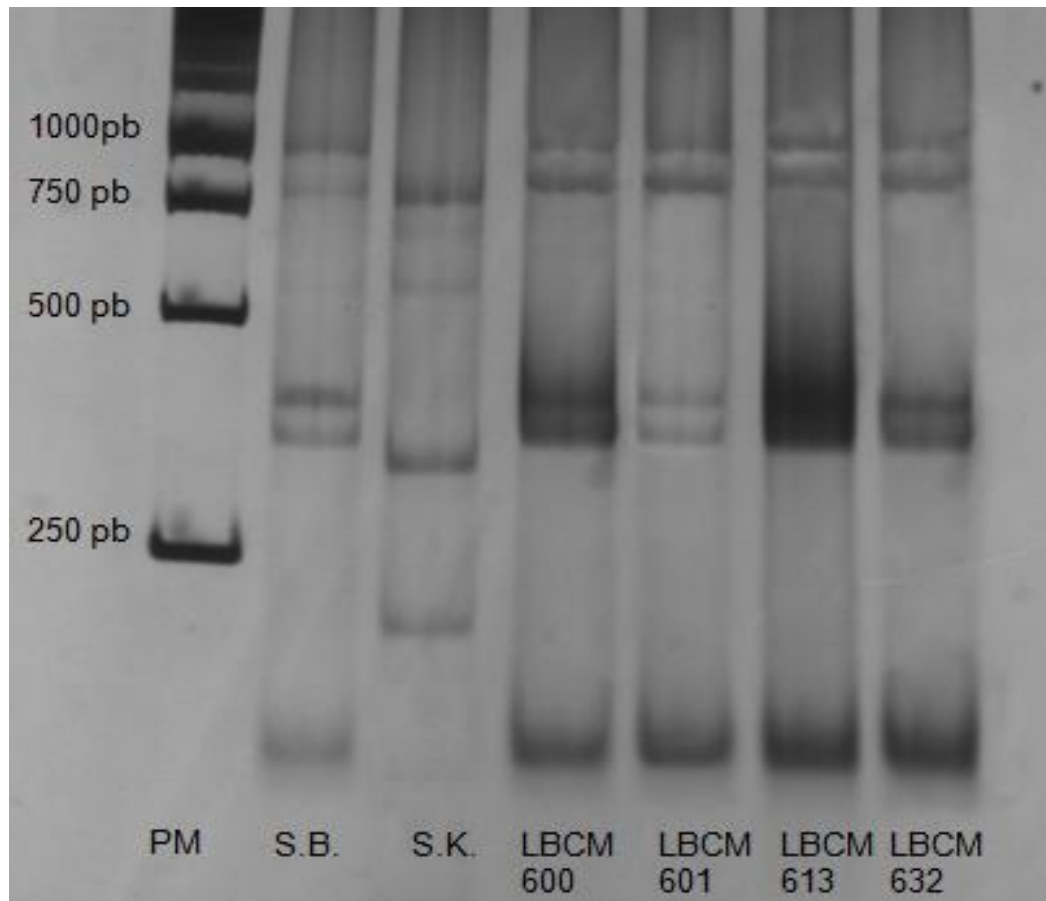


Figura 7 - Gel de poliacrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima CfoI. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

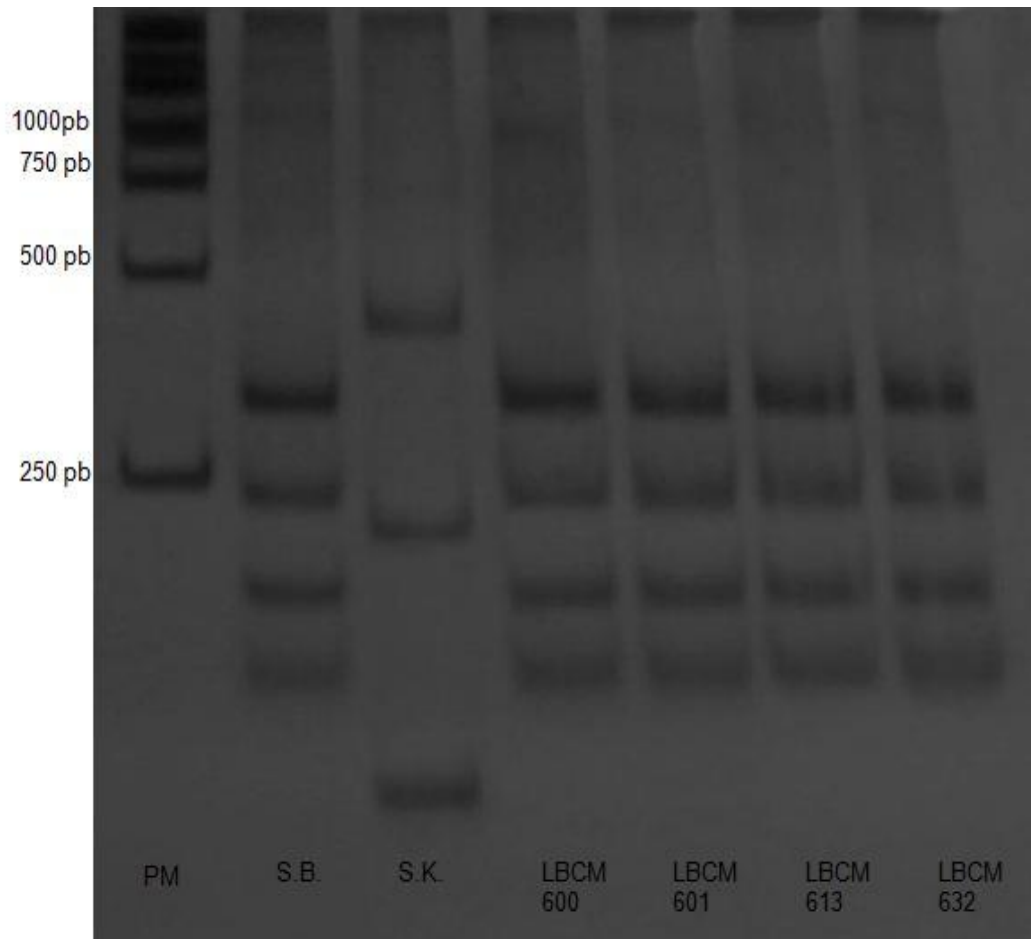


Figura 10 - Gel de poliacrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima HaeIII. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

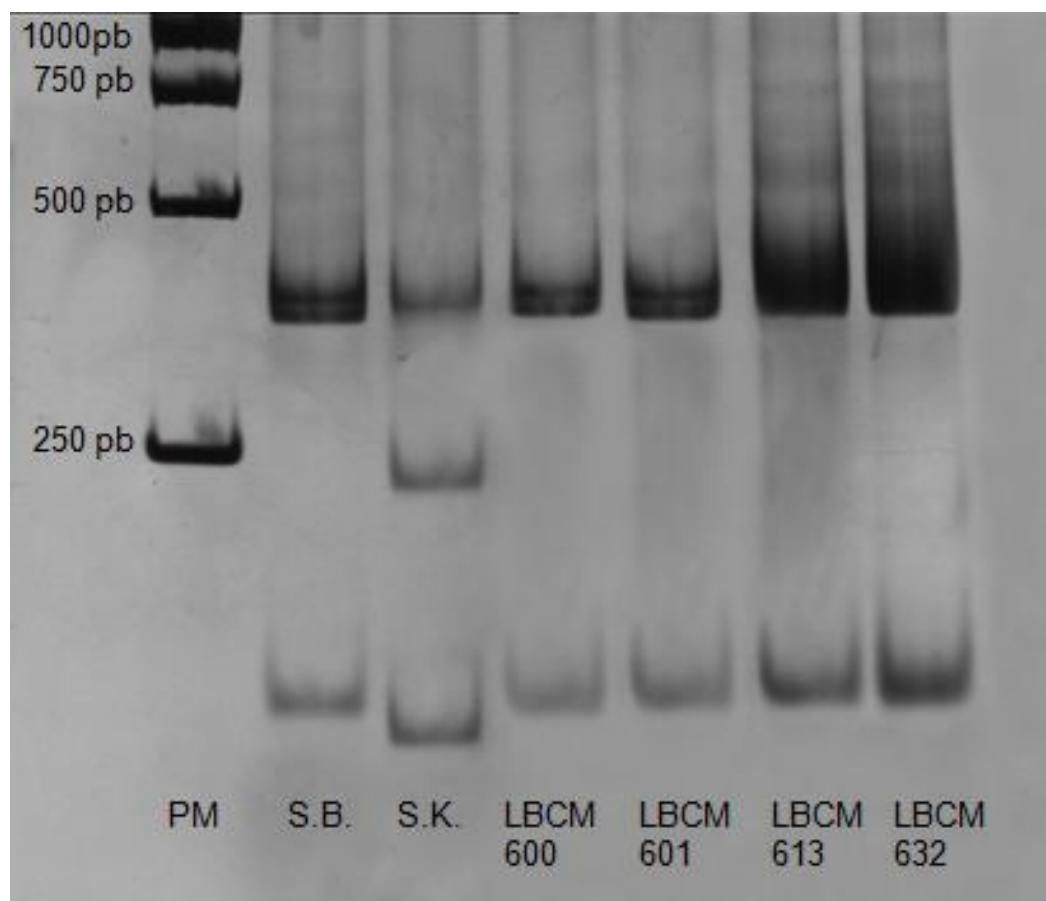


Figura 11 - Gel de poliacrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima HinfI. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

(1995), o polimorfismo detectado por esta técnica é de natureza binária, ou seja, um determinado fragmento ou banda está presente ou ausente no gel, e desta maneira as setas na figura indicam as bandas características e exclusivas de cada cepa analisada (Figura 12).

4.2.2 Método de Diferenciação por COX-PCR

Outra técnica utilizada com o intuito de verificar e confirmar o polimorfismo dentre as cepas estudadas foi a COX-PCR. Esta técnica é baseada na variação do número e posição dos introns no gene mitocondrial *COXI*. Esta variação tem sido observada tanto entre cepas de mesma espécie quanto em cepas de espécies diferentes, configurando-se assim como ferramenta útil na diferenciação de cepas de *S. cerevisiae*. A técnica consiste em uma reação de PCR multiplex com quatro primers, previamente utilizados na análise do polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais usadas na fermentação do vinho (Lopez e cols., 2003). O DNA mitocondrial das 4 cepas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 e LBCM 632 foi amplificado usando os primers 3L, 3R, 4L e 5R. O resultado da amplificação pode ser visualizado na Figura 13. Apesar de existir grandes evidências quanto ao polimorfismo para a região COX1 em leveduras, apenas duas das quatro cepas analisadas apresentaram uma clara distinção quanto à presença de fragmentos peculiares que permitissem a diferenciação frente a outras cepas. A cepa 600 apresentou uma banda exclusiva em torno de 500pb, assim como a cepa 601 apresentou um perfil de bandamento com três bandas exclusivas em torno de 320pb e 650pb, conforme demonstrado pelas setas.

4.2.3 Diferenciação por Microssatélites

Para a identificação dos microssatélites foram utilizados seis diferentes pares de primers seguindo a metodologia descrita por Pérez e cols; (2001). Como demonstrado na Tabela 5, diferentes polimorfismos foram encontrados dentre as quatro cepas selvagens isoladas.

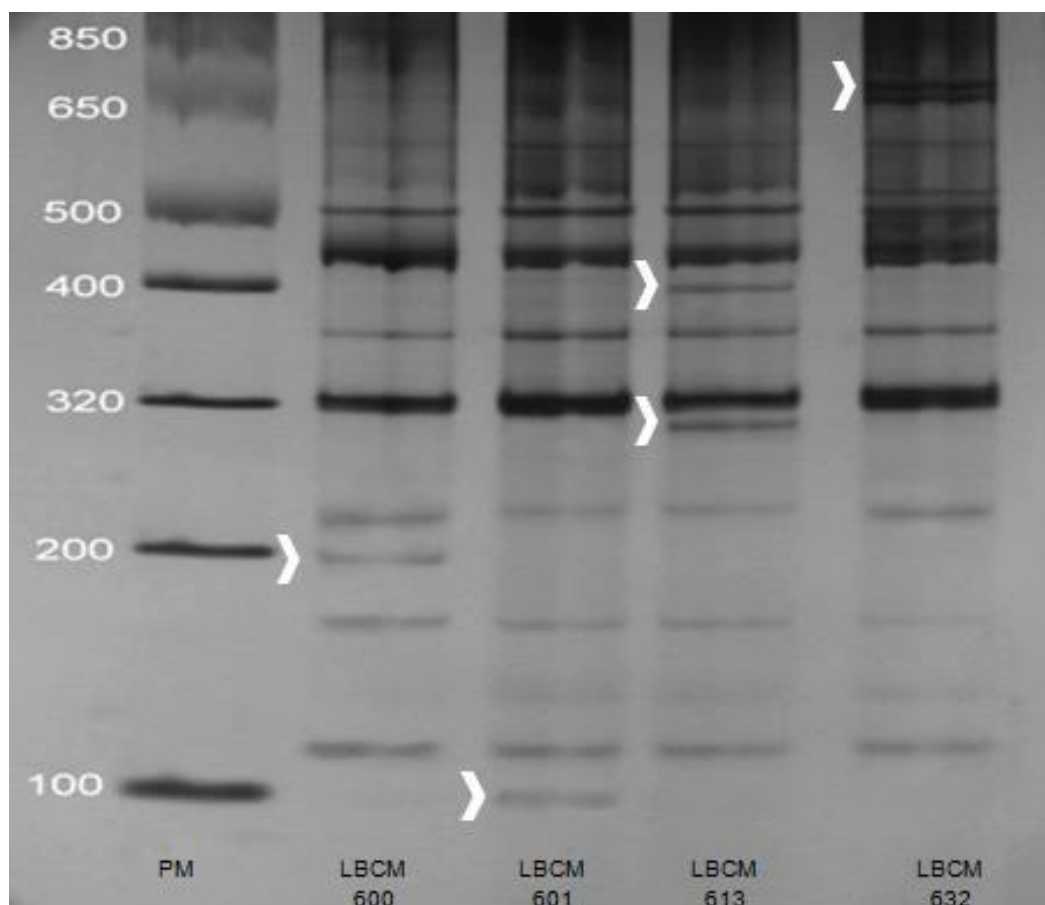


Figura 12 - Perfil de RAPD-PCR das cepas de leveduras isoladas de diferentes destilarias artesanais de cachaça. Os primers EI1 e LA1 permitiram a distinção entre as cepas conforme indicado pelas setas. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

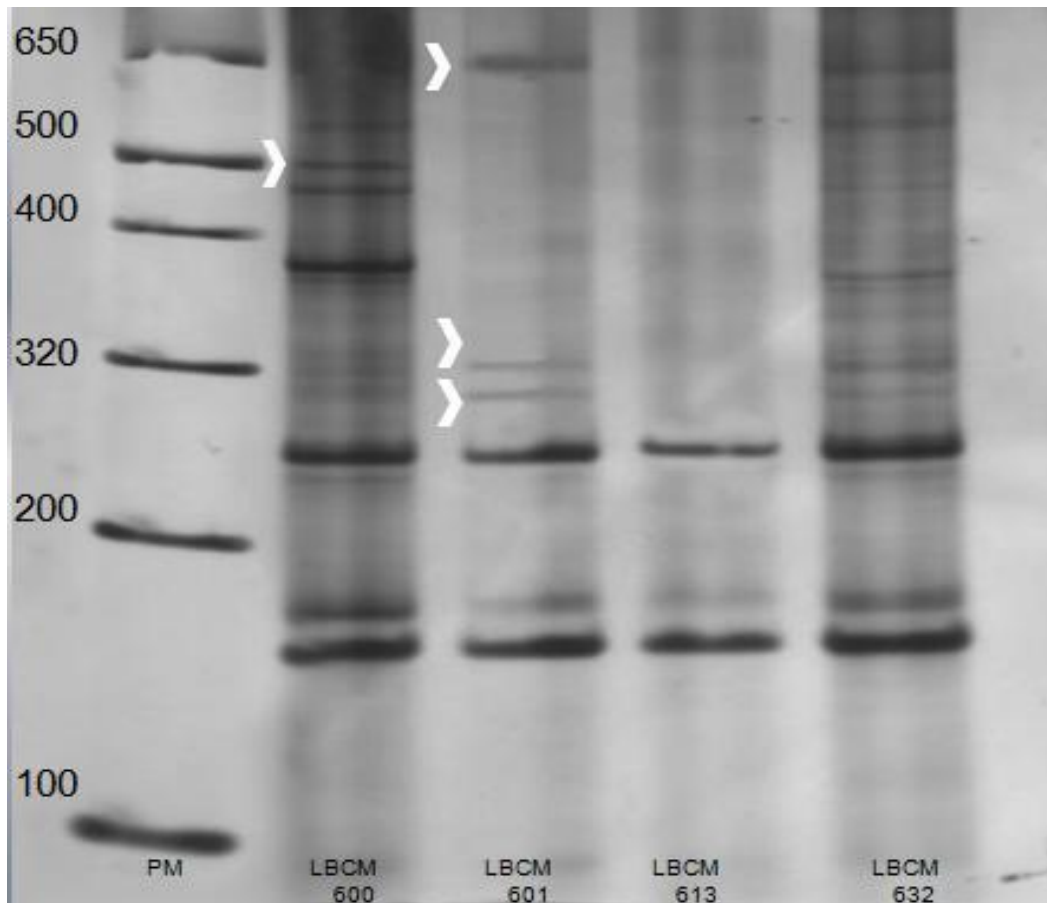


Figura 13 - Perfil de COX-PCR após amplificação com os primers 3L, 3R, 4L e 5R das quatro cepas analisadas. As setas indicam as bandas características que diferenciam cada cepa. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

Cepa	ScAAT1	ScAAT2	ScAAT3	ScAAT4	ScAAT5	ScAAT6
	Alelo	Alelo	Alelo	Alelo	Alelo	Alelo
<i>S. boulardii</i>	174-201	366	250	308-332	225	258
LBCM 600	195-198	354-372	283-286	332	225	258
LBCM 601	192	360	250	308	225	258
LBCM 613	189	360	250	308-332	225	258
LBCM 632	189-192	375-378	250-268	296-332	225	258

Tabela 5 - Diversidade alélica de quatro cepas selvagens isoladas comparadas a uma cepa de laboratório *Saccharomyces boulardii*.

Grande variação de alelos foi encontrada dentre as quatro cepas, exceto para o locus ScAAt6, onde nenhum polimorfismo foi caracterizado. Os locus ScAAT1 e ScAAT3 têm sido descritos como os que apresentam o maior grau polimórfico (Pérez e cols; 2001; Schuller e cols; 2004). Nossos resultados confirmam esta observação da literatura uma vez que as cepas apresentaram diferentes perfis para o locus ScAAT1, e um perfil heterozigótico nas cepas 600 e 632, para o locus ScAAT3. Além disto, a análise dos locus ScAAT2 e ScAAT4 permitiram também a distinção de cepas. Esta distinção entre as cepas é provável resultado da origem geográfica distinta de cada cepa, e não de um processo de esporulação já que existe uma hipótese de que o processo de esporulação não ocorra no mosto durante a fermentação (Puig e cols; 2000). No presente estudo foram identificados três novos alelos sendo eles o alelo 354 do locus ScAAT2, alelos 283 e 286 do locus ScAAT3 e por fim o alelo 296 do locus ScAAT4.

4.3 – Determinações de alcoóis superiores e ésteres

Compostos aromáticos desempenham importante papel no aroma e sabor de bebidas alcoólicas derivadas de fermentações desempenhadas por leveduras e contribuem assim sendo para a aceitação ou não do produto pelo mercado consumidor. Desta forma, as quatro cepas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 e LBCM 632 foram avaliadas quanto a possíveis diferenças de produção de n-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico, assim como a produção dos ésteres acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila. Além destas cepas citadas, duas outras cepas foram utilizadas como controle: LBCM 422 (sensível a TFL e cerulenina) e LBCM 427 (resistente a TFL e cerulenina). Estes compostos foram extraídos do meio de cultura conforme descrito no item 3.3.2, em Materiais e Métodos. Conforme observado, todas as cepas incluindo as cepas utilizadas como controle apresentaram uma mesma cinética de formação, assim como uma quantidade muito similar na produção de N-propanol. (Figura 14). Comportamento similar de produção equivalente entre as cepas foi também observado para o álcool isobutílico (Figura 15). A produção de álcool isoamílico apresentou cinética e quantidades finais diferentes dentre as cepas usadas como controle LBCM 422 e LBCM 427, além de uma cepa selvagem LBCM 600 em destaque devido à maior produção deste

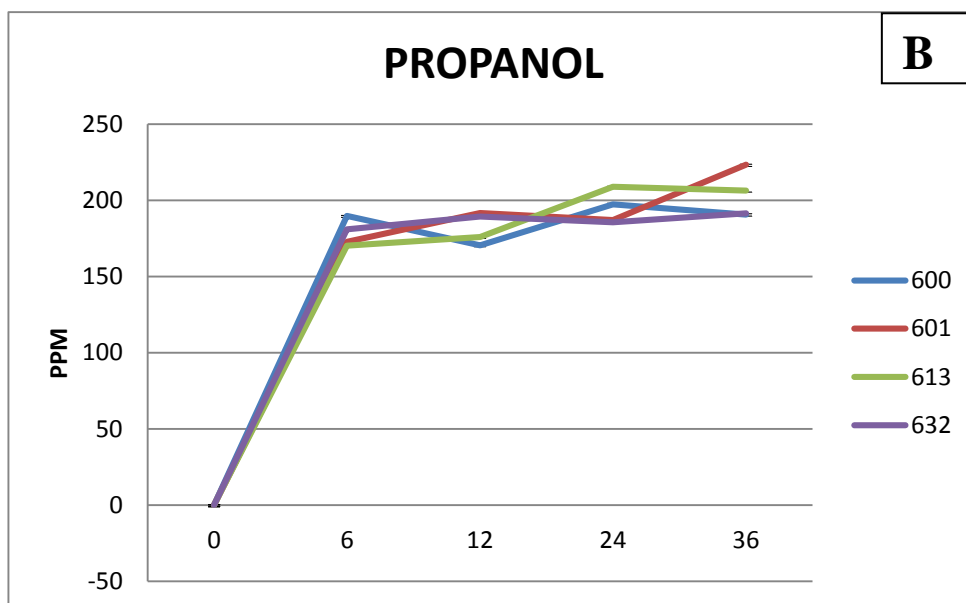
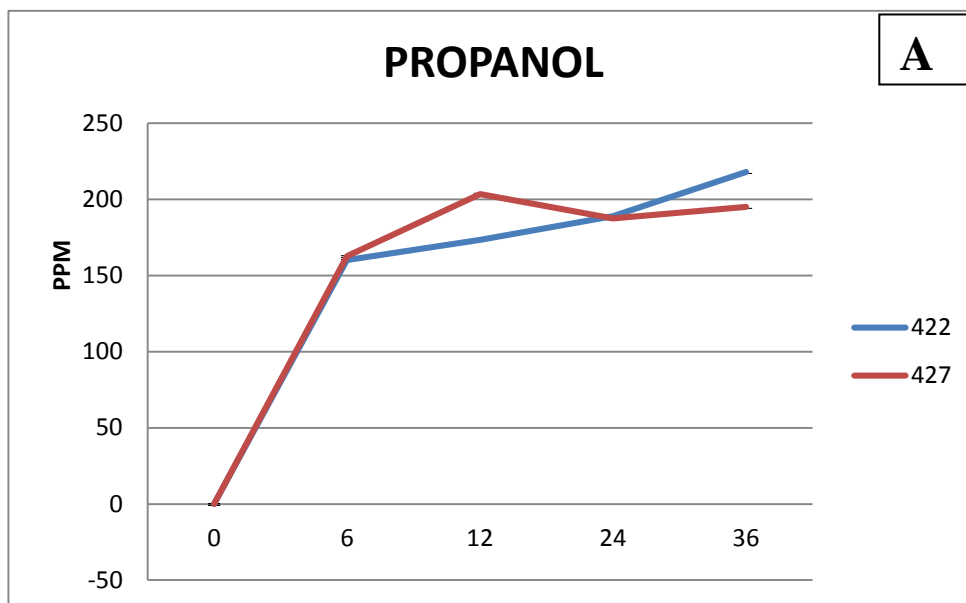


Figura 14: Cinética de formação de n-propanol. As cepas foram inoculadas em meio YNB sem sulfato de amônio contendo 8% de sacarose e coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas. **A-** Cepas controle LBCM 422 e LBCM 427. **B-** Cepas selvagens selecionadas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613, LBCM632.

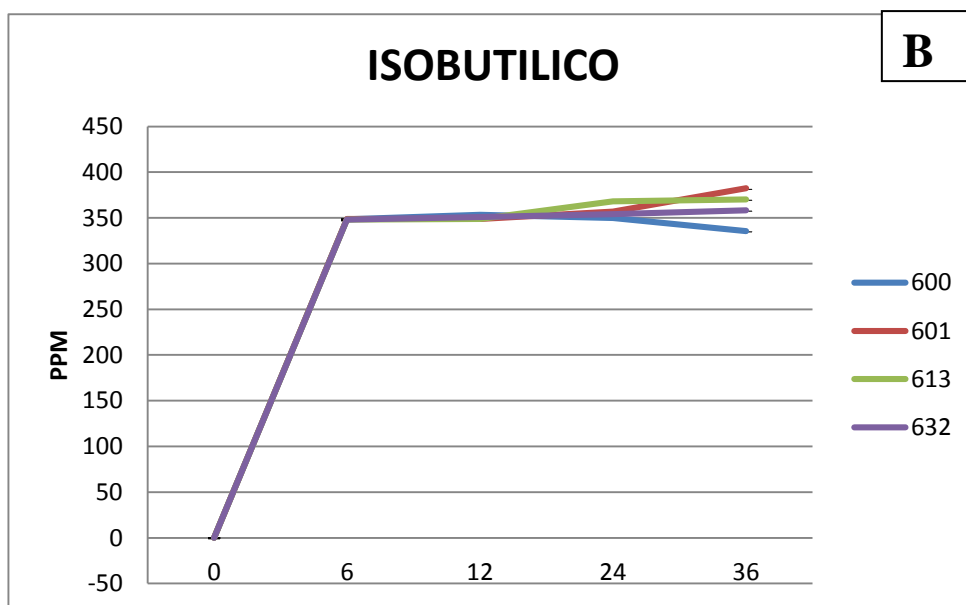
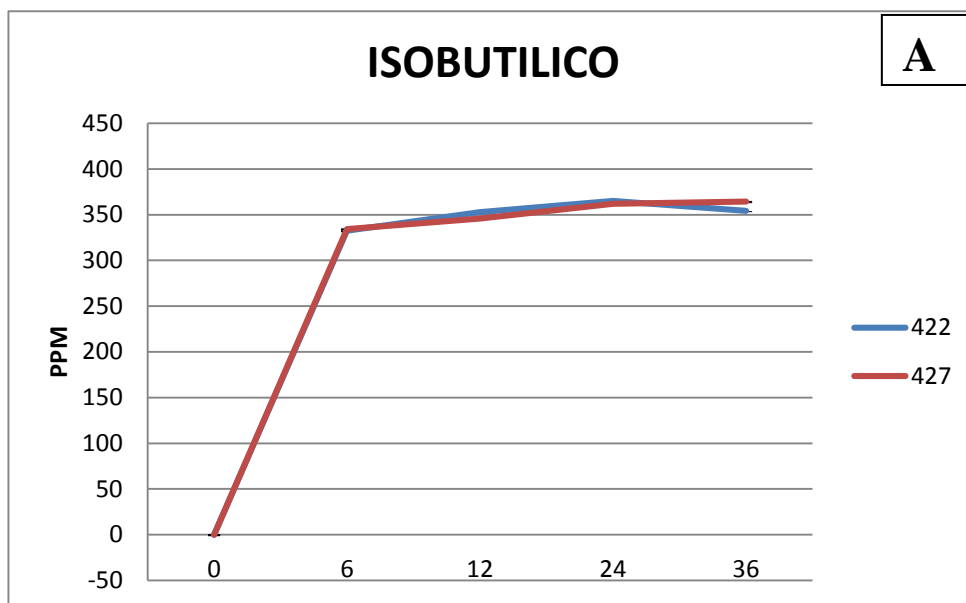


Figura 15: Cinética de formação de álcool isobutílico. As cepas foram inoculadas em meio YNB sem sulfato de amônio contendo 8% de sacarose e coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas. **A-** Cepas controle LBCM 422 e LBCM 427. **B-** Cepas selvagens selecionadas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613, LBCM632.

composto em relação às outras cepas utilizadas (Figura 16). Ésteres voláteis são responsáveis pelo aroma frutado de bebidas fermentadas e conseqüentemente constituem um grupo vital de compostos aromáticos desejáveis em cervejas e vinhos. Desta forma o primeiro éster analisado foi o octanoato de etila, com uma diferença superior ao final da fermentação, de aproximadamente 1500 µg/L da cepa LBCM 427 em comparação com a LBCM 422. Dentre as outras cepas utilizadas, houve uma grande diferença na quantidade final deste composto, assim como à cinética de formação (Figura 17). O éster decanoato de etila assim como o octanoato de etila seguiu uma cinética de formação e quantidade final maior para a cepa LBCM 427 quando comparada à cepa LBCM 422, com uma diferença final de aproximadamente 400 µg/L ao final da fermentação. Com exceção da cepa LBCM 632 que apresentou valor final aproximadamente similar ao da cepa LBCM 422, todas as outras apresentaram valores acima de 600 µg/L(Figura 18).

4.4 Quantificação da expressão de genes de leveduras envolvidos na produção de substâncias aromatizantes

Neste trabalho, duas cepas LBCM 422 e LBCM 427 respectivamente sensível e resistente a cerulenina e 5, 5, 5' -trifluoro - DL - Leucina (TFL) tiveram os genes *ATF2*, *EEB*, *BAP2*, *ADH*, *BAT1*, *BAT2* e *RDN18* analisados quanto a modificações na expressão gênica. Os dados da expressão relativa dos genes estão apresentados na Figura 19.

O gene endógeno *RDN18* foi utilizado como normalizador. O que se pode observar na análise dos gráficos é que apesar das cepas LBCM 422 e LBCM 427 representarem uma mesma espécie, elas nem sempre apresentaram comportamento semelhante de expressão, em resposta à mesma condição testada.

Para o gene *ATF2*, envolvido na síntese de ésteres de acetato, o que pode ser observado foi uma prevalência da expressão aumentada deste gene na cepa LBCM 427, quando comparada à cepa LBCM422 em todos os quatro tempos distintos analisados, além de uma expressão acentuada no tempo de seis horas de fermentação no uso desta cepa. Já a expressão do gene *EEB* envolvido na síntese de ésteres de etila mostrou expressão aumentada por parte da levedura LBCM 422 com destaque ao tempo de trinta e seis horas, e uma uniformidade de expressão mais baixa por parte da levedura LBCM 427.

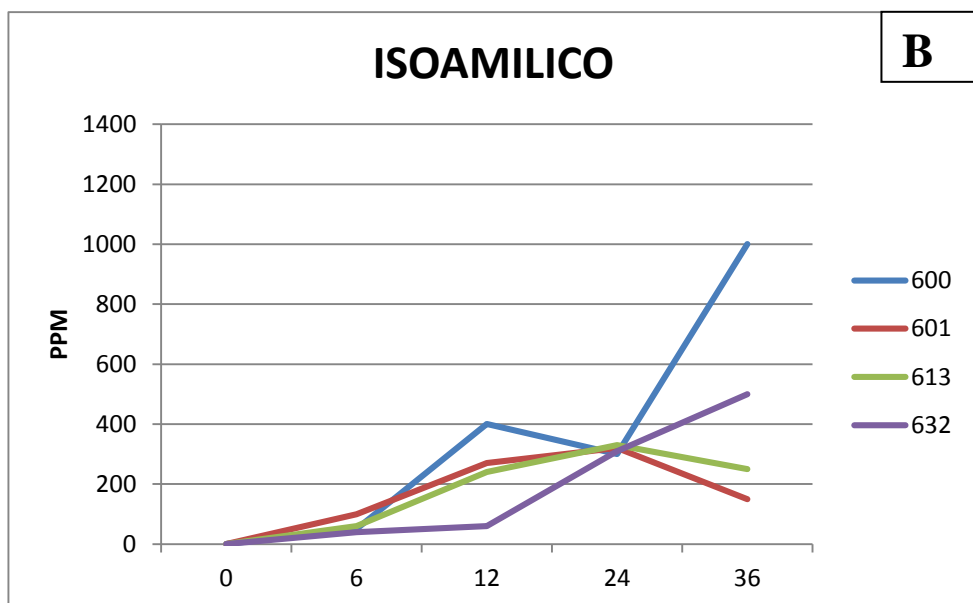
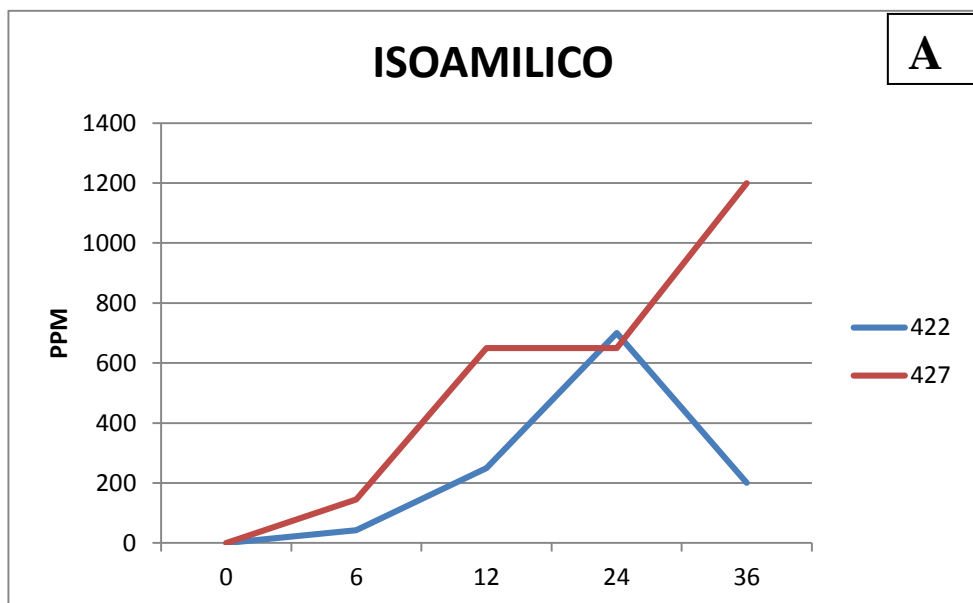


Figura 16: Cinética de formação de álcool isoamílico. As cepas foram inoculadas em meio YNB sem sulfato de amônio contendo 8% de sacarose e coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas. **A-** Cepas controle LBCM 422 e LBCM 427. **B-** Cepas selvagens selecionadas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613, LBCM632.

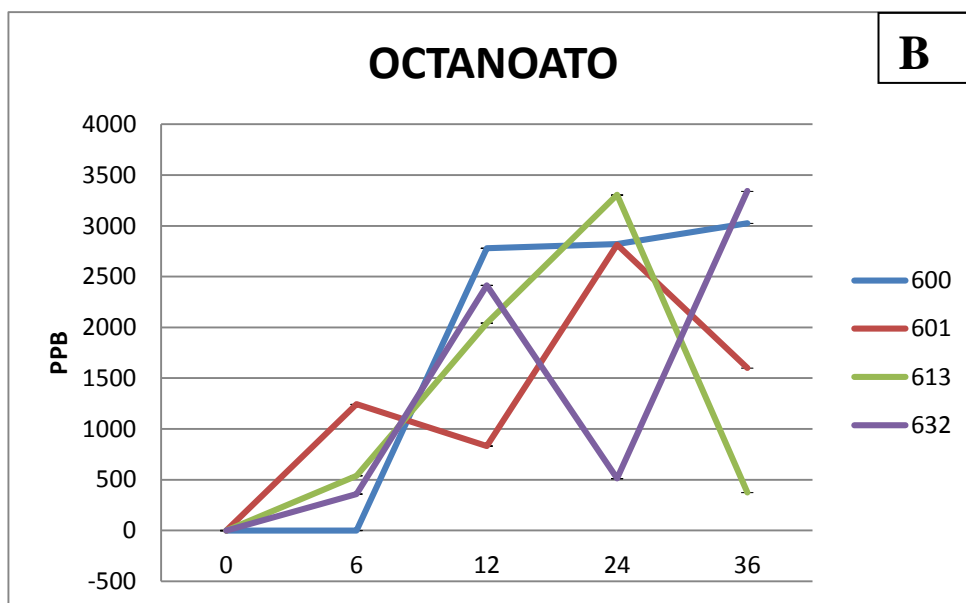
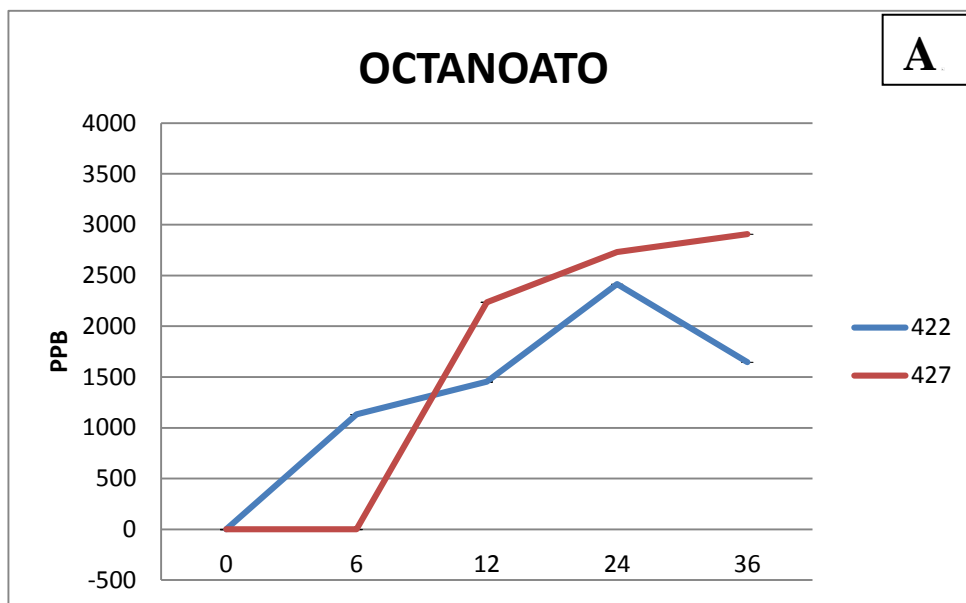


Figura 17: Cinética de formação do éster octanoato de etila. As cepas foram inoculadas em meio YNB sem sulfato de amônio contendo 8% de sacarose e coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas. **A-** Cepas controle LBCM 422 e LBCM 427. **B-** Cepas selvagens selecionadas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613, LBCM632.

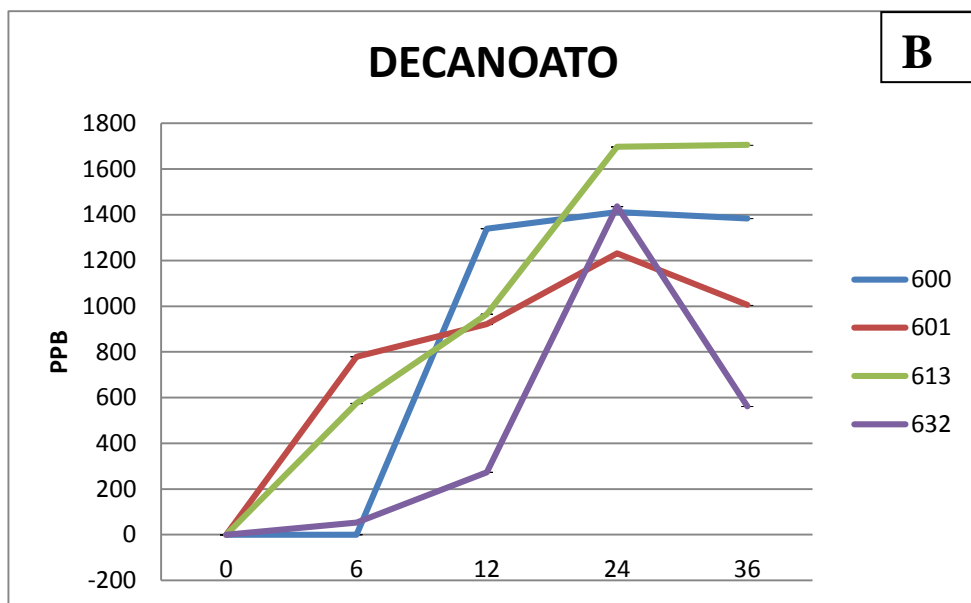
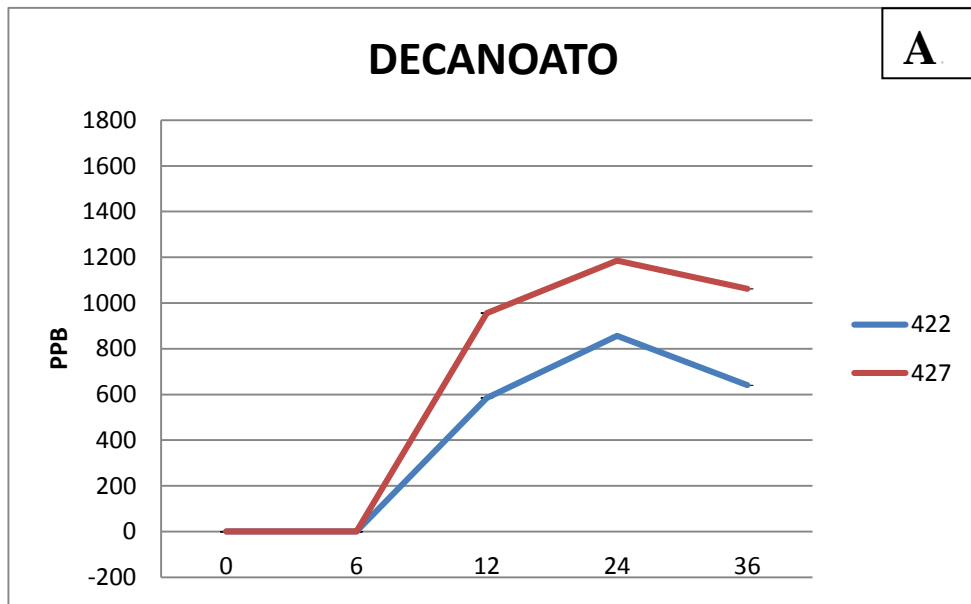


Figura 18: Cinética de formação do éster decanoato de etila. As cepas foram inoculadas em meio YNB sem sulfato de amônio contendo 8% de sacarose e coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas. **A-** Cepas controle LBCM 422 e LBCM 427. **B-** Cepas selvagens selecionadas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613, LBCM632.

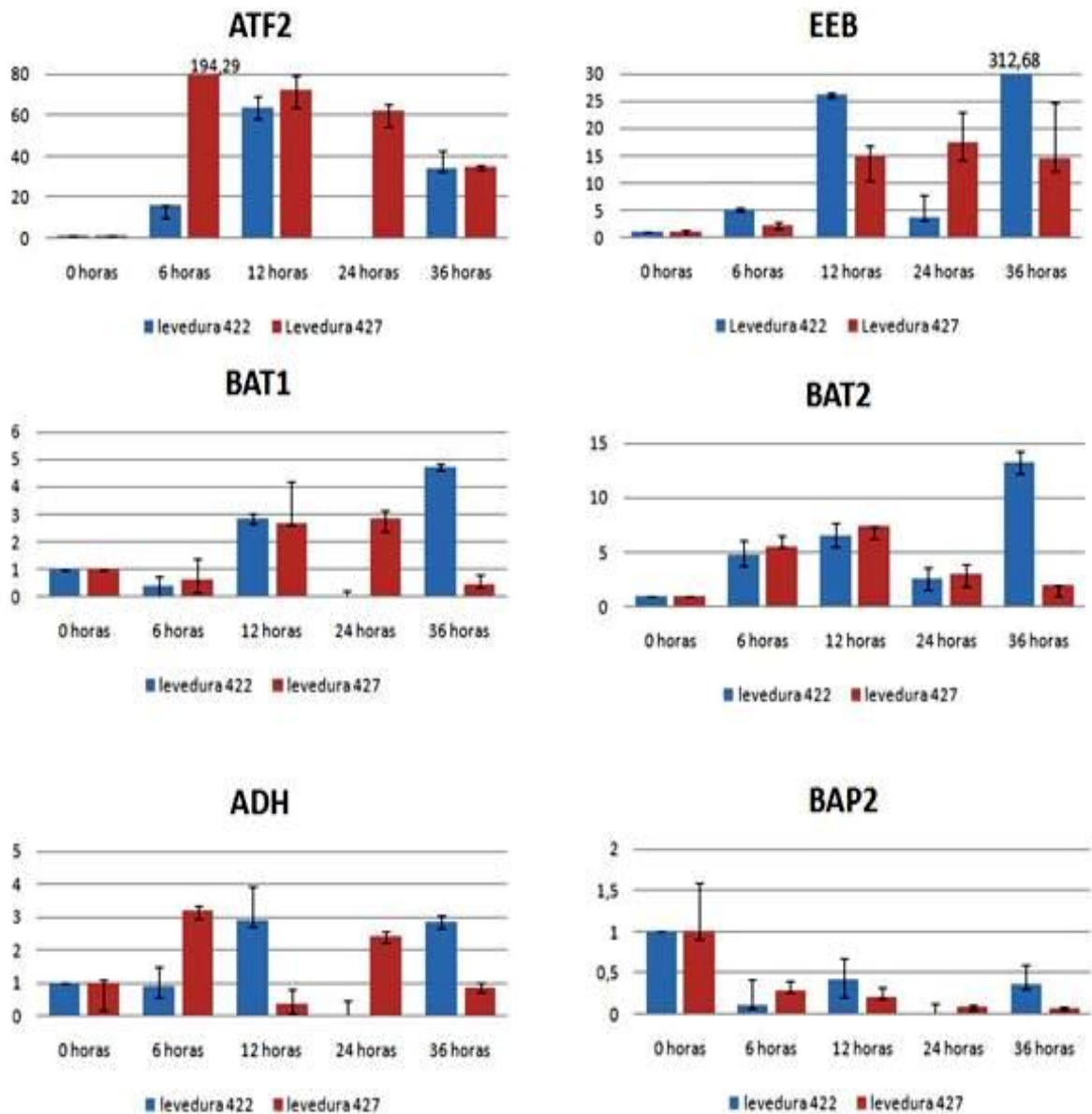


Figura 19 - Expressão relativa de genes das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 422 e LBCM 427 quando submetidas às mesmas condições de fermentação ao longo de diferentes tempos.

Resultado semelhante pode ser observado na análise da expressão dos genes *BAT1* e *BAT2*, envolvidos na síntese de álcoois superiores, onde a expressão aumentada deste gene na cepa LBCM 422 pode ser observada quando em comparação à expressão destes genes na cepa LBCM 427. A expressão gênica de *ADH*, envolvido na síntese de etanol evidenciou uma alternância entre as duas cepas analisadas, com momentos de maior expressão por parte da cepa LBCM 422, como mostrado no tempo de trinta e seis horas e uma expressão aumentada deste gene na cepa LBCM 427 no tempo de seis horas. Apesar desta alternância dos tempos, os valores máximos relativos de expressão foram os mesmos para as duas cepas. Por fim a expressão do gene *BAP2* apresentou um decréscimo ao longo de todo o processo fermentativo para as duas cepas em análise.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, existem atualmente cerca de 30 mil produtores de cachaça no país, com uma produção anual de cerca de 1,4 bilhões de litros/ano, sendo que deste total 70% é representado pela cachaça industrial (980 milhões de litros) e 30% pela cachaça de alambique. Segundo a ABRABE, apesar do estado de Minas Gerais ocupar o quarto lugar na produção nacional de cachaça, o mesmo segue líder na produção de cachaça artesanal com produção estimada de 230 milhões de litros, e participação de cerca de 50% do total. A “cachaça de alambique de Minas” possui muitos aspectos a serem discutidos e elucidados na busca de um produto de reconhecida qualidade. Este é um produto que proporciona aos produtores a oportunidade de disputar o mercado com outras bebidas destiladas como o rum, whisky e vodka, o que vem sendo ampliado pela padronização do produto (SEBRAE, 2002).

O mercado de cachaça de alambique conta atualmente com 600 marcas mineiras produzidas e registradas no Ministério da Agricultura, além de 8500 alambiques espalhados pelo estado, o que garante ao mesmo uma alta representatividade não apenas em volume, mas também quanto à tradição e alta qualidade dos produtos. Esta credibilidade favorece a elaboração de projetos nacionais fundamentados em estatísticas locais e regionais do estado de Minas Gerais. Por diversas razões históricas e culturais, por séculos a produção mineira de cachaça segue métodos tradicionais de fabricação que envolve diversas etapas importantes, dentre as quais a moagem, filtragem, fermentação, destilação, armazenamento, envelhecimento, envase e rotulagem do produto final. Em cada uma destas etapas existem pontos críticos que podem ser fundamentais para um produto final de maior qualidade. Analisando estas etapas envolvidas podem-se destacar aquelas de maior impacto para os produtores de cachaça artesanal (SEBRAE, 2008).

Uma das mais importantes etapas na produção de cachaça de alambique é justamente a etapa de fermentação do caldo de cana por uma diversidade de leveduras com predomínio da espécie *S. cerevisiae*. Uma vez que este é um processo realizado em sua grande maioria em ambiente aberto e sem esterilização prévia do caldo de cana a população de leveduras presente no processo fermentativo se encontra em constante mudança devido à introdução de novas cepas provenientes do caldo (Morais e cols., 1997; Pataro e cols.,

1998). Apesar do tempo de envelhecimento, do processo de destilação, do tipo de madeira utilizada no armazenamento e outros aspectos influenciarem na qualidade de uma bebida destilada, é durante a fermentação que ocorre a produção pelas leveduras dos compostos aromatizantes que concomitantemente caracterizam uma bebida destilada. Por esta razão, durante a produção de cachaça de alambique, especialmente a etapa de fermentação deve ser controlada com o propósito de se conhecer e controlar os agentes fermentadores ao longo da produção.

A utilização de inóculo inicial de cepas selecionadas com características próprias à produção de uma cachaça de melhor qualidade é uma solução no controle das leveduras, além de reduzir as variações de propriedades sensoriais da bebida de uma safra para outra. Entretanto, o simples inóculo de cepas de leveduras selecionadas não é garantia da permanência das mesmas ao longo de todo processo fermentativo, devendo ser acompanhada sua dinâmica no decorrer da etapa de fermentação (Cardello e Faria., 1998; Oliveira e cols., 2004; Oliveira e cols., 2005; Querol e cols., 1994). O inóculo próprio à produção de cachaça de alambique deve ser oriundo da seleção de cepas de leveduras com melhores capacidades de adaptação às condições encontradas durante o processo fermentativo do caldo de cana tais 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 são da mesma forma desejáveis características.

Objetivando esta seleção, nosso laboratório desenvolveu uma metodologia para o isolamento de cepas de *S.cerevisiae* para serem usadas na produção da cachaça (Vicente e cols., 2006). Este protocolo visou isolar cepas de *S. cerevisiae* melhor adaptadas ao processo fermentativo e em especial selecionar cepas resistentes a TFL e cerulenina, compostos estes descritos como capazes de selecionar leveduras respectivamente com maior capacidade de produção de substâncias tais como o álcool isoamílico e ácido caprótico e conseqüentemente com maior capacidade de produção de componentes aromatizantes.

No presente trabalho quatro cepas isoladas de acordo com o protocolo anteriormente mencionado oriundas das regiões norte, sudeste, e centro-oeste de Minas, além de uma cepa do estado do Rio de Janeiro, foram analisadas por pertencerem a regiões

famosas pela qualidade da cachaça produzida, porém com características distintas em seu sabor e aroma. A primeira etapa do presente trabalho envolveu então a identificação e caracterização molecular das cepas, para confirmar a real distinção entre as cepas a serem utilizadas. Tais técnicas que permitam a distinção entre o inóculo de uma determinada cepa e a microbiota normalmente encontrada no processo fermentativo são de grande interesse para a indústria de bebidas, e assim, algumas metodologias baseadas no polimorfismo do DNA têm sido desenvolvidas para a prática de diferenciação entre leveduras de interesse e outras que possam estar presentes no processo.

Alguns estudos indicam que cepas de *S. cerevisiae* presentes no processo fermentativo da cachaça e outras bebidas apresentam alto grau de polimorfismo entre diferentes destilarias, além de uma sucessão de cepas geneticamente diferentes durante a produção de cachaça, com alta variabilidade de cepas isoladas em diferentes estágios da fermentação (Guerra e cols., 2001; Pataro e cols., 2000; Schuller e cols., 2004). Alguns autores utilizam o produto de amplificação da região de ITS para diferenciar isolados do grupo *Saccharomyces sensu stricto* de outras espécies *Saccharomyces* (Valente e cols., 1996). Desta maneira, a primeira técnica molecular utilizada com o intuito de caracterizar as cepas quanto a pertencentes ou não à espécie *S. cerevisiae* foi baseada na amplificação da região ITS (internal transcribed space) do DNAr das quatro cepas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 e LBCM 632. Conforme podemos observar, as amplificações foram compatíveis com o que é descrito para a espécie *S. cerevisiae* (Figura 8). A região amplificada do rDNA pelos primers ITS1 e ITS4 mostra baixa variabilidade intra-espécie e alto polimorfismo inter-espécie, o que justificou seu uso na tentativa de identificação da espécie das cepas de leveduras. A confirmação das cepas pertencentes à mesma espécie se deu com a digestão dos produtos de amplificação da região ITS com as endonucleases de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* (Figuras 9, 10, 11). O resultado deixa claro que as cepas em análise pertencem à mesma espécie, já que apresentaram os mesmos perfis de digestão entre si, com o uso de diferentes endonucleases de restrição, além do perfil diferente quando comparado à cepa utilizada como controle negativo. Apesar de as quatro cepas terem sido previamente isoladas por métodos bioquímicos de identificação, verificamos que apenas com técnicas de biologia molecular, é possível identificar as cepas quanto à

espécie, o que se torna vantajoso por ser considerada uma técnica rápida, reproduzível, e relativamente barata (Heras-Vasquez e cols., 2002).

O advento do uso de cepas selecionadas na produção de bebidas destiladas tornou necessária a obtenção e utilização de técnicas moleculares que auxiliassem na caracterização e diferenciação das cepas utilizadas no processo fermentativo para obtenção da cachaça. De acordo com Pataro e cols; (2000) existe um grande polimorfismo molecular dentre as cepas de leveduras que participam do processo fermentativo, e por esta razão conforme exposto em seguida, diversas técnicas moleculares foram utilizadas com o intuito de diferenciar as quatro cepas já reconhecidas como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*. Por se tratar de uma técnica que utiliza primers de seqüência arbitrária a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada (Nason e cols; 1997). De início então, esta técnica foi realizada com utilização dos primers EI1 e LA1, para diferenciação das cepas de leveduras. Estes iniciadores foram utilizados por De Barros Lopes e cols; (1996), que detectaram grande polimorfismo nas cepas de vinho analisadas, demonstrando ser um método eficiente na detecção de leveduras tanto *S. cerevisiae* quanto não *Saccharomyces*. Em nossos resultados, conforme observado na Figura 12, o perfil de bandas gerado pelas quatro cepas LBCM 600, LBCM 6001, LBCM 613 e LBCM 632, foi semelhante, entretanto a presença de bandas exclusivas em cada uma das quatro cepas em análise permitiu uma diferenciação entre as cepas utilizadas, não sendo talvez mais conclusivo devido ao fato de que a variabilidade obtida com a análise por RAPD-PCR depende dos iniciadores utilizados (Perez e cols., 2001). Os resultados obtidos utilizando RAPD-PCR com os primers EI1 e LA1 sugerem ser esta técnica eficiente na diferenciação de cepas de leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto*, e na distinção de cepas muito próximas de mesma espécie.

Outra técnica fundamentada na reação de PCR, e conseqüentemente uma técnica rápida, eficiente e de baixo custo, utilizada com o intuito de diferenciar e caracterizar as quatro cepas utilizadas foi a COX-PCR. Esta técnica baseia-se no uso de quatro primers para amplificação do gene mitocondrial *COXI* e se mostrou efetiva na análise de polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais, e na monitoração da fermentação do vinho quando utilizadas cepas selecionadas como inóculo (Lopez e cols., 2003). Como se

pode observar na Figura 13, com esta técnica não foi possível diferenciar as cepas LBCM 613 e LBCM 632 entre si e das demais. Das duas cepas restantes a serem analisadas, a cepa LBCM 600 foi a que apresentou uma maior diferenciação com duas bandas exclusivas em torno de 250-500pb, seguida da cepa LBCM 601 com um perfil apresentando apenas uma banda exclusiva em torno de 400pb. Apesar de ser possível observar determinado polimorfismo entre as cepas, este resultado por si só não é confiável, uma vez que não há uma diferenciação clara, podendo induzir a falsos resultados.

Após esta triagem molecular realizada com estas quatro cepas e a não conclusão quanto ao polimorfismo dentre as quatro cepas, seis loci de microssatélites descritos como ScAAT1, ScAAT2, ScAAT3, ScAAT4, ScAAT5 e ScAAT6 (Perez e cols., 2001) foram amplificados e analisados, como descrito em materiais e métodos (Schuller e cols., 2004). A distribuição total e específica para os seis loci esta demonstrada na Tabela 5. Apesar da indicação dos lócus ScAAT1 e ScAAT3 como os que apresentam maior grau polimórfico (Pérez e cols., 2001b; Schuller e cols., 2004), os marcadores ScAAT1 e ScAAT2 foram os marcadores com maior polimorfismo, apresentando respectivamente 6 e 5 alelos. Além dos 41 alelos (51 cepas) previamente descritos para ScAAT1-ScAAT6 (Pérez e cols., 2001), quatro novos alelos foram identificados no presente estudo utilizando 4 cepas (354, 283, 286, e 296 pb). A maior parte dos alelos está distribuída entre as cepas LBCM 600 e LBCM 632. As cepas LBCM 601 e LBCM 613 compartilham os alelos mais frequentes para os marcadores ScAAT2, ScAAT3 ScAAT4 ScAAT5 e ScAAT6 (360, 250, 308, 225 e 258 pb respectivamente). Alelos distintos e únicos foram identificados em quatro dos seis marcadores analisados (ScAAT1, ScAAT2 ScAAT3 e ScAAT4), dentre duas das quatro cepas estudadas (LBCM 600 e LBCM 632). Uma situação peculiar está na presença de dois alelos comuns a todas as cepas para os lócus ScAAT5 e ScAAT6 (225 e 258 pb respectivamente). Considerável diferença entre as cepas foi também evidenciada pelo grau heterozigótico apresentado pelas cepas LBCM 600, LBCM 613 e LBCM 632. Grande variação de alelos foi encontrado dentre as quatro cepas, exceto para o lócus ScAAT6, onde nenhum polimorfismo foi caracterizado. O aparecimento de alelos raros e de um baixo nível de homozigotos aponta para a existência de sub-populações isoladas de cepas de leveduras com constituição genética distinta.

Os resultados obtidos até esta etapa do trabalho foram suficientes para caracterização molecular das cepas, porém ainda não elucidavam qual a real capacidade de cepas isoladas e selecionadas pela mesma metodologia em produzir compostos aromáticos. Os álcoois superiores e ésteres são compostos presentes na cachaça, e que se incorporam ao aroma e também ao sabor da bebida. Esses compostos normalmente estão presentes em quantidades pequenas, mas o suficiente para oferecer características próprias à bebida (Boscolo e cols., 2000; Nonato e cols., 2001; Oliveira e cols., 2005).

Desta forma, após padronizar condições de fermentação em escala laboratorial, as cepas LBCM 600, LBCM 601, LBCM 613 e LBCM 632 foram utilizadas para avaliação dos compostos produzidos durante a fermentação, além das cepas LBCM 422 e LBCM 427 já mencionadas como cepas respectivamente sensíveis e resistentes às drogas cerulenina e TFL. Desta forma um dos objetivos deste trabalho foi verificar se cepas isoladas resistentes a TFL e cerulenina iriam produzir maiores quantidades de álcoois superiores e ésteres quando comparadas à cepa isolada pela mesma metodologia, porém sensível a estas duas drogas. Os compostos analisados foram os álcoois isoamílico e isobutílico, n-propanol, octanoato de etila e decanoato de etila através de cromatografia gasosa acoplada a detector de massas.

No que diz respeito à produção de álcoois superiores, e conforme pode ser observado nas Figuras 14 e 15, os valores respectivos de n-propanol e álcool isobutílico foram idênticos dentre todas as cepas estudadas. Diferença significativa foi observada na quantificação do álcool isoamílico (Figura 16), especialmente quando comparadas as cepas LBCM 422 e LBCM 427, sendo que esta última apresentou quantidades maiores quando comparada à cepa LBCM 422. Além da cepa LBCM 427 a cepa LBCM 600 também se destacou na produção deste composto. As outras cepas analisadas não apresentaram nenhum padrão de produção deste composto em destaque. Este resultado era esperado devido ao fato da cepa LBCM 427 ser uma cepa resistente a TFL e conseqüentemente apresentar maior resistência a retro-inibição da enzima α -IPM por L-leucina, tendo como conseqüência uma maior produção do álcool isoamílico (Ashida e cols., 1987; Casalone e cols., 1997; Yoshizawa, 1999). A síntese de álcool isoamílico pode ser realizada a partir do α -cetoisocaproato, este um precursor na via de síntese de L-leucina a partir de glicose, ou por redução de α -cetoácidos (via de Ehrlich). A α -IPM sintase é a enzima chave no

controle desta via biossintética. Estudos indicam que a adição de elevadas concentrações de aminoácidos leva ao respectivo aumento da produção de álcool superior, entretanto ocorre também o aumento de outros álcoois, indicando haver uma maior complexidade de interação metabólica (Kodama e cols., 2001; Lilly e cols., 2006; Yoshimoto e cols., 2002). A síntese de álcool isobutílico é um exemplo de composto que pode ser realizada a partir do α -cetoisovalerato, um precursor da via biossintética da valina. O α -cetoisovalerato é convertido pelas enzimas α -IPM sintase, α -IPM isomerase, e β -IPM desidrogenase em α -cetoisocaproato que é convertido em L-leucina ou álcool isoamílico.

Outro aspecto a ser considerado é a expressão dos genes *BAT1* e *BAT2* que codificam para a transaminação de α -cetoácidos, na mitocôndria e citossol respectivamente, sendo este o primeiro passo na via de Ehrlich. A expressão constitutiva do gene *BAP2* resulta no aumento da produção de álcool isoamílico, porém não afeta os níveis de produção de álcool isobutílico (Kodama e cols, 2001). A expressão do gene *BAP2* em nossos experimentos foi muito diminuída conforme verificado na Figura 19, o que sugere que a participação deste gene não é fator determinante na produção de álcool isoamílico. 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. Confrontando nossos dados obtidos na quantificação de álcool isoamílico com a expressão do gene *BAT1*, não fica claro a relação de uma maior expressão deste gene com a produção direta de álcool isoamílico, já que a expressão deste gene nas duas cepas LBCM 422 e LBCM 427 se mantiveram praticamente idênticas ao longo do processo fermentativo, exceto no tempo de trinta e seis horas, onde a cepa LBCM 422 que produziu menor quantidade deste composto apresentou expressão gênica de *BAT1*, maior que a da cepa LBCM 427.

Alguns estudos indicam que a superexpressão de *BAT2* em leveduras resultou em aumento da assimilação de leucina, isoleucina e valina ocorrendo o aumento da produção de álcool isoamílico, sugerindo que os mecanismos de produção de superiores são inter-relacionados e distintos (Kodama e cols., 2001; Yoshimoto e cols., 2002). A expressão deste gene *BAT2* apresentou expressão aumentada e superior na cepa LBCM 422, quando comparada à cepa LBCM 427, ao longo de todo o processo fermentativo, apresentando também um pico de expressão no tempo final de trinta e seis horas (Figura 19). Estes

resultados de dosagem dos compostos confrontados com o nível de expressão de genes envolvidos na síntese de álcool isoamílico colaboram com idéias sobre a existência e relação direta de outros mecanismos na produção de álcoois superiores. Outra abordagem relaciona-se à regulação do gene que codifica para a α -IPM. Estudos mostram que as condições do meio de cultivo interagem na regulação do gene *LEU4* como, por exemplo, a presença de fosfato no meio de crescimento que diminui em 40% a expressão do gene (Kohlhaw, 2003). 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*, além da ativação transcricional ser aditiva, ou seja, os elementos não competem entre si ou agem em associação.

Estas observações em conjunto, demonstram a complexidade nos mecanismos de controle e expressão gênica e o número de fatores que podem explicar o fato da cepa LBCM 422, sensível a TFL apresentar quantidades menores de álcool isoamílico em relação à cepa LBCM 427, apesar de as duas cepas apresentarem níveis equiparados de expressão dos genes *BAT1* e *BAT2*.

Dando sequência à análise dos compostos produzidos pelas duas cepas de leveduras, os outros dois álcoois superiores analisados foram o n-propanol e álcool isobutílico conforme Figuras 14 e 15. O que se observa para o álcool isobutílico é uma quantificação idêntica dentre todas as cepas analisadas, assim como o propanol, onde as quantidades finais de cada composto foram quase idênticas entre as cepas assim como a cinética de formação destes compostos ao longo dos diferentes tempos de fermentação. Estes dois compostos se acumularam ao longo da fermentação, atingindo seu máximo ao final da mesma. Lilly e cols (2006) demonstraram que modificações da expressão gênica do gene *BAT1* em leveduras utilizadas na produção de vinho têm um impacto na produção de todos os álcoois superiores, em especial na produção de álcool isoamílico, álcool isobutílico e propanol. Com base nesta literatura buscamos correlacionar a expressão de *BAT1* visualizado na Figura 19, com a produção e cinética de formação dos álcoois isobutílico e propanol. O observado foi que a expressão deste gene na cepa LBCM 422 aumenta ao longo do tempo de fermentação e coincide com a cinética de formação dos álcoois isobutílico e propanol, porém quando analisada a expressão deste mesmo gene para a cepa LBCM 427 e comparada à produção destes mesmos compostos, se torna claro mais

uma vez o fato de existirem outros mecanismos envolvidos na produção deste composto que vão além da simples análise da expressão gênica.

A produção de álcoois superiores é diretamente relacionada ao metabolismo de aminoácidos, o qual se relaciona com o crescimento celular (Kruger 1998; Quain e Duffield 1985). Isto explica a razão de a oxigenação do meio de cultura, temperaturas mais elevadas na fermentação e ácidos graxos insaturados causarem um aumento na produção de álcoois superiores (Younis e Stewart, 1999). Quanto maior a taxa de expressão de *BATI*, maior a taxa de produção de álcoois superiores, assim como a temperatura e o aumento de níveis de nitrogênio podem também influenciar positivamente a expressão deste. Os ácidos graxos insaturados não foram quantificados no meio de cultura utilizados neste trabalho para a fermentação, portanto não há informações da disponibilidade destes para o metabolismo das leveduras, e desta forma não é possível prever até que ponto o meio de cultura pode ter influenciado ou não a expressão do gene *BATI* e colaborado ou não para a formação destes álcoois superiores. Entretanto, a fermentação foi conduzida sem oxigenação do meio de cultura e a temperatura mantida constante em torno de 30°C, o que pode explicar em parte o baixo nível de expressão deste gene na cepa LBCM 427.

No que diz respeito à síntese de ésteres, podemos dizer que existem duas categorias de ésteres importantes: os ésteres de acetato e os ésteres de ácido graxo de cadeia média. Comparado aos álcoois superiores são produzidos em concentrações muito baixas, muito aquém do limite de percepção olfativa humana. Mesmo assim, e devido a um efeito chamado de “matrix”, ocorre uma sinergia entre as substâncias provocando uma sensação olfativa agradável ao consumidor.

Os ésteres de acetato são aqueles que tem recebido maior atenção, pois encontram-se em maior concentração se comparados com os ésteres de ácidos graxos de cadeia média, sendo portanto mais facilmente caracterizados pelos métodos de detecção disponíveis. Além disto, os genes que codificam para enzimas envolvidos em suas sínteses foram descobertos há mais tempo, sendo também mais facilmente excretados por células de leveduras. Do ponto de vista sensorial, os mais importantes são: acetato de etila; acetato de isoamila; acetato de feniletila. Ésteres de acetato são oriundos de uma condensação entre um acil-CoA e um álcool superior catalisada por álcool acetiltransferases, codificadas pelos

genes *ATF1* e *ATF2*. Os níveis de expressão de *ATF1* e *ATF2* afetam muito a produção de acetato de isoamila e acetato de etila (Verstrepen e cols., 2003b).

Por sua vez, os ésteres de ácidos graxos de cadeia média tem merecido progressivamente maior atenção devido ao fato de que os genes que codificam para as enzimas envolvidas na sua biosíntese terem sido descritos apenas mais recentemente. Apresentam como características marcantes o fato de que são produzidos em concentrações muito baixas, sendo sua excreção por parte da levedura fortemente influenciada pela extensão da cadeia do ácido graxo constituinte. Os principais representantes são: hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila.

Duas enzimas estão envolvidas na biosíntese destes compostos: a *Eth1* e a *Eeb1*, sendo *Eeb1* a enzima principal, enquanto *Eht1* desempenha um papel menor. (Mason e Dufour 200; Saerens e cols. 2006). Contrariamente ao que se observa com a síntese dos álcoois superiores e/ou com a síntese dos ésteres de acetato não há uma relação entre uma maior expressão destas enzimas e a concentração dos ésteres de ácido graxo de cadeia média, sendo mais provavelmente dependente da disponibilidade dos respectivos precursores, notadamente dos ácidos graxos de cadeia média.

Além disto, o equilíbrio entre enzimas que sintetizam ésteres e esterases as quais hidrolisam ésteres, pode ser importante para a taxa final de acumulação de ésteres (Fukuda e cols. 1998). Apesar da produção de ésteres ser extremamente dependente da cepa de levedura utilizada durante a fermentação, muitas variáveis do ambiente fermentativo podem afetar a regulação dos níveis de ésteres. Isto ocorre, por exemplo, com a diminuição nos níveis de ésteres quando a fermentação ocorre com presença de oxigenação e altos níveis de ácidos graxos insaturados no meio fermentativo (Saerens e cols. 2008a). O aumento de temperatura na fermentação pode aumentar os níveis de ésteres exceto para o hexanoato de etila (Saerens e cols. 2008a).

A síntese de ácidos graxos em leveduras é catalisada por um ácido graxo sintetase multifuncional. A alteração no balanço da atividade catalítica desta enzima afeta o comprimento da cadeia de ácidos graxos sintetizados. Assim, o uso de inibidores desta enzima é uma estratégia proposta para seleção de mutantes com maior capacidade de produção e a acumulação de ésteres. Estas cepas podem ser encontradas entre aquelas resistentes a compostos químicos selecionados para este fim.

Na cachaça, os mais importantes são hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila. Em algumas bebidas, em especial em cerveja, a concentração de acetato de isoamila e hexanoato de etila atinge níveis mínimos de detecção. Entretanto, a presença de diferentes ésteres pode gerar um efeito sinérgico no aroma final. Como a maioria dos ésteres presentes em bebidas é encontrada em concentrações em torno de limites mínimos de detecção, pequenas variações podem causar grandes diferenças no aroma final da bebida (Verstrepen e cols., 2003c).

Buscando comparar os dados obtidos na quantificação de ésteres com a expressão de alguns genes possivelmente envolvidos nas sínteses e possíveis degradações destes compostos, o primeiro gene analisado é o *ATF2*, envolvido na produção tanto de acetato de etila quanto na de acetato de isoamila. Conforme mostrado na FIGURA 19, este gene foi não somente muito mais expresso na cepa LBCM 427, em comparação à cepa LBCM 422, como também foi um dos genes mais expressos dentre todos os outros analisados. As expressões máximas dos genes *ATF1* e *ATF2* estão claramente correlacionadas com a concentração final de acetato de etila e acetato de fenil etil etanol. Esta correlação é ainda maior para a expressão de *ATF2*, comparada à expressão de *ATF1*. Isto sugere que quanto maior a expressão destes dois genes, maior a produção destes ésteres de acetato e por fim, esta correlação indica que a expressão destes dois genes pode ser usada como ferramenta para predição da produção de ésteres de acetato totais (Saerens e cols. 2008b).

Em nossos experimentos, a quantificação de acetato de etila não foi possível devido a limitações da técnica utilizada na cromatografia gasosa acoplada a detector de massas, impossibilitando a verificação dos teores deste éster produzidos pelas cepas LBCM 422 e LBCM 427 assim como para as outras cepas utilizadas. A não detecção de acetato de isoamila pode ser explicada devido ao fato de que, possa não haver uma correlação direta entre a expressão dos genes *ATF1* e *ATF2* e a produção de ésteres de acetato (Molina e cols. 2007). Estes pesquisadores concluíram que em condições de fermentação para obtenção de vinho, a produção destes ésteres era amplamente regulada a nível pós-transcricional. Outro ponto chave na não detecção deste éster pode estar na presença de esterases de acetato de isoamila, e conseqüentemente no balanço entre enzimas sintetizadoras de ésteres e esterases, as quais hidrolizam ésteres e conseqüentemente afetam de maneira importante a concentração final no acúmulo de ésteres (Fukuda e cols. 1998).

Na sequência das análises dos compostos voláteis produzidos pelas cepas utilizadas neste estudo, os ésteres octanoato e decanoato de etila foram submetidos a quantificações (Figuras 17 e 18). Como se pode observar, a cepa LBCM 427 resistente a cerulenina apresentou uma diferença superior de aproximadamente 1500 µg/L do éster octanoato de etila quando comparada à cepa LBCM 422 sensível a essa mesma droga. Dentre as outras cepas não houve uma correspondência de valores; entretanto, excetuando-se a cepa LBCM 613, todas as outras apresentaram valores finais superiores ao valor final obtido pela cepa LBCM 422 (Figura 17). Como para o octanoato de etila, o decanoato de etila foi produzido em quantidade maior pela cepa LBCM 427 em 400 µg/L quando comparada à cepa LBCM 422. Ainda na análise quantitativa da produção deste éster, com exceção da cepa LBCM 613, as cepas LBCM 600, LBCM 601 e LBCM 632 produziram valores finais maiores do que o alcançado pela cepa LBCM 422, ou seja, valores acima de 600µg/L de octanoato de etila (Figura 18).

Dos possíveis genes relacionados à produção destes dois compostos, o gene *EEB1* foi avaliado quanto a sua expressão por codificar a enzima Eeb1 que apresenta maior relevância na síntese de ésteres do que a enzima Eht1 codificada pelo gene *EHT1*.

A expressão deste gene foi maior para a cepa LBCM 422 em comparação à cepa LBCM 427 ao longo de todos os intervalos da fermentação, exceto no tempo de 24 horas, onde houve uma inversão e a cepa LBCM 427, apresentou expressão maior deste gene (Figura 19). Estes dados indicam haver uma flutuação da expressão deste gene ao longo de um processo fermentativo não seguindo um padrão de expressão. A quantificação dos ésteres octanoato de etila e decanoato de etila mostrou que para ambos ésteres a cepa que mais produziu estes compostos foi a cepa LBCM 427 e não a cepa LBCM 422 (Figuras 17 e 18). Quando comparamos os dados referentes à quantificação destes ésteres, com o nível de expressão do gene *EEB1*, percebemos não haver correlação clara entre estes dois dados, o que possibilita a conclusão de que para ésteres de etila de cadeia média, mudanças nos níveis de expressão de *EEB1* não é aparentemente a causa das mudanças das concentrações destes compostos. Esta ausência de correlação demonstra que a expressão de *EEB1* não é o fator primário para a produção de ésteres de etila, como já anteriormente concluído por (Saerens e cols 2006; Saerens e cols 2008a). Assim, a disponibilidade de precursores destes compostos tais como ácidos graxos, aparentemente desempenha um papel mais importante

na produção de ésteres de etila, do que a expressão de *EEBI* propriamente dita. O último gene analisado foi o gene *ADHI*, envolvido na síntese de etanol durante a fermentação. A expressão deste gene oscilou muito nas cepas utilizadas ao longo do processo fermentativo. A cepa LBCM 422 teve sua expressão diminuída nos tempos de seis e vinte e quatro horas, mantendo-se aumentada e estável nos outros tempos de doze e trinta e seis horas. A cepa LBCM 427 teve diminuída a expressão deste gene nos tempos de doze e trinta e seis horas, porém aumentada nos tempos de seis e vinte e quatro horas. A expressão do gene *ADHI* foi desta maneira oposta entre estas duas cepas.

6. CONCLUSÕES

De acordo com as evidências experimentais obtidas neste trabalho, concluímos que a metodologia proposta por Vicente e cols. (2006) para o isolamento, identificação e caracterização de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que produzam teores elevados de compostos aromatizantes pode ser considerada adequada para este propósito, pois foi possível observar que alguns dos compostos analisados por cromatografia gasosa estão realmente em maiores quantidades no caldo fermentado em escala piloto, o que amplia a gama de oportunidades desta área de investigação.

Os métodos de identificação molecular utilizados neste trabalho foram de forma geral eficientes na diferenciação de cepas isoladas por uma mesma metodologia, porém a combinação de diferentes técnicas moleculares mostrou garantir maior confiabilidade de resultados. Como estas técnicas moleculares são financeiramente dispendiosas de forma geral, sugerimos o uso aliado de métodos bioquímicos e métodos moleculares para diferenciar cepas de origem selvagem umas das outras.

A análise da expressão de diferentes genes relacionados à produção de diferentes compostos tais como álcoois superiores e ésteres demonstraram de forma geral, que a simples análise da expressão gênica não é conclusiva para correlacionar a expressão destes genes e a produção de compostos aromáticos. Os fatores genéticos envolvidos nos processos de produção destes compostos são bastante complexos incluindo o controle da regulação gênica, e assim são necessários maiores estudos das vias de produção de tais compostos.

Nosso trabalho evidenciou ainda que outros fatores tais como a influência da temperatura, da pressão osmótica e especialmente da constituição do meio fermentativo devem ser investigados em paralelo à expressão de genes envolvidos na síntese de compostos aromáticos para elucidação da influência do meio na expressão de tais genes.

Por fim este trabalho contribui para reafirmar a necessidade da utilização de cepas selecionadas durante o processo fermentativo na produção de cachaça, e no entendimento dos mecanismos que norteiam a produção de compostos aromáticos produzidos por tais cepas selecionadas.

BIBLIOGRAFIA

- ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas). Mercado. Site institucional. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/mercado.php>>. Acesso em: 30 jan. 2009
- Angelis, D. F. (1992). Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação etanólica. In: Mutton, M. J. R., Mutton, M. A. (1992). Aguardente de cana: produção e qualidade. Jaboticabal: UNESP-FCAV, 49-65.
- 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.
- 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.
- Associação Mineira dos Produtores de Cachaça com Qualidade (AMPAQ). Disponível em:- <http://www.ampaq.com.br>
- 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.
- Akada R., Hirose 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.
- 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.
- Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cours de La fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité des vins. Colloque Société Française Microbiology, Reims, 251–267.
- Brown, T. A. Genomes. 2ª edição, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto no2314 de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização produção e fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 05 de setembro de 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto no4062 de 21 de dezembro de 2001. Definem expressões “cachaça” e “cachaça do Brasil” como indicações geográficas e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 de janeiro de 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa no13 de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de junho de 2005.
- Cardello H.M.A.B. e 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, M. G. (2001). Produção de aguardente de cana-de-açúcar. Lavras; UFLA, p 264.

- 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.
- Carvalho, J.C.M.; Sato, S. Fermentação descontínua. In: Scmidell, W. (Coord.); Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). *Biocnologia Industrial: Engenharia Bioqumica*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2. p. 193-204
- 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.
- COOCACHAÇA (Cooperativa de Produção e Promoção da Cachaça de Minas Gerais). Cachaça artesanal: mercado atual. Site institucional. BeloHorizonte, 2007.Disponívelem: <http://www.coocachaca.com/artesanal_mercado.html>.
- Côrrea, S. R. (1999). Microhabitats ocupados por *Saccharomyces cerevisiae* durante os períodos de entressafra e produção de três destilarias de aguardente artesanal. P74. Tese (Dissertação de Mestrado). Depto. De Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerai.s
- 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
- Dorneles, D. Influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva Terci oriunda do Município de Colombo – PR. [Mestrado] Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2003. 89 p.
- Dufour, J.-P., P. Malcorps, and P. Silcock. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation, p. 213–233. In K. Smart (ed.), *Brewing yeast fermentation performance*, vol. 2. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
- 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.
- Elder, J.F., Turner, B.J., (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *4ª Rev. Biol.*70, 297–320.
- Ellegren, H., (2004).Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. *Genetics.* V. 5, p. 435-445,
- Estanislau, M.L.L.; Cançado JR., F.L.; Paiva, B. M.(2002). Mercado Atual e potencial da cachaça. *Informe Agropecuário, EPAMIG*, v. 23, n.217, p.19-24,
- Falqué E., Fernández E. & Dubourdiu D. (2001) Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta* 54: 271-281
- Fernandez-Espinar M.T., Lopez V., Ramon D., Bartra E. 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. E. & Grattapaglia, D. (1995). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 pp.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B., (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 440, 325– 331.

- 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.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns, and J. W. Taylor. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can.J. Bot.* 69:180–190.
- Ginzinger, DG. (2002) Gene quantification using real time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*; 30: 503-12.
- Gomes, F.C.O. (2002). Estudo de duas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras da fermentação para a produção da cachaça artesanal. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.
- Gomes G.M, Cisalpino PS, Taborda AP, Camargo ZP. (2000). PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Journal Clinical Microbiology.* p. 3478-3480,.
- Gravata C.E. (1999) Manual da cachaça artesanal. 4 Ed. Belo Horizonte: UNA. pp. 1-104
- Griffiths, Anthony J.F.; Gelbart, William M.; Miller, Jeffrey H.; Lewontin, Richard C. (1999). *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman & Co.
- 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., J. Sabate ´, E. Barrio, J. Cano, and A. Querol. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcriber spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169:387–392

- Guimarães, T. M. (2005). Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. [Mestrado] Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. 101 p.
- Hardy, C.M., Clark-Walker, G.D., (1991). Nucleotide sequence of the COX1 gene in *Kluyveromyces lactis* mitochondrial DNA: evidence for recent horizontal transfer of a group II intron. *Current Genetics* 20, 99– 114
- Harris, D.C. (1995) *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC; Cap.22, p. 507-537.
- Hennequin, C., A. Thierry, G. F. Richard, G. Lecointre, H. V. Nguyen, C. Gaillardin, e B. Dujon (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* v. 39, p. 551-559.
- Henry, T., P. C. Iwen, and S. H. Hinrichs. (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38:1510–1515
- Heras – Vasquez, F.J., Mingorance – Cazorla, L., Clementre – Jimenez, J. M., Rodriguez – Vico, F. (2002). Identification of yeast species From orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 1503, 1-7
- Hopfer RL, Walden P, Setterquist S & Highsmith WE (1993). Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 65–75
- 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.
- Janzantti, N. S. (2004). Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 179 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- Kodama Y, Omura F, Miyajima K, Ashikari T (2001) Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast. *J Am Soc Brew Chem* 59:157–162
- Kohlhaw G.B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: Entering metabolism through the back door. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67: 1-15.
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 151-160.
- Lambrechts M.G. e Pretorius I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma – A Review. *S.Afri.J.Enol.Vitic.* 21: 97-129
- Lanças F.M. (1993). *Cromatografia em Fase Gasosa*. São Carlos: Acta, Cap.4, p.55-58
- 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.
- Li, Y-C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, e E. Nevo. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. *Mol. Ecol.* v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- 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
- Lilly M., 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 Microbiol. Lett.* p. 726-743
- Lima, U.A. (1983). Aguardentes. In: Aquarone, E.; Lima; U.A.; Borzani, W. *Biotecnologia – Alimentos e Bebidas produzidas por fermentação*. São Paulo: Editora Edgard Blucher., vol 5, p. 243.
- Lima, U.A. (2001). Aguardentes. In: Aquarone, E., Lima, U.A.; Borzani, W. (Coord.) *Biотecnologia Industrial: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo: Editora Edgard Blücher., vol 5, p. 145-182.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D, (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v.25, p.402-8.
- Longo, E., Velazquez, J. B., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P., Villa, T. G. (1992). Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region. *World j. Microbiol. Biotechnol.* 8, 539-541.
- Lopez, V., M. T. Fernandez-Espinar, E. Barrio, D. Ramon, and A. Querol. (2003). A new PCR-based 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.
- 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
- Maia, A. B. R. A., Pereira, A. J. Schawabe, W. K. (1994), 2º Curso de tecnologia para produção da aguardente de qualidade. Fundação Christiano Ottoni. 74p.
- Maia. F. S. Alternativa para a Exportação de Cachaça Artesanal: um Exemplo da Alemanha. *Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras*, nº. 57. Disponível no site http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_57.pdf, acessado em 16/01/2009.
- Mamede M.E.O., Pastore G.M. (2006) Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. *Food Chemistry* 96: 586–590.
- Martinelli, D. P.; Spers, E. E.; Costa, A. F. (2000) Ypióca - Introduzindo uma bebida genuinamente brasileira no mercado global. In: Congresso anual do pensa (Programa de Estudos dos Negócios de Sistema), 10., 2000, São Paulo. *Anais ...* [São Paulo,200]
- Mason A.B. & Dufour J.P. (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16: 1287-1298.
- Mc Nair, H. M., Miller, J. M. (1997). *Basic Gas Chromatography*. New York: Wiley Interscience, Cap 1, p. 1-13.
- Molina FI, Jong S-C & Huffman JL (1993) PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacer of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 259–264.
- 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.

- Nason, J. D.; Aldrich, P. R. & Hamrick, J. L. (1997). Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: Laurence, W. F. & Bierregaard Jr. R. O. (Ed.) *Tropical Forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*, Chicago: University of Chicago Press, pp. 304-320
- 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., 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. (2001) Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 135 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- 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.
- Oliveira, S. G., Magalhães, M.A. (2002). Procedimento para produção da cachaça artesanal de Minas regulamentada pelo decreto nº 42.644 de 05/06/2002. *Informe Agropecuário* 23(217), 78-83.
- Ostergaard S., Olsson L. & Nielsen J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64: 34-50.
- Pataro, C., Gomes, C.O., Araújo, R.A.C., Rosa, C. A., Schawn, R. F., Campos, C. R., Claret, A. S., Castro, H. A. (2002). Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe agropecuário*, Belo Horizonte 23(217), 37-43
- Pataro C., Guerra J.B., Petrilho-Peixoto M.L., Mendonca-Hagler L.C., Linardi V.R. e 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., Martinez, I. and Hidalgo, P. (2001). Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology* 33, 461-466.
- 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.

- 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. e Bauer F.F. (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20:426-432
- Pretorius I.S. e Hoj P.B. (2005) Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Austral Grape Wine Res* 11: 83-108.
- PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA – PBDAC.
Disponível em: [HTTP://www.pbdac.com.br](http://www.pbdac.com.br).
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. e Pérez-Ortín, J. E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2057-2061
- 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
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C & Werner D (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1756–1761
- Reed, G. and Nagodawithana, T.W. *Yeast Technology*. New York: 2 ed. Van Nostrand Reinhold Book. 1991. 378 p
- Ribeiro C.A.F. & Horii J. (2004) Negative H₂S character and flocculation as yeast strain markers for inoculum recovery. *Sci.agric.* 61: 292-297
- Ribeiro, J.C.G.M. (1997) *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. Belo Horizonte: Ed. Perform, 162p.
- Ribeiro, J.C.G.M. (2002) *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. 2 ed. Belo Horizonte: Ed. O Lutador, 223 p.
- Rodrigues, L. R.; Oliveira, E. A. A. Q. de. (2006) Expansão da exportação de cachaça brasileira: uma nova oportunidade de negócios internacionais. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 11; Encontro latino Americano de pós-Graduação 7., , São José dos Campos. [Anais...]. [São José dos Campos: Univap, 2007].
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., Polsinelli, M. (1994) Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 213-218.
- 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.
- Saerens S.M.G., Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR (2008a) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74:454–461
- Saerens, S. M. G.; Verbelen, P. J.; Vanbeneden, N.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. (2008b) R. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 1039 – 1051.

- Saerens, S.M. G., K. J. Verstrepen, S. D.M. Van Laere, A. R. D. Voet, P. VanDijck, F. R. Delvaux, and J. M. Thevelein. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fattyacid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.* 281:4446–4456.
- Saghai Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G. Yang, Q. Zhang, e R.W. Allard. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 91, p. 5466-5470.
- Sanni, A. I., Lonner, C. (1993). Identification of yeast isolated Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* 10, 517-523.
- Schaad N. W, Frederick RD, (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *J Plant Pathol* 24: 250-258.
- Schawn, R. F. ; Mendonça, A.T.; Silva-JR, J.J.; Rodrigues, V.; Wheals, A,E. (2001) Microbiology and Physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht*, v.79, p.89-96.
- Schoondermark-Stolk S.A., Taberner 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, (2008). Estudos de Mercado. Belo Horizonte, p 9.
- SEBRAE, (2001). Diagnóstico da Cachaça de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.259
- SEBRAE, (2001). Diagnóstico da Cachaça de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.9
- SEBRAE, (2002). Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique em Minas Gerais. SEBRAE - Minas Gerais 1: 1-56
- Sefa-Dedeh. S., Sanni, A.,Tetteh, G. Sakyi-Dawson, E. (1999). Yeast in the traditional brewing of pito in Ghana. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 593-597.
- Sekito, T., Okamoto, K., Kitano, H., Yoshida, K., (1995). The complete mitochondrial DNA sequence of *Hansenula wingei* reveals new characteristics of yeast mitochondria. *Current Genetics* 28, 39– 53.
- 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.
- Tracy, J. W., Kohlhaw, G.B. (1997). Evidence for two distinct CoA binding sites on yeast α - isopropylmalate synthase. *The Journal of Biol. Chemistry* 252, 4085-4091.
- Tóth, G., Z. Gáspari, e J. Jurka. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* v.10, p. 967-981.
- Valente, P., Gouveia, F. C., De lemos, G. A. Pimentel, D., Van Elsas, J. D., Mendonca-Hagler, L. C. e Hagler, A.N. (1996). PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Micorbiol. Lett.* 137, 253-256.
- 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.
- Vaughan – Martini, A., Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu strict*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53, 77-84.
- Vaughan – Martini, A., Martini, A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Rees. In the yeast, a taxonomic study, 4th ed. Ed. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 358-372
- 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., Van Laere S.D., Vanderhaegen B.M., Derdelinckx G., Dufour J.P., Pretorius I.S., Winderickx J., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2003b) 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.
- 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., 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.
- 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. p. 315-322.
- Wyder MT & Puhán Z (1997) A rapid method for identification of yeasts from Kefyr at species level. *Milchwissenschaft.* 52: 327–330.
- 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.
- Yoshizawa K. (1999) Sake: production and flavor. *Food Res Intern* 15: 83-107.
- Zea, L, Moreno, J., Medina, M. Ortega, J. M. (1994). Evolution of C6 C8, e C10 acids and their ethyl esters in cells and musts during fermentation with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *J. Ind. Microbiol.* 13, 269-272.
- Zironi, R. Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guillewrmondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 15, 235-238.