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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* DA REGIÃO DE SALINAS PARA FINS DE IDENTIFICAÇÃO GEOGRÁFICA

DOUTORANDA: EDILENE ALVES BARBOSA

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO

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

OURO PRETO
2013

Edilene Alves Barbosa

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* DA REGIÃO DE SALINAS PARA FINS DE IDENTIFICAÇÃO GEOGRÁFICA

OURO PRETO - MG
2013

B238c Barbosa, Edilene Alves.
Caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região de Salinas para fins de identificação geográfica [manuscrito] / Edilene Alves Barbosa - 2013.
xx, 140f.: il., color; graf.; tab.; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Biologia Molecular.

1. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. 2. Leveduras - Teses. 3. Cachaça - Teses. 4. Biologia molecular - Teses. I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 582.282.23:663.543

Catalogação: sisbin@sisbin.ufop.br

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 Tese Intitulada:

"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DA REGIÃO DE SALINAS PARA FINS DE IDENTIFICAÇÃO GEOGRÁFICA"

Aos doze dias do mês de Junho de 2013, às 14:00, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Edilene Barbosa Alves**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior
Examinador (UFPE)

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
Examinador (UFMG)

Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pedrosa
Examinadora (UFOP)

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

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Presidente

DATA DA DEFESA: **12/06/2013**

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que são o sol da minha vida:
Meus pais, Valdivino e Terezinha, a José Benevenuto e minha filha Maria Júlia que veio pintar meu mundo de cores mais vibrantes.

Agradecimentos

Eu gostaria de expressar meus profundos agradecimentos àqueles que contribuíram de formas variadas e em diferentes níveis, ao longo do desenvolvimento dos trabalhos que culminaram na conclusão deste doutorado.

Ao meu orientador, Dr. Rogelio Brandão, pelo exemplo de pesquisador, por seu rigor científico, sua persistência, por esta oportunidade, por todo o aprendizado e, principalmente, pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao Dr. Ieso de Castro, não somente pela dedicação e estímulo, mas também pela amizade e apoio que muito contribuíram para minha formação; uma pessoa que aprendi a admirar e a respeitar.

À Zezé Trópia, pela amizade e por toda sua paciência, alegria, ensinamentos e preocupação com todos no laboratório.

À Drª. Leoneide Bouillet, uma amiga, pela atenção e força de vontade que muito me serviram de referencial, sempre com uma palavra carinhosa nos momentos difíceis, e conselhos preciosos.

Aos professores do Laboratório Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas da UFOP, Dr. Maurício Coutrim e Dr. Robson Afonso, colaboradores deste projeto, pelo imenso auxílio, valorosas ideias, disponibilização do laboratório, confiança e maravilhosa convivência.

Às Drª Lygia e Florência pela atenção e paciência que tiveram comigo, muito obrigada.

Aos alunos de graduação e pós do laboratório, por toda a dedicação e comprometimento com o trabalho, e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos e colegas do LBCM, com os quais passei bons momentos de aprendizado e troca de experiência, dificuldades e alegrias em especial a Bruna, Cris, Eduardo, Proust, Renata, Guto, Thaís, Pilar, Zé Eduardo, Arisco, Bruno, Luís, Juliana, Lygia, Florência, Thiago, Aninha, Filipe, Thalita, pela convivência saudável e prazerosa.

Aos colegas e amigos do doutorado DINTER de Salinas, Rose, Dani, Thiago, Oscar, Lázaro e Magalhães pela amizade e experiências compartilhadas.

Aos professores do NUPEB, pelo ensino, base para o desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Adalcino França Júnior pelo pioneirismo e iniciativa de implantação do curso de Tecnologia em Produção de Cachaça.

Ao professor Dr. Charles Bernado Buterri, pela luta conjunta, palavras de consolo, iniciativa e paciência, muito obrigada.

Aos membros da banca, pela disponibilidade, atenção e contribuições.

Aos produtores de cachaça associados à APACS, que doaram amostras e prontamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos do IFNMG - Campus Salinas, pela colaboração na condução dos experimentos, em especial aos alunos do Curso Superior em Tecnologia e Produção de Cachaça.

Aos servidores do IFNMG – Campus Salinas, pelo apoio e compreensão no andamento dos trabalhos, especialmente a quem auxiliou diretamente na realização dos experimentos em Salinas, José Aparecido, Jânio, Fábio de Souza, Álvaro, Isaías, “Nego”, “Seu” Geraldo, Bida, Ramon, Adão e Dilermando, “Seu” Flor, Lorivaldo, Alex, Dênis, Karina, Lara, Valdirene e Aldo, os meus mais sinceros agradecimentos.

À UFOP, exemplo de ensino público de qualidade.

A CAPES pela realização do DINTER.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram tanto intelectual como emocionalmente para a concretização desta tese; agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais que ninguém e que, seguramente, foram os que mais compartilharam da minha alegria “minha amada família”.

"Aprendi com as Primaveras a me deixar cortar para poder voltar sempre inteira."

Cecília Meireles

Cachaça é a bebida alcoólica destilada mais consumida no Brasil. O aumento do consumo no mercado interno e a possibilidade de ampliação da exportação exigem um produto padronizado de qualidade. Por conseguinte, a busca pela qualidade exige procedimentos técnicos em toda cadeia de suprimentos, desde a plantação da cana-de-açúcar até práticas de destilação, incluindo a qualidade do processo de fermentação, inoculação de estirpes apropriadas em concentração adequada, reciclagem controlada e condições ambientais, todos são importantes para atingir essa padronização. Este trabalho visou à caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região de Salinas (MG) para fins de Identificação Geográfica. Assim, foi isolado 7680 linhagens oriundas de 14 alambiques da microrregião de Salinas (MG), das quais selecionamos 18 linhagens de *S. cerevisiae* com características desejáveis para a produção de cachaça conforme metodologia desenvolvida (INPI-MG Protocolo-315). As linhagens selecionadas foram identificadas como *S. cerevisiae* pela análise com enzimas de restrição da região ITS (*internal transcribed spacer region*). Das dezoito linhagens selecionadas, 15 linhagens foram submetidas a um experimento em escala piloto, usando dornas com capacidade de 40 L por 10 ciclos consecutivos, avaliando o desempenho fermentativo como: consumo de sólidos solúveis, teor alcoólico e acidez do vinho, bem como os compostos voláteis presentes no produto final a cachaça. Das 15 linhagens testadas foram selecionadas seis para avaliar a repetibilidade dos resultados no ano seguinte. Das seis linhagens selecionadas, duas linhagens apresentaram melhor desempenho fermentativo e foram testadas em escala de produção, usando dornas com capacidade de 800 L, para avaliar o desempenho em escala de produção e a qualidade do produto final. Posteriormente as linhagens foram analisadas quanto à produção de alcoóis superiores e ésteres através de cromatografia gasosa, demonstrando que as linhagens produzem elevada quantidade de álcool superior. Foi realizado teste de aceitação das cachaças produzidas com as linhagens selecionadas. Para a caracterização molecular das linhagens em estudo, o polimorfismo do DNA das linhagens 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 as linhagens analisadas, ao contrário das técnicas de RAPD-PCR e COX-PCR.

Demonstrando, assim, ser necessário o uso de diferentes técnicas combinadas na análise do polimorfismo das linhagens. A caracterização molecular mostrou um polimorfismo entre as linhagens selecionadas e claras diferenças sobre linhagens isoladas de outras regiões de Minas Gerais, sugerindo uma forte correlação entre a origem geográfica e as características genéticas de linhagens de leveduras.

Abstract

Cachaça is the distilled drink more consumed in Brazil. The increase in domestic consumption and the possibility of expanding the export require a standardized product. Therefore, the search for quality requires technical procedures throughout the supply chain, from the planting of sugar cane to distillation, practices including the quality of the fermentation process, appropriate strains inoculation on suitable concentration, recycling and controlled environmental conditions are important to achieve this standardization. This work aimed the molecular and biochemical characterization of strains of *S. cerevisiae* in Salinas (MG) for identification purposes. In this work, there isolated and selected 18 strains of *S. cerevisiae* from 14 alembic of the microregion of Salinas (MG), as the methodology developed (INPI-MG Protocol-315), selecting yeasts with desirable characteristics for the production of cachaça. In this work, the strains selected by this methodology were identified as *S. cerevisiae* by analyzing with restriction enzymes of the ITS (*internal transcribed spacer region*). Of the eighteen selected strains, 15 strains were submitted to a pilot-scale experiment, using barrels with a capacity of 40 L for 10 consecutive cycles, evaluating fermentation performance as: consumption of soluble solids, alcohol content and acidity of the wine, as well as the volatile compounds present in the final product to rum. Of the 15 strains tested 6 were selected to assess the repeatability of the results the following year. Of the six selected strains two showed better performance and fermentation, testing them in production scale, using barrels with a capacity of 800 L, to evaluate the performance in production scale and the quality of the final product. Later the strains were examined with regard to the production of higher alcohols and esters by gas chromatography, demonstrating that the strains produce high amount of alcohol. DNA polymorphism of the strains was examined by RAPD-PCR techniques, COX-PCR and microsatellite analyses. Our results showed that microsatellite analysis allowed a clear distinction among the strains examined, unlike the RAPD-PCR techniques and COX-PCR. This result demonstrated the need of use different techniques combined in the analysis of the polymorphism of the strains. The molecular characterization showed great polymorphism between the selected strains and clear differences on strains isolated from other regions of Minas

Gerais and other States of Brazil, suggesting a strong correlation between the geographical origin and genetic characteristics of yeast strains.

SUMÁRIO

RESUMO..... **vii**

ABSTRACT..... **ix**

LISTA DE ABREVIATURAS..... **xv**

LISTA DE TABELAS..... **xvii**

LISTA DE FIGURAS..... **xviii**

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1 Cachaça – conceitos e tendências..... 1

1.2 Importância econômica da cachaça..... 2

1.3 Padrões de identidade da cachaça..... 5

1.4 Processo de produção da cachaça..... 5

1.5 O processo fermentativo na produção de cachaça..... 7

1.5.1 Produção de éster..... 9

1.6 Identificação geográfica (IG)..... 11

1.7 A utilização de leveduras nativas como fatores de indicação geográfica..... 13

1.7.1 Caracterização molecular de células de leveduras..... 14

1.7.2 A Denominação de Origem para a cachaça produzida em Salinas..... 19

2. OBJETIVOS..... 21

2.1 Objetivo Geral..... 21

2.2 Objetivos Específicos..... 21

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 22

3.1 Isolamento e Seleção das Leveduras..... 22

3.2 Manutenção das culturas leveduras..... 22

3.3 Meios de cultura..... 22

3.3.1 Meio YP..... 22

3.3.2 Meio YNB (DIFCO Laboratories) 22

3.3.3 Meio YP caldo de cana 10% agar..... 24

3.3.4 Meio Mínimo..... 24

3.3.5 Meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories)..... 24

3.3.6	Meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories).....	24
3.3.7	Meio YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose – Methylene Blue)	24
3.4	Isolamento das leveduras.....	25
3.4.1	Testes bioquímicos para identificação taxonômica das leveduras...	25
3.4.2	Testes de Floculação.....	26
3.4.3	Medida da produção de H_2S.....	26
3.4.4	Medida da produção e resistência a micocinas.....	26
3.4.5	Tolerância ao estresse.....	27
3.4.7	Teste de resistência a 5,5',5"-trifluoro-DL-leucina (TFL) e Cerulenina.....	27
3.4.7.1	Teste de sensibilidade natural a TFL.....	27
3.4.7.2	Teste de sensibilidade natural a Cerulenina.....	27
3.5	Determinação da atividade enzimática da invertase.....	28
3.5.1	Inoculação e crescimento das células.....	28
3.5.2	Preparo de extratos celulares para determinação da atividade enzimática da invertase.....	28
3.5.3	Dosagem da enzima invertase.....	29
3.6	Fermentações em escala piloto e ambiente de produção.....	29
3.6.1	Preparo do inóculo e multiplicação das leveduras.....	29
3.7	Parâmetros fermentativos.....	33
3.7.1	Coleta das amostras para o acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo.....	33
3.7.2	Fermentação em escala piloto e em escala de produção.....	35
3.7.3	Destilação em alambique de cobre.....	37
3.8	Análises físico-químicas.....	39
3.8.1	Acidez total do mosto.....	39
3.8.2	Grau alcoólico do vinho (%).....	39
3.8.3	Compostos voláteis na cachaça	40
3.9	Teste de aceitação de cachaça.....	40
3.10	Fermentações em escala laboratorial para acompanhar a cinética de formação dos compostos voláteis.....	41

3.11 Análises bioquímicas, fisiológicas e moleculares das leveduras..... 42
3.11.1 Análises bioquímicas e fisiológicas..... 42
3.11.2 Identificação e análise do polimorfismo molecular das linhagens de leveduras..... 42
3.11.3 Amplificação do fragmento ITS1-ITS4 (PCR-ITS)..... 43
3.11.4 Purificação do produto de PCR-ITS..... 44
3.11.5 Digestão do fragmento ITS..... 44
3.11.6 Eletroforese em gel de agarose..... 45
3.11.7 Caracterização do polimorfismo das leveduras por RAPD – PCR..... 45
3.11.8 Identificação e polimorfismo das leveduras por COX – PCR..... 46
3.11.9 Análise de microssatélites..... 47
3.11.10 Identificação e polimorfismo das leveduras por mtDNA-RFLP..... 49
3.12 Análises Estatísticas..... 50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 51
4.1 Isolamento e identificação das leveduras..... 51
4.2. Testes complementares de seleção..... 52
4.2.1 Resistência a condições de estresse..... 52
4.2.2 Seleção de linhagens resistentes a TFL e Cerulenina..... 54
4.2.3 Floculação..... 54
4.2.4 Dosagem de invertase..... 55
4.2.5 Identificação molecular das leveduras..... 56
4.3 Fermentação em escala piloto das linhagens selecionadas..... 59
4.3.1 Avaliação dos parâmetros relacionados ao desempenho fermentativo das linhagens..... 59
4.3.1.1 Taxa de consumo de sólidos solúveis..... 59
4.3.1.2 Análise do Teor alcoólico do vinho..... 61
4.3.1.3 Acidez do vinho..... 61
4.3.2 Parâmetros físico-químicos da cachaça..... 63
4.3.2.1 Teor de acidez volátil..... 63
4.3.2.2 Fermentação em escala de produção..... 74
4.4 Determinação dos componentes voláteis da cachaça..... 74

4.5	Teste de aceitação do consumidor.....	75
4.6	Cinética da formação e determinações de esteres e alcoóis superiores..	78
4.7	Caracterização molecular das linhagens selecionadas……..	83
4.7.1	Confirmação da espécie das leveduras selecionadas……..	83
4.7.2	Verificação da prevalência - acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo pelo Método de identificação por mtDNA-RFLP.....	88
4.7.3	Polimorfismo molecular das duas linhagens selecionadas.....	90
4.7.3.1	Diferenciação por RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*).....	90
4.7.3.2	Diferenciação por COX-PCR.....	91
4.7.4	Análise de microssatélites.....	91
5.	**CONCLUSÕES.....**	**96**
6.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....**	**97**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABPI	Associação Brasileira da Propriedade Intelectual
AFLP	*Amplified Fragment Length Polymorphism*
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
APACS	Associação dos Produtores de Cachaça De Salinas
ARDRA	Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado
COOCACHAÇA	Cooperativa de Produção e Promoção de Cachaça de Minas
CG	Cromatografia Gasosa / Gas Chromatography
CIG	Coordenação de Incentivo a Indicação Geográfica de Produtos Agropecuários
CoA	Coenzima A
COXI	Gene Mitocondrial Que Codifica a Subunidade 1 da Citocromo Oxidase
DEPTA	Departamento De Propriedade Intelectual e Tecnologia da Agropecuária
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico.
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FC	Fermento Caipira
FP	Fermento Prensado
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAC	Instituto Brasileiro da Cachaça
ICMS	Imposto Sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços
IFNMG	Instituto Federal do Norte de Minas Gerais
IG	Indicação Geográfica
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ITS	Região de Espaçamento de Transcrição Interna (*Internal*

	Transcribed Spacer Region)
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
m/v	Massa/Volume
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mRNA	RNA Mensageiro
mtDNA-RFLP	*Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis* of Mitocondrial DNA
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
nm	Nanômetros
NUPEB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
ºBrix	Grau Brix
p/v	Peso Por Volume
PFGE	*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
PA	Puro Para Análise
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PROCACHAÇA	Programa Mineiro de Incentivo de Produção a Aguardente
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado Randômico (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)
RPM	Rotações Por Minuto
S. cerevisiae	*Saccharomyces Cerevisiae*
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas
SSR	Simple Sequence Repeats
STR	Short Tandem Repeats
T.O Curralin	Terra de Ouro Curralin
T.O Indaiá	Terra de Ouro Indaiá
TAE 1X	Tris Acetato EDTA- Tris Acetato 40 Mm E EDTA1 Mm.
TAE	Tampão Tris/Acetato/Edta
TE	Tampão Tris/Edta
TFL	5,5´, 5´´ Trifluoro-DL-Leucina
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto

Tabela 1	Padrões de identidade e qualidade para a cachaça segundo Instrução Normativa 13.....	6
Tabela 2	*Primers* utilizados na amplificação de 6 *locus* de microssatélites para *S. cerevisiae*.....	48
Tabela 3	Procedimentos de isolamento, seleção, avaliação bioquímica e fisiológica das linhagens da espécie *S. cerevisiae* da microrregião de Salinas – MG	53
Tabela 4	Linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG, a partir de testes bioquímicos.....	57
Tabela 5	Acidez volátil l (mg/ác. acético/100 mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes linhagens de leveduras produzidas em escala piloto (dornas de 40 litros) em 2009.....	65
Tabela 6	Acidez volátil l (mg/ác. acético/100 mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes linhagens de leveduras produzidas em escala piloto (dornas de 40 litros) em 2010.....	71
Tabela 7	Resultado da análise de cachaças recém destiladas, produzidas em escala de produção das linhagens selecionadas LBCM 678 e LBCM 680 em 2011, Acidez volátil l (mg/ác. acético/100 mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes linhagens de leveduras produzidas em escala de produção (dornas de 1000 litros) em 2011.....	77
Tabela 8	Diversidade alélica de duas linhagens selvagens selecionadas da microrregião de Salinas – MG comparadas com a linhagem W303.	94

Figura 1 Mapa de localização dos alambiques onde foram coletadas amostras de mosto fermentado para isolamento e seleção das leveduras da microrregião de Salinas – MG. 23

Figura 2 Processo de multiplicação das linhagens de levedura (a), massa celular depois da retirada do vinho (b) e massa celular da linhagem LBCM 680 (c), selecionada na microrregião de Salinas, utilizando baldes plásticos com capacidade de 20 L e caldo de cana-de-açúcar estéril diluído a 5 ºBrix..... 31

Figura 3 Propagador em aço inoxidável asséptico utilizado para a realização da propagação das células de leveduras, até obtenção de massa celular suficiente para abastecimento das dornas para produção de cachaça.....;..... 32

Figura 4 Caldo de cana sendo filtrado em peneira de aço inoxidável 2 mm (a), processo de decantação e diluição do caldo de cana-de-açúcar e aferição do ºBrix (b) para produção da cachaça..... 34

Figura 5 Dornas em aço inoxidável com volume útil de 40 L, utilizadas nas fermentações em escala piloto no laboratório de microbiologia do IFNMG – Campus Salinas. Abastecimento gradativo das dornas (a) dornas abastecidas (b) dornas em aço inoxidável em processo fermentativo com volume útil de 800 L (c), dornas em final de fermentação em escala de produção (d) na produção de cachaça..... 36

Figura 6 Alambique de cobre para obtenção da cachaça,..... 38

Figura 7 Identificação molecular das leveduras por amplificação da região de ITS..... 58

Figura 8 Avaliação do consumo de sólidos solúveis e ciclos fermentativos. 60

Figura 9 Avaliação do teor alcoólico e acidez do vinho..... 62

Figura 10 Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis..... 67

Figura 11 Avaliação do consumo de sólidos solúveis e ciclos fermentativos..... 68

Figura 12 Avaliação do teor alcoólico e acidez do vinho..... 69

Figura 13 Análise Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis das amostras de cachaças produzidas no ano de 2010..... 72

Figura 14 Análise Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis das amostras de cachaças produzidas no ano de 2009 e 2010..... 73

gura 15 Avaliação da acidez total e teor alcoólico do vinho avaliado em escala piloto no ano de 2009 e 2010 e em ambiente de produção no ano de 2011 das duas linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG..... 76

Figura 16 Resultado do percentual das notas atribuídas pelos consumidores quanto à impressão global das cachaças produzidas em escala de produção com as leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680 selecionada na microrregião de Salinas – MG..... 79

Figura 17 Resultado do percentual Intensidade de percepção quanto à acidez das cachaças produzidas em escala de produção com as leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680 selecionada na microrregião de Salinas – MG..... 80

Figura 18 Cinética de formação dos compostos secundários n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico das linhagens LBCM 678 e LBCM 680 81

Figura 19 Cinética de formação dos compostos secundários acetato de etila e hexanoato de etila das linhagens LBCM 678 e LBCM 680..... 82

Figura 20 Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o fragmento ITS da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680, amplificado a partir dos *primers* ITS1 e ITS4..... 84

Figura 21 Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o produto de digestão do fragmento de ITS – 5.8S com a endonuclease enzima de digestão *HaeIII*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680..... 85

Figura 22 Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o produto de digestão do fragmento de ITS com a

enzima *HinfI*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680..... 86

Figura 23 Fragmentos de restrição das regiões ITS-5.8S, em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (1 µg/mL), após digestão com a enzima *CfoI*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680..... 87

Figura 24 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do mtDNA-RFLP (*mitocondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism*) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680..... 89

Figura 25 RAPD-PCR e COX-PCR das linhagens de leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680, isoladas de destilarias da microrregião de Salinas (MG) em 2008..... 93

1. **INTRODUÇÃO**

1.1 Cachaça – conceitos e tendências

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com caracterização de identidade específica, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, com graduação alcoólica de 38 a 48% (v/v) a 20 ºC, e características sensoriais peculiares podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expresso em sacarose (BRASIL, 2005).

A valorização da cachaça no mercado interno e externo tem direcionado a produção da bebida no Brasil com foco na sua qualidade e valor agregado (CAMPELO, 2002). Muito diferente daquelas produzidas em escala industrial, a cachaça de alambique é elaborada em quantidade reduzida, pois o processo de fermentação é natural e lento, sendo que nesse processo as leveduras selvagens, provenientes dos equipamentos de moagem e da dorna de fermentação, são multiplicadas usando caldo de cana como substrato por 5-10 dias, até atingirem concentração suficiente para iniciar um ciclo fermentativo (PATARO *et al.*, 1998, 2000, 2002; SCHWAN *et al*., 2001). Sendo considerado um produto de melhor qualidade por alguns apreciadores da bebida. O estado de Minas Gerais se destaca nesse cenário como maior produtor de cachaça de alambique do Brasil, sendo mais de 60% do total produzido, segundo estimativas da Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade (OLIVEIRA, 2004).

Com relação às características do processo de produção, o uso de leveduras selecionadas, notadamente da espécie *S. cerevisiae*, isoladas das próprias unidades de produção da bebida, é uma alternativa na tentativa de controlar eficientemente o processo fermentativo da cachaça. O uso de linhagens de leveduras selecionadas para a produção de cachaça apresenta diversas vantagens, em relação à fermentação espontânea, tais como: minimização das contaminações indesejáveis, redução do tempo de fermentação, rendimento alcoólico elevado e obtenção de um produto final uniforme e de qualidade (SCHWAN & CASTRO, 2001; SCHWAN *et al.*, 2006).

Segundo Pataro e colaboradores (2002b), o uso de leveduras selecionadas, na maioria das vezes, aumenta a produtividade e melhora a qualidade do produto final,

principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores. Vicente (2007) também observou que o uso de um inóculo com linhagens de leveduras selecionadas pode aumentar a produtividade e a eficiência da fermentação, assim como a produção principalmente de ésteres e álcoois superiores responsáveis pelo aroma da bebida. Além dessas propriedades, as linhagens selecionadas possuem maior tolerância às condições de estresse encontradas durante a fermentação, tais como: maior tolerância a elevadas concentrações de sacarose, altas temperaturas e concentrações elevadas de etanol, somada à sua capacidade de floculação.

Além disso, sabe-se que o processo fermentativo realizado com linhagens de leveduras selecionadas tem como vantagens, favorecer o início mais rápido do processo, evitar riscos de contaminação apresentados pela fermentação, taxas de fermentação mais rápidas e uniformes, maior rendimento e qualidade do produto resultante e eliminar variações no "flavour" da bebida (FLEET & GILLIAN, 1985; MARTINEZ *et al.*, 1990; SANNI & LONNER, 1993; ROMANO *et al.*, 2003).

1.2 Importância econômica da cachaça

A importância econômica do destilado vem crescendo, entre outros fatores, em virtude do Decreto nº 4062 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que define a cachaça como sendo um produto genuinamente brasileiro (MAPA, 2002). Por outro lado, a produção da cachaça, vem desempenhando também importante papel na estruturação de milhares de pequenas propriedades rurais no Brasil. Tais fatos justificam, portanto, a caracterização dos parâmetros e variantes do processo produtivo, sobretudo nas fases de fermentação e destilação, e ainda sua influência na composição físico-química tanto inorgânica (metais e outros), quanto orgânica (componentes secundários) da cachaça (ARESTA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2006).

A cadeia produtiva da cachaça vem se firmando como um importante setor do agronegócio brasileiro (BORGES, 2011). Atualmente, o Brasil produz 1,3 bilhões de litros de cachaça por ano, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, superada apenas pela cerveja, e a terceira bebida destilada mais consumida no mundo, depois apenas da vodka e do soju (SILVA, 2010).

No Brasil, estima-se que existam mais de 40 mil produtores, gerando em torno de 650 mil empregos diretos e indiretos. Há cerca de 4 mil marcas registradas (SEBRAE, 2009) e 1.824 estabelecimentos produtores de cachaça, aqui incluídos os processos produtivos de coluna e de alambique, conforme atesta o Ministério da Agricultura (SANTIAGO, 2008).

O processo produtivo da cachaça no Brasil vem expandindo suas atividades, destacando-se novos investimentos no setor (CARDOSO, 2006). Sendo assim, o aprimoramento da qualidade e da padronização da cachaça é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação (MIRANDA *et al.*, 2007).

Os principais produtores de cachaça do Brasil são os estados de São Paulo (44%), Pernambuco (12%), Ceará (12%), Minas Gerais (8%) e Paraíba (8%) (APEX, 2006). Do volume total, estima-se que 70% sejam de cachaça industrial e 30% de cachaça de alambique (COOCACHAÇA, 2008).

A produção de cachaça de alambique em Minas Gerais, mesmo registrando alto grau de clandestinidade, desempenha importante papel na estruturação da economia agroindustrial do Estado. A produção de cachaça combinada com atividades agropecuárias emprega, direta e indiretamente, cerca de 240.000 pessoas e gera uma renda anual total estimada de R$ 1,5 bilhão, em toda a cadeia produtiva, o que favorece o desenvolvimento da região (SEBRAE, 2002).

Segundo o IBGE (2006), o Norte de Minas Gerais e o Vale do Jequitinhonha detêm 48,6% do número de alambiques do estado, totalizando 4.118 estabelecimentos. Salinas está entre as dez maiores economias do Norte de Minas, levando em consideração a sua contribuição na arrecadação de ICMS, em toda a mesorregião norte mineira. A cachaça em Salinas é a segunda atividade econômica do município com participação de 33% em média na economia da cidade. Em 2006, a arrecadação de ICMS do setor de cachaça, em Minas Gerais, foi de R$ 1.494 milhão e, desse montante, Salinas arrecadou R$ 693 mil, ou seja, 46,4%, quase metade do ICMS arrecadado sobre a produção da bebida em todo o território mineiro, demonstrando, assim, a força da atividade econômica da região (SEBRAE, 2001).

A cachaça começou a ser produzida no município com a vinda dos primeiros fazendeiros para a região, seguindo os rastros da pecuária, cujos primeiros rebanhos bovinos vieram da Bahia, porém era produzida como atividade complementar à atividade pecuária. As boas perspectivas para a cachaça de Salinas tiveram início a partir das décadas de 40 e 50. Nessa época, algumas marcas de cachaça começaram a ser produzidas em Salinas, como a Piragybana, Havana entre outras. Tais marcas foram prenunciadoras de outras, que foram produzidas a partir do lançamento do PROCACHAÇA (Programa Mineiro de Incentivo de Produção à Aguardente), pelo governo do Estado, em 1992. Atualmente, a cachaça de Salinas é comercializada com aproximadamente 60 marcas em todo o país e no exterior. Definitivamente, a cadeia produtiva no município encontra-se consolidada e, desde o início da década passada, a produção da cachaça na região gera entre 1.000 e 1.500 empregos (diretos e indiretos) durante o período de produção, de junho a outubro (SEBRAE, 2001).

O atual Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, reconhecendo a importância econômica e social intrínseca à produção de cachaça, no município de Salinas e no Norte de Minas, indicou a necessidade da formação de um quadro técnico especializado para garantir a eficiência na produção e na qualidade da bebida. Para isso, o IFNMG criou o curso Superior de Tecnologia em Produção de Cachaça, em 2005, tendo a sua primeira turma concluída em 2008.

Com relação ao mercado externo e considerando a primeira década do século XXI, a produção de cachaça destacou-se com um aumento na pauta de exportação do país de 15,6% em relação à década anterior. No período de 2000 a 2009, houve um aumento de 52% no valor exportado e, em 2010, o país exportou 10,44 milhões de litros de cachaça, o que gerou uma receita de US$ 15,95 milhões (IBRAC, 2011a), proporcionando um preço médio de US$ 1,44 por litro. Atualmente, são aproximadamente 180 empresas exportadoras e a cachaça é exportada para mais de 60 países (IBRAC, 2011b).

De forma notável, o volume de cachaça adquirido pelos Estados Unidos aumentou em 12,62% de janeiro a junho de 2012, se comparado aos primeiros seis meses de 2011, segundo dados do MAPA. De acordo com este ministério, o reconhecimento da bebida como “genuinamente brasileira” alavancou as exportações. A medida ocorreu oficialmente durante a visita do presidente americano ao Brasil, no

início de abril 2012, após mais de dez anos de negociações e foi recentemente regulamentada pelo governo americano.

Até abril de 2011, a cachaça era identificada nos Estados Unidos como *Brazilian Rum*, devido à forma de classificação das bebidas adotadas pela legislação local, que inseria os dois produtos na mesma categoria, por utilizarem cana-de-açúcar como matéria-prima. Agora, as bebidas destiladas de cana, identificadas como cachaça só podem ser vendidas nos EUA se forem produzidas no Brasil.

1.3 Padrões de identidade da cachaça

O decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispondo sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Porém a legislação brasileira (BRASIL, 2005) definiu os padrões de identidade e qualidade da cachaça que devem estar de acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 30 de junho de 2005. Segundo esta legislação, cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a definição da composição química, dos requisitos de qualidade e a concentração máxima permitida de contaminantes dessas bebidas. Os respectivos padrões têm seus limites com a finalidade de garantir a qualidade destes produtos assegurando proteção à saúde pública (ver Tabela 1).

1.4 Processo de produção da cachaça

A produção de cachaça necessita de um processo de fabricação, baseado em práticas criteriosamente determinadas em relação às condições higiênico-sanitárias e controle nos processos, para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais (GONÇALVES *et al.,* 2009). Nos moldes tradicionais, é necessário obter o caldo de cana-de-açúcar livre de impurezas e diluído de modo que o teor de sólidos solúveis alcance entre 14-16 ºBrix. Em seguida, o caldo é adicionado em dornas de fermentação, onde se concentram as leveduras, micro-organismos capazes de realizar a fermentação alcoólica, perfazendo um total de cerca de 20% do volume do processo fermentativo. A fermentação tem uma duração entre 24 e

Tabela 1. Padrões de identidade e qualidade para a cachaça segundo Instrução Normativa 13

COMPONENTES	LIMITES	UNIDADE
Graduação Alcoólica	38 ≤ e ≥ 48	% em volume de álcool etílico a 20 ºC
Acidez volátil, em ácido acético	≤150	mg.(100 mL de álcool anidro)$^{-1}$
Ésteres totais, em acetato de etila	≤200	
Aldeídos totais, em acetaldeído	≤30	
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	≤5	
Soma dos álcoois superiores *	≤360	
Soma dos congêneres **	200 ≤ e ≥ 650	
Álcool metílico	≤ 20	
Álcool séc-butílico	≤ 10	
Álcool n-butílico	≤ 3	
Acroleína	≤ 5	
Carbamato de etila	≤ 150	μg.L^{-1}
Chumbo	≤ 200	
Arsênio	≤ 100	
Cobre	≤ 5	mg.L^{-1}

* Álcoois superiores = (isobutílico + isoamílicos + n-propílico)

** Congêneres = (Acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + hidroximetilfurfural + álcoois superiores).

Fonte: BRASIL (2005).

48 h (SALES, 2001). A etapa seguinte é a destilação que consiste em aquecer o vinho resultante da fermentação (SORATTO, 2007), para promover a evaporação do álcool e de demais componentes do vinho (mosto fermentado), além de promover algumas reações químicas induzidas pelo calor. Assim, os componentes voláteis do vinho podem aumentar ou diminuir e ainda originar novos compostos, sendo, então, importante o controle da temperatura na destilação, a fim de evitar componentes indesejáveis na cachaça, além de interferir na qualidade e no rendimento da bebida.

A destilação é uma operação complexa, uma vez que muitos fatores interferem tanto na sua eficiência, como nas características sensoriais, pela alteração nas quantidades de compostos voláteis absolutos e relativos resultantes, bem como pelas reações químicas que ocorrem devido ao aquecimento (MUTTON, 1992; OLIVEIRA, 2001). Na produção de cachaça de alambique, obtêm-se, por meio da destilação do mosto fermentado, três frações (cabeça, coração e cauda) e, ainda o vinhoto (YOKOYA, 1995). Por meio da destilação, o vinho proveniente da fermentação alcoólica, contendo cerca de 5 a 8% em volume de álcool etílico, deverá produzir 15 a 17% do volume do vinho destilado em cachaça, contendo de 38 a 48% v/v (SALES, 2001). Os componentes da cachaça classificados como primários são, respectivamente, a água e o etanol, e os secundários constituem um grupo de produtos minoritários oriundos do processo de fermentação e separados durante a destilação, sendo constituído principalmente por substâncias orgânicas como alcoóis superiores, álcool metílico, ésteres, aldeídos, e inorgânicas como o cobre, entre outros. Tais substâncias podem contribuir para o aroma e o sabor da bebida, além de estar relacionada com aspectos toxicologicamente nocivos dos destilados em geral (VALSECHI, 1960; AQUARONE *et al.*, 1983; SCHWAN *et al.*, 2001; ARESTA *et al.*, 2001).

1.5 O processo fermentativo na produção de cachaça

No Brasil, o processo de fermentação espontânea em dornas de fermentação aberta geralmente é empregado na fabricação de cachaça, sendo caracterizado por uma mistura de culturas microbianas com sucessões contínuas de espécies de leveduras. Alguns trabalhos de isolamento e seleção de leveduras, em que linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas são utilizadas na produção de cachaça, são relatados. Essas

linhagens são selecionadas por apresentarem características de adaptação às condições de estresse durante a fermentação, tais como: alta concentração de sacarose, alto teor de etanol, altas temperaturas, capacidade de floculação e alta capacidade fermentativa (VICENTE *et al.*, 2006).

O microrganismo normalmente empregado em grande escala, em processos fermentativos, tanto do mosto de cana-de-açúcar, mosto de uva, mosto da cerveja quanto também na produção de pães é a levedura ascomicética, *S. cerevisiae* (MAMEDE & PASTORE, 2004; KUYPER *et al.*, 2005; RAVANELI *et al.*, 2006). Suas células são elípticas, medindo entre 3 a 8 mm de comprimento entre 5-10 µm de largura (CARVALHO *et al.*, 2006). Podem apresentar tanto reprodução assexuada quanto sexuada. A reprodução assexuada é realizada através do brotamento e a reprodução sexuada a partir de eventos de meiose com formação ascósporo.

Apesar de *S. cerevisiae* ser a levedura predominante, outras espécie também participam efetivamente no processo fermentativo, durante a produção de cachaça, principalmente após 24 h, tais como: *Rhodotorula glutinis* e *Candida maltosa* (SCHWAN *et al.*, 2001). As espécies *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia heimii* e *Hanseniaspora uvarum* foram observadas apenas no início da fermentação; *Pichia subpelliculosa* e *Debaryomyces hansenii* no meio e fim da fermentação; e *Pichia methanolica* no final da fermentação (SCHWAN *et al.*, 2001). O principal açúcar encontrado no mosto é a sacarose, onde o primeiro passo para sua utilização pela levedura *S. cerevisiae* é a hidrólise extracelular, através da enzima invertase. Desta forma, obtém-se glicose e frutose, que são transportadas para o interior da célula, degradadas pela via glicolítica até piruvato e transformadas em etanol e gás carbônico pelo processo de fermentação alcoólica (BARNETT, 1981; GANCEDO; SERRANO, 1989). Em geral, a frutose é metabolizada mais lentamente que a glicose, podendo ocasionar fermentações incompletas com consequentes perdas de produtividade (BERTHELS *et al.*, 2004)

A presença quantitativa de diferentes espécies durante a fermentação e a sua influência no *bouquet* final de diferentes bebidas são determinadas pelas condições de fermentação, inóculo inicial de leveduras *S. cerevisiae*, temperatura de fermentação, concentração de oxigênio e composição do suco de uva (HEARD & FLEET, 1988; GAO & FLEET; 1988; HANSEN *et al.*, 2001; ERTEN, 2002). As linhagens de

leveduras devem possuir alta capacidade de produção de compostos secundários, especialmente os ésteres e álcoois superiores, que contribuem para conferir sabor e aroma ao produto final (VICENTE *et al.*, 2006).

1.5.1 Produção de ésteres

Os ésteres são formados a partir de ácidos orgânicos e alcoóis durante a fermentação, sendo que estes compostos secundários são fundamentalmente responsáveis pelo "aroma" típico dos destilados (KAOSOWSKI & CZUPRYNSKI, 2006). Porém, no que diz respeito à síntese de ésteres, existem duas categorias de ésteres importantes: os ésteres de acetato e os ésteres de ácido graxo de cadeia média. Do ponto de vista sensorial, os mais importantes são: acetato de etila; acetato de isoamila; acetato de feniletila (VERSTREPEN *et al*., 2003b). Comparados 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 (SOUZA, 2010).

Dentre os compostos físico-químicos mais importantes é um dos principais ésteres responsáveis no aroma da cachaça, é sintetizado a partir de álcool isoamílico e acetil-coenzima A, pela ação da enzima álcool-acetiltransferase e hidrolisado por esterases (YOSHIKAWA, 1999; MASON & DUFOUR, 2000; KAOSOWSKI & CZUPRYNSKI, 2006). Os ésteres são também hidrolizados por esterases específicas; desse modo, a produção de maiores teores de ésteres como o acetato de etila, o acetato de isoamila e o caproato de etila depende da disponibilidade dos precursores e do controle das atividades das enzimas envolvidas na síntese e na hidrólise destes compostos (LYNESS *et al.*, 1997; FUKUDA *et al.*, 1998; YOSHIKAWA *et al.*, 1999; LILLY *et al.*, 2000).

O álcool isoamílico também pode ser produzido a partir da via de biossíntese de leucina, coordenada pela enzima α-isopropil malato-sintase (CASALONE *et al*., 1997). Nesse caso, quando se aumenta a síntese de leucina, produz-se mais álcool isoamílico, precursor da produção de acetato de isoamila (CASALONE *et al.*, 1997).

Outro importante composto aromático produzido pelas leveduras é o caproato de etila (YOSHIKAWA, 1999). A síntese e o acúmulo de caproato de etila nas células das leveduras são dependentes da presença de precursores (etanol e ácido capróico), que controlam a enzima álcool acil-transferase e esterases (VERSTREPEN *et al.,* 2003a).

Segundo Vicente (2007), o análogo da L-leucina, TFL, é um composto que permite selecionar leveduras que perderam a capacidade de retro-inibição por L-leucina, e, como consequência, produzem maiores quantidades de álcool isoamílico e/ou acetato de isoamila.

Por outro lado, a cerulenina é uma droga inibidora da enzima ácido graxo sintase, permitindo, assim, selecionar leveduras que apresentam desregulação da biossíntese de ácidos graxos, podendo apresentar maior produção de ácido capróico e consequentemente, caproato de etila (VICENTE, 2007).

Em algumas bebidas, em especial em cervejas, 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 *et al.,* 2003c).

Outros avanços têm sido obtidos na análise e interpretação de ésteres em vinho, brandy e uísque (CAMPO *et al.,* 2006). As evidências sugerem que estes compostos são formados pela esterificação de álcool e ácidos formados por diferentes micro-organismos.

Portanto, a estratégia de usar linhagens que possam aumentar a produtividade e os teores de compostos secundários importantes nos aromas da cachaça é fundamental para o desenvolvimento e a padronização industrial deste produto (VICENTE *et al.,* 2006).

As quantidades mensuradas de compostos secundários variam muito entre as diversas marcas comerciais de cachaça, devido à condução dos processos de fermentação e a destilação, ultrapassando, em alguns casos, os níveis permitidos pela legislação (MAPA, 2005a). Torna-se, portanto, necessário o controle físico-químico do processo de fabricação da cachaça (PIGGOTT *et al.,* 1989; CERDAN *et al.,* 2002). Além disso, não há um padrão legal definido entre os processos de destilação, ou seja,

entre cachaça de coluna, ou destilada em coluna de retificação, e cachaça de alambique, destilada em alambique de cobre e/ou aço inoxidável, pois os compostos secundários (aldeídos, ésteres, álcoois, dentre outros) estão presentes em ambas, independentemente do processo de destilação.

Portanto, o manejo, o controle e a sistematização das operações unitárias da fermentação e da destilação são fatores fundamentais no desenvolvimento de estratégias de melhoria físico-química, sensorial e rendimento industrial da cachaça de qualidade.

1.6 Identificação geográfica (IG)

As Indicações Geográficas são reguladas pela Lei de Propriedade Industrial (nº 9279/96), sendo que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) é o responsável por estabelecer as condições de registro. De acordo com a Lei nº 9.279/96, a Lei da Propriedade Industrial vigente no Brasil, as indicações geográficas podem ser classificadas em uma simples dicotomia: indicação de procedência e denominação de origem.

A indicação de procedência relaciona-se com o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, conhecido como centro de extração, produção, fabricação de um determinado produto agropecuário ou extrativista, e tem como fundamento a notoriedade. Já a denominação de origem é caracterizada por uma área geográfica de país, cidade, região ou localidade de seu território, que designe produto ou serviço cujas qualidades ou características se devam exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos (art. 178).

A indicação geográfica é uma forma de agregar valor e credibilidade a um produto ou serviço, conferindo-lhes um diferencial de mercado em função das características de seu local de origem. Uma vez reconhecida, a indicação geográfica só poderá ser utilizada pelos membros daquela localidade que produzem ou prestam serviço de maneira homogênea.

A mais recente discussão no âmbito das indicações geográficas brasileiras envolve a cachaça. Como descrito anteriormente, a bebida é produzida a partir da cana-de-açúcar e é mundialmente conhecida como proveniente do Brasil. Portanto, era de se esperar que os órgãos internacionais de registro reconhecessem que o termo cachaça,

por sua definição, não deveria ser concedido como um bem de propriedade industrial a quem quer que o requeira (MACHADO, 2009).

A Associação Brasileira da Propriedade Intelectual (ABPI), dentro da sua comissão de estudos sobre as indicações geográficas, vem discutindo a possibilidade de se enquadrar a cachaça como uma indicação geográfica brasileira. Para tanto, vem estudando legislações estrangeiras que já vislumbram com certa tradição o instituto das denominações de origem, como França, Itália, Portugal e Espanha. A ABPI também vem estudando a apresentação de um projeto de lei que visa à regulamentação das denominações de origem no Brasil (MACHADO, 2009).

A consolidação da indicação geográfica para a cachaça e o presente momento da criação do "Regulamento de Uso" e do "Conselho Regulador" da indicação geográfica da bebida proporcionarão maior reputação e dinamismo da cachaça nos mercados internacionais e sua valorização no mercado interno, havendo, assim, a necessidade crescente de defender a observância aos padrões de identidade e de qualidade da bebida e maior governança na cadeia produtiva, como formas de preservar e aumentar sua valorização internacional e nacional (MACHADO, 2009).

No Brasil, foram registradas treze indicações de procedência no país: o vinho do Vale dos Vinhedos (RS), o café do Cerrado Mineiro (MG), a carne do Pampa Gaúcho (RS), o couro do Vale do Rio dos Sinos (RS), a cachaça de Paraty (RJ), as uvas e as mangas do Vale do Submédio São Francisco (BA/PE), os vinhos de Pinto Bandeira (RS), o café da Serra da Mantiqueira (MG), as panelas de barro de Goiabeiras (ES), o artesanato em capim dourado do Jalapão (TO), os doces de Pelotas (RS), o queijo do Serro (MG) e a cachaça de Salinas (MG). Por outro lado, há apenas duas denominações de origem, sendo estas as do arroz do Litoral Norte Gaúcho (RS) e os camarões da Costa Negra (CE).

Em junho de 2012, a região de Salinas recebeu o registro de indicação de procedência do INPI. A região reconhecida com a indicação de procedência do produto de qualidade compreende, além de Salinas, outros municípios circunvizinhos como Novorizonte parte de Taiobeiras, Rubelita, Santa Cruz de Salinas e Fruta de Leite, vinculadas à APACS (Associação dos Produtores de Cachaça de Salinas). O certificado foi concedido a 24 alambiques e uma cooperativa de 109 produtores da agricultura

familiar, integrantes da APACS, agregando, dessa forma, valor e diferenciação do produto com o dos concorrentes, produzidos em outras localidades.

1.7 A utilização de leveduras nativas como fatores de indicação geográfica

No Brasil, o Departamento de Propriedade Intelectual e Tecnologia da Agropecuária (DEPTA) MAPA, por intermédio da Coordenação de Incentivo à Indicação Geográfica de Produtos Agropecuários (CIG), trata de temas relacionados às indicações geográficas e políticas de incentivo correlatas. Porém, o conceito de indicação geográfica, no Brasil, ainda está em construção, tanto do ponto de vista do conhecimento dos produtos com IG – pelos produtores e consumidores além dos setores institucionais. Nesse contexto, torna-se necessário reforçar as competências dos profissionais brasileiros para promover, implantar, avaliar e consolidar as indicações geográficas no país.

A qualidade da cachaça está fortemente relacionada com a ecologia microbiana e suas populações, durante o processo de fermentação, sendo esses fatores determinantes para o rendimento do etanol e para a formação dos compostos secundários (GOMES *et al.,* 2009). Por outro lado, a produção desses compostos varia com as espécies e as linhagens de leveduras (DATO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.,* 2004, 2005).

Estudos têm monitorado populações de leveduras durante o processo fermentativo da produção de cachaça e foi observada também uma sucessão de espécies de leveduras, culminando com a predominância de *S. cerevisiae* (MORAIS *et al.,* 1997; PATARO *et al.,* 1998; PATARO *et al.,* 2000; GUERRA *et al.,* 2001; VICENTE *et al.,* 2006; GOMES *et al.,* 2007; SOUZA *et al.,* 2012). Isso ocorre devido à capacidade adaptativa desta espécie às condições fermentativas associadas à produção de cachaça, pois são boas competidoras no processo fermentativo, quando o caldo de cana-de-açúcar não passa por um tratamento de esterilização prévio, processo realizado a fim de diminuir a microbiota autóctone (GUERRA *et al.,* 2001; PATARO *et al.,* 2002b; GOMES *et al.,* 2007).

Portanto, pareceu-nos oportuno realizar um estudo sistemático sobre a população de células de leveduras predominantes na região de Salinas, conhecido centro produtor

de cachaça como uma estratégia de qualificação da Indicação Geográfica da região no sentido de obtenção da Denominação de Origem.

1.7.1 – Caracterização molecular de células de leveduras

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

As linhagens utilizadas no processo fermentativo estão associadas ao nicho ecológico e possuem um importante papel tanto na fermentação espontânea quanto na inoculada (COCOLIN *et al.*, 2004). Linhagens de *S. cerevisiae* diferem entre si significativamente em seu desempenho fermentativo e em sua contribuição para o aroma final e qualidade da bebida; entretanto, a maioria destas linhagens pertence à espécie *S. cerevisiae*, o que torna limitado o uso de métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos clássicos para sua distinção (BARROS LOPES *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2001).

Linhagens de *S. cerevisiae* diferem significativamente em seu desempenho, interferindo no sabor e na qualidade de vinhos e destilados. Isso levou ao desenvolvimento de métodos de identificação moleculares para diferenciação de linhagens de leveduras, permitindo, assim, o estudo da relação dessas diferenças com características que contribuam favoravelmente para a qualidade da bebida (LAMBRECHTS, 2000; PRETORIUS, 2002; PRETORIUS, 2005).

Atualmente, um grande número de linhagens selecionadas de leveduras tem sido utilizado para a produção de bebidas alcoólicas. A caracterização dessas linhagens é necessária para o controle da qualidade do produto final e do processo fermentativo, assegurando que este foi realmente conduzido pelas linhagens originalmente inoculadas (QUEROl *et al.*, 1992a). Assim, o uso de técnicas que tornem possível a distinção entre linhagens inoculadas e linhagens remanescentes presentes da microbiota indígena é importante e possui um grande interesse industrial (PLENGVIDHYA *et al.*, 2004).

Atualmente, além dos testes fisiológicos para identificação e separação de linhagens de leveduras, técnicas moleculares como cariotipagem, análises de DNA mitocondrial e amplicação de fragmentos de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) têm sido utilizadas (QUEROL *et al.,* 1992b; GUERRA *et al.,* 2001; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.,* 2001; MARIANGELI *et al.,* 2003; LEGRAS & KARST, 2003; SCHÜLLER *et al.,* 2004a; COCOLIN *et al.,* 2004). Cada um desses métodos permite uma distinção mais precisa entre as linhagens de *S. cerevisiae*, uma vez que a sistemática de leveduras baseada em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos provou ser inadequada e ineficiente para a determinação de espécies, principalmente em grupos de leveduras de perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces*. Embora estes critérios continuem sendo usados para identificação de um isolado não conhecido (BARNETT *et al.,* 1990), essas características morfo-fisiológicas e bioquímicas são determinadas apenas por uma pequena fração do genoma (BARROS LOPES *et al.,* 1998). Recentemente, características fenotípicas usadas na sistemática de leveduras têm sido combinadas com o emprego de técnicas moleculares que possibilitem o acompanhamento da dinâmica de populações de micro-organismos durante o ciclo fermentativo (QUEROL *et al.,* 1992a; COMI *et al.,* 2000).

Uma das ferramentas de identificação de micro-organismos trata-se da análise de fragmentos de restrição do rDNA amplificados por PCR, designada por ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado). Essa análise baseia-se na diferença de comprimento dos fragmentos resultantes da clivagem por endonucleases de um fragmento de rDNA amplificado. Para realizar a análise são escolhidos determinados locais do rDNA, amplificados por PCR.

Esta metodologia tem permitido a diferenciação de leveduras ao nível de espécie (BALEIRAS-COUTO *et al.,* 1995; ESTEVE-ZARZOSO *et al.,* 1999; BALEIRAS-COUTO *et al.,* 2005; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.,* 2006). Baleiras-Couto e colaboradores (2005) analisaram a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação de vinho tinto. A análise incidiu sobre os padrões de restrição obtidos, pelas enzimas *MseI, HinfII* e *ApaI*, a partir de regiões amplificadas do rRNA. Foram diferenciados 19 perfis de um total de 121 estirpes isoladas de leveduras não-*Saccharomyces*. A identificação das espécies foi confirmada por sequenciamento do

domínio D1/D2 da região 26S do rDNA, verificando, assim, uma correlação entre os resultados obtidos.

Nos últimos anos, novas metodologias baseadas no polimorfismo de DNA foram desenvolvidas para linhagens de leveduras filogeneticamente relacionadas, especialmente para a indústria do vinho. A técnica de cariotipagem, em que a separação cromossômica é realizada por eletroforese de campo pulsado (PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), revelou considerável variabilidade na constituição cromossomal de linhagens comerciais de leveduras utilizadas na indústria do vinho, sendo, então, um importante método para identificação de espécies de leveduras. Porém, a cariotipagem cromossômica tem como desvantagem a sua elevada complexidade, sendo cara, laboriosa e demorada, impedindo sua utilização para um grande número de isolados (QUEROL *et al.*, 1992b; FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2001; SCHULLER *et al.*, 2004a).

Outra técnica utilizada é o mt-DNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA*), onde o polimorfismo do DNA-mitocondrial (mtDNA) é utilizado para caracterizar leveduras utilizadas na indústria da cerveja e do vinho. A digestão do DNA mitocondrial por enzimas de restrição como a *HinfI* ou *RsaI*, associado ao alto polimorfismo genético, tem sido usada para estudar a autenticidade de linhagens comerciais de leveduras (QUEROL & BARRIO, 1990; QUEROL *et al.*, 1992b; GUILLAMON *et al.*, 1994; LOPEZ *et al.*, 2001).

Um método que utiliza PCR é o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Essa técnica se baseia na amplificação de regiões randômicas usando iniciadores "específicos ou não". Um exemplo descrito para *S. cerevisiae* é a utilização dos iniciadores *EI1* e *LA*. Uma vez que os íntrons não são essenciais para as funções gênicas, eles apresentam sequências não conservadas e variáveis que podem ser usadas para identificação de espécie e intraespécie. A vantagem dessa técnica é analisar muitas amostras rapidamente, permitindo monitorar a multiplicação das leveduras, no processo fermentativo (PATARO *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2001).

A investigação da variação genética possibilitou o desenvolvimento de outro método, para diferenciação de linhagens e espécies de leveduras, que baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos de DNA específicos seguida de clivagem por enzimas de restrição e análise dos fragmentos gerados. Essa técnica é denominada de

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Apesar de ser uma importante técnica para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae*, sua aplicação na rotina do controle de qualidade industrial pode ser inviabilizada pelo longo tempo exigido para emissão do resultado (DE BARROS *et al.,* 1999; FERNANDEZ-ESPINAR *et al.,* 2001).

Ainda utilizando o método de PCR, a variação no íntron COXI tem sido observada entre linhagens e entre espécies, permitindo a diferenciação de linhagens de *S. cerevisiae.* Uma reação de PCR multiplex com quatro *primers* selecionados mostrou-se efetiva na análise de polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho (LOPEZ *et al.,* 2003).

Outra técnica utilizada para a identificação de leveduras é a análise de microssatélites, que são sequências de DNA de pequenos motivos repetidos (1-10 nucleotídeos), dispostos lado a lado, dispersos pelo genoma (procariotos e eucariotos) e que mostram variação no número de repetições entre diferentes espécies ou intraespécie. Essas repetições são provavelmente consequência de "escorregadas" (*slippage*) durante a replicação do DNA (FIELD & WILLS, 1998), recombinação desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA (SALLES *et al.,* 2003). Modificações na base do sistema do marcador microssatélite geraram o marcador ISSR. Os microssatélites também são conhecidos por *simple sequence repeats* (SSR) ou *short tandem repeats* (STR) (BUSCHIAZZO & GEMMEL, 2006).

Além disso, são classificados de acordo com número de motivos repetidos como mono, di, tri, tetra (os mais comuns) penta e hexanucleotídeos e também de acordo com o tipo de sequência repetida, como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (OLIVEIRA *et al.,* 2006).

O uso de marcadores microssatélites nas análises genéticas oferece inúmeras vantagens em relação a outros tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP): são altamente informativos (SALLES *et al.,* 2003); são de herança codominante (PEREZ *et al.,* 2001a) o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são multialélicos; ocorrem abundantemente no genoma dos eucariotos; são baseados em PCR, portanto, exigem uma pequena quantidade de DNA; são altamente reprodutíveis; estão bem dispersos nos genomas, em regiões codificadoras e não codificadoras (SALLES *et al.,* 2003).

Os primeiros ensaios de genotipagem por microssatélites em leveduras foram feitos no final da década de 90 para identificar linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae*. Mais recentemente eles têm sido usados para identificar linhagens industriais e linhagens patogênicas dessa mesma espécie (RICHARD *et al.,* 2008). A análise de microssatélites é uma técnica que está sendo utilizada para a diferenciação de linhagens de leveduras utilizando a amplificação de iniciadores de microssatélites. Alguns microssatélites têm sido utilizados com sucesso para caracterização e discriminação de linhagens de *S. cerevisiae* (BALEIRAS COUTO *et al.,* 1996; SILVA FILHO, 2003; SOUZA *et al.,* 2012). Silva-Filho e colaboradores (2005) utilizaram o *primer* (GTG) para mostrar a sucessão de leveduras, durante a fermentação para produção de álcool combustível. Os resultados mostraram que linhagens de *S. cerevisiae* indígenas presentes no caldo de cana podem ser mais adaptadas ao processo industrial de obtenção do etanol. Os autores também identificaram que linhagens *S. cerevisiae* indígenas dominaram a população de leveduras. Os resultados confirmaram o potencial desse marcador como ferramenta rápida e confiável para a discriminação de leveduras ao nível de linhagens e espécie.

A utilização de microssatélites também inclui o estudo dos *loci* de microssatélites que estão espalhados por todo o genoma de um organismo, que é possível pelo sequenciamento do genoma (BRADBURY *et al.,* 2005). Nesse caso, a sequência completa do genoma de *S. cerevisiae* permitiu a identificação dessas regiões como os tamanhos absolutos dos marcadores de microssatélites conhecidos. Alguns dos *loci* usados mais frequentemente são: YOR267C, SC8132X, SCPTSY7 (TECHERA *et al.,* 2001); ScAAT1-ScAAT6 (SCHULLER *et al.,* 2004); YML091C, YOL109 W, YFR028C, YPL009C, YDR160 W, YLL049, YBR240C, YGL014 W e YGL139 (RICHARDS *et al.,* 2009). Esses *loci* também podem ser usados para várias amostras de reações de PCR multiplex onde dois ou mais *loci* são amplificados (VAUDANO & GARCIA-MORUNO, 2008; RICHARDS *et al.,* 2009). Resultados são expressos como um número de repetições de *locus*. Esses *loci* foram identificados e utilizados em estudos para diferenciação entre linhagens de *S. cerevisiae* (FIELD & WILLIS, 1998; TECHERA *et al.,* 2001; PEREZ *et al.,* 2001b; MALGOIRE *et al.,* 2005) e avaliados para distinguir linhagens de leveduras disponíveis comercialmente (SCHULLER *et al.,*

2004; LEGRAS *et al.*, 2005; BRADBURY *et al.*, 2005; VAUDANO & GARCIA-MORUNO, 2008).

Uma das vantagens dessa técnica é seu caráter altamente reprodutível, gerando abundante polimorfismo. Envolve ainda amplificações de DNA genômico, utilizando um único *primer*. Além da desobrigação de obter informações sobre a sequência que flanqueia parte do genoma, a análise de ISSR é tecnicamente mais simples do que muitos outros sistemas marcadores (LIU & WENDEL, 2001).

Apesar de ser uma técnica muito promissora para a diferenciação de linhagens de *S. cerevisiae*, do ponto de vista da aplicação industrial, tem a desvantagem de utilizar equipamentos muito caros e apresentar demora em emitir laudos (PEREZ *et al.*, 2001; HOWELL *et al.*, 2004; MARINANGELI *et al.*, 2004; LEGRAS *et al.*, 2005).

Por ser um método simples, econômico, eficiente e principalmente rápido, a utilização dos marcadores microssatélites para análise da diversidade de linhagens de leveduras presentes no processo fermentativo das destilarias pode ser uma ferramenta para o controle da permanência da linhagem selecionada nas dornas de produção de cachaça.

Mais recentemente outras metodologias de sequência de DNA têm sido estudadas, as quais são designadas por segunda geração de sequenciamento de DNA, como, o sequenciamento eletroforético realizado em microchips, o sequenciamento por hibridação e em tempo real. Nos últimos anos, têm sido estudadas várias aplicações para essa geração de sequência e a sua aplicação passa pelo ressequenciamento do genoma completo para a descoberta de mutações ou polimorfismos, mapeamento de rearranjos estruturais, análise de metilações no DNA, entre outras (SHENDURE & JI, 2008).

1.7.2 A Denominação de Origem para a cachaça produzida em Salinas

O mercado da cachaça tem passado por transformações configuradas, principalmente pela busca crescente por um produto de qualidade e padronizado. Com isso, o isolamento de leveduras a partir das unidades produtivas em diferentes regiões do país tem o intuito de facilitar a utilização desse fator natural (leveduras existentes apenas na região escolhida) em processos de delimitação de uma área produtiva.

Acresça-se a isso que a seleção de linhagens de leveduras com qualidades fermentativas superiores e a sua consequente aplicação na produção de cachaça, através da técnica de fermentação assistida, poderá se constituir em aumento da qualidade e de padronização do produto obtido, consequentemente melhorando a qualidade da cachaça e a adequação à legislação brasileira. Isso seria garantido com a reinoculação de uma determinada linhagem de levedura para manter a predominância ao longo da safra de produção. Se ainda for possível identificar no produto assim obtido a existência de um marcador físico-químico específico, estaria assim criada a possibilidade de reivindicação de "Denominação de Origem" para a cachaça produzida nas regiões indicadas. Fator importante, a Indicação Geográfica é um mecanismo para agregar valor e diferenciar os produtos frente aos concorrentes.

Além dessas vantagens, outras também garantem repercussões positivas, por exemplo, a fidelização do consumidor, que, sob a etiqueta da indicação geográfica, encontrará um produto de qualidade com características regionais; o incremento na comercialização dos produtos, facilitando o acesso aos mercados através da propriedade coletiva; o aporte de maior competitividade no mercado internacional, uma vez que as indicações geográficas projetam imagem associada à qualidade e tipificação do produto, promovendo garantia institucional de qualidade, reputação e identidade do produto.

Tendo em vista que a região de Salinas (MG) é um importante centro de produção de cachaça, tendo recebido recentemente o selo de Indicação de Procedência, nosso trabalho pretendeu caracterizar bioquímica e molecularmente linhagens de leveduras, provenientes de diferentes unidades de produção de cachaça da microrregião, visando criar as bases para o fortalecimento da identificação geográfica da bebida, criando, assim, uma possibilidade de obtenção da Denominação de Origem para a cachaça produzida na região.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e caracterizar bioquímica e molecularmente linhagens de *S. cerevisiae* a fim de utilizá-las na produção de cachaça de alambique e como indicadores geográficos da microrregião de Salinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Isolar linhagens de *S. cerevisiae* oriundas de diferentes dornas de fermentação da microrregião de Salinas (MG), visando à sua utilização no processo de produção de cachaça de alambique;

b) Selecionar as linhagens de leveduras com características apropriadas para atender às condições empregadas no processo produtivo da cachaça, tais como: resistência às condições estressantes (alto teor de sacarose; elevados teores de álcool), resistência a micocinas, capacidade de produzir compostos *on-flavor* (álcoois superiores e ésteres) e baixa produção de compostos *off-flavor* (ácido sulfídrico);

c) Realizar fermentações em escala de laboratório, piloto e de produção, para confirmar produção de compostos aromatizantes pelas linhagens de leveduras selecionadas;

d) Caracterizar a nível molecular a/as linhagem/s cujo produto resultante seja considerado o melhor do ponto de vista físico-químico e sensorial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento e seleção das leveduras

Para a realização do isolamento e da seleção das leveduras utilizadas nesse trabalho foram realizadas coletas de amostras do mosto fermentado (250 mL), no ano de 2008, em alambiques localizados na microrregião de Salinas – MG. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 8 ºC. Em seguida, o isolamento e a seleção das leveduras foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto (MG).

A Figura 1 representa o mapa da microrregião de Salinas, em destaque os distintos alambiques onde foram coletadas as amostras de mosto fermentado para isolamento e seleção das leveduras.

3.2 Manutenção das culturas de leveduras

As culturas de leveduras isoladas e selecionadas foram mantidas em meio sólido YP agar 2% (p/v) e dextrose 2% (p/v), a 4 ºC e estocadas em meio YP dextrose 2% (p/v), acrescido de glicerol 10% (p/v) a –80 °C.

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Meio YP

O meio YP (Yeast Peptone) é composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona 2% (p/v). Para o meio sólido, foi acrescentado agar 2% (p/v).

3.3.2 Meio YNB (DIFCO Laboratories)

O meio Yeast Nitrogen Base (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

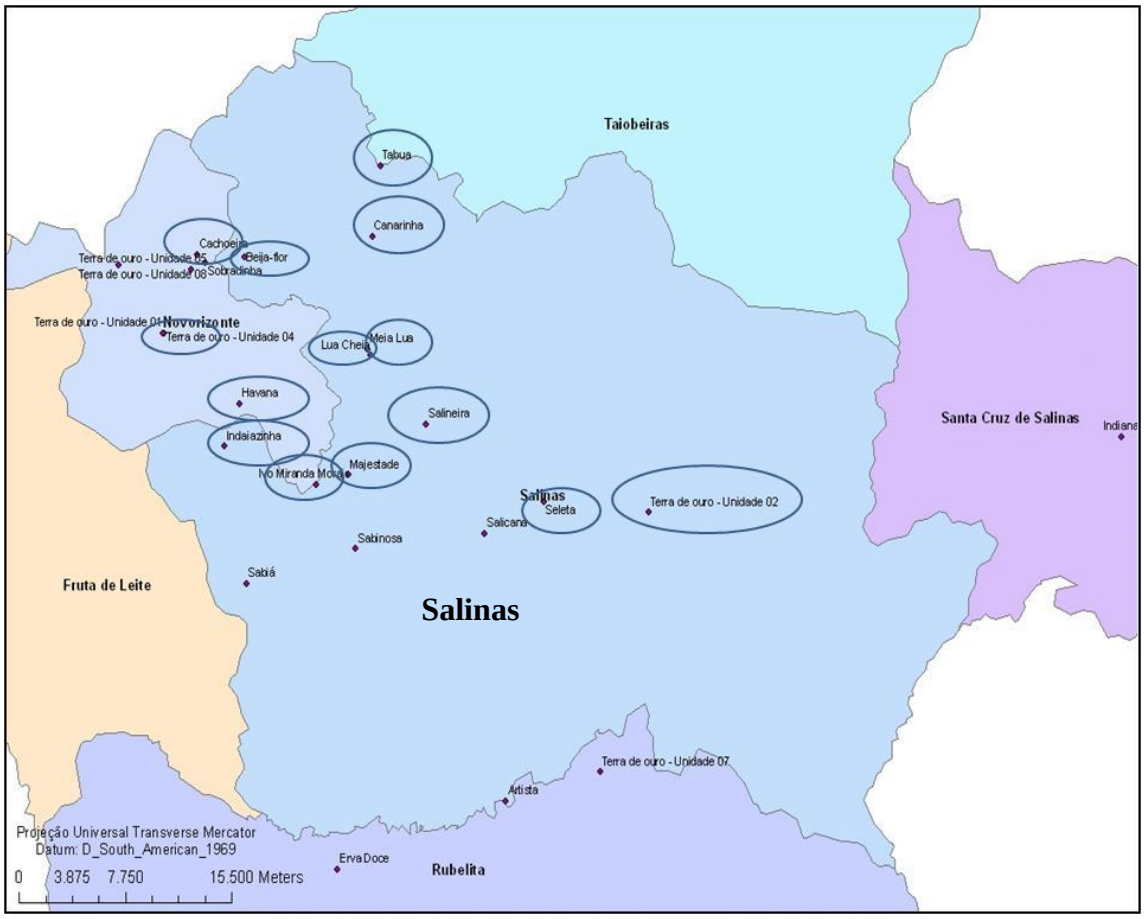


Figura 1. Mapa de localização dos alambiques onde foram coletadas amostras de mosto fermentado para isolamento e seleção das leveduras da microrregião de Salinas – MG.

Como fonte de carbono e energia foram utilizadas diferentes fontes de carbono, como: glicose, manitol, lactose, sacarose, galactose, maltose, rafinose, glicerol, etanol.

3.3.3 Meio YP caldo de cana 10% agar

O meio YP caldo de cana é composto por caldo de cana recém-colhido, extrato de levedura 10 g/L, bacto-peptona 20 g/L e agar 2 g/L. O caldo de cana foi esterelizado separadamente do meio. No momento do plaqueamento adicionou-se 100 µg/mL do antibiótico cloranfenicol para prevenir o crescimento de bactérias (PATARO *et al*., 2000).

3.3.4 Meio Mínimo

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

3.3.5 Meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories)

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

3.3.6 Meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories)

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

3.3.7 Meio YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose – Methylene Blue)

O Meio YEPD-B é composto por extrato de leveduras (1%), peptona (2%), glicose (2%) e agar (3%) em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,5. No momento de

plaqueamento adiciona-se 0,01% de azul de metileno (MORAIS *et al*., 1997; PATARO *et al.,* 1998, VICENTE, 2007).

3.4 Isolamento das leveduras

A metodologia usada neste trabalho foi conforme descrita por Vicente (2007). Onde as amostras de mosto coletados foram submetidas à diluição seriada em água estéril (1:10; 1:100 e 1:1000) e alíquotas de 100 µl foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri 150 mm de diâmetro contendo o meio YP caldo de cana 2% e cloranfenicol 100 µg/mL e incubadas a 30 °C por 72 horas. Foram isoladas aproximadamente 480 colônias de leveduras de cada amostra coletada. Essas colônias foram transferidas por "replica plating" para placas contendo YPD e incubadas a 30 ºC por 48 horas.

3.4.1 Testes bioquímicos para identificação taxonômica das leveduras

As leveduras isoladas foram submetidas a testes bioquímicos de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de nitrogênio. Após o crescimento, as leveduras foram transferidas por "replica plating" para meio YNB contendo a fonte de carbono a ser testada e meio YPD 2% para manutenção da cultura e incubadas a 30 ºC por 48 horas. As leveduras com características compatíveis com *S. cerevisiae* de acordo com a metodologia desenvolvida por Vaughan-Martini e Martini (1993) foram selecionadas e submetidas aos demais testes de assimilação de fontes de nitrogênio.

Para tanto, as leveduras foram inoculadas por "replica plating", em placas de Petri contendo meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) e lisina. As placas foram incubadas a 30 ºC por 48 horas e o crescimento foi observado. As leveduras que apresentaram crescimento de acordo com a chave de identificação para *S. cerevisiae* foram submetidas aos demais testes.

3.4.2 Testes de Floculação

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Em seguida foram feitos inóculos em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio YPD 2%. Esses tubos foram incubados por 24 horas, a 28 °C, sob agitação a 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Após esse período, uma alíquota de 50 µl da amostra em estudo e 950 µl de meio YPD 2% foi transferida assepticamente para uma cubeta e medido a $DO600_{nm}$ em um espectrofotômetro (Beckman Modelo DU-68). A amostra era incubada até atingir uma $DO600_{nm}$ igual a uma unidade e a floculação foi observada visualmente sua decantação (D'HAUTCOURT & SMART, 1999; JIN & SPEERS, 1998; JIN & SPEERS, 2000; POWELL *et al*., 2003; VERSTREPEN *et al*., 2001; VERSTREPEN *et al*., 2003b; VICENTE, 2007).

3.4.3 Medida da produção de H_2S

As leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Após este período, as leveduras foram inoculadas em meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories) e incubadas a 30 °C durante 72 horas. As colônias que apresentavam coloração negra após o término do tempo de incubação foram consideradas produtoras de H_2S (JIRANEK *et al*., 1995b; JIRANEK *et al*., 1995a; VICENTE, 2007).

3.4.4 Medida da produção e resistência a micocinas

As leveduras foram crescidas em placas contendo YPD e incubadas a 30 ºC por 48 horas. Após o crescimento as colônias de leveduras foram submetidas à diluição em 1 mL de solução salina (0,9% de NaCl) sendo que 100 µL de solução contendo a levedura *Cândida glabrata* NCYC 388 e uma sensível ao padrão *S. cerevisiae* NCYC 1006, foram inoculados no meio MeioYEPD-B com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essas linhagens foram utilizadas como linhagens sensíveis e produtora de micocinas, respectivamente Em seguida aplicou-se 5 µL da levedura teste em pontos previamente

identificados. As placas foram, então, incubadas a 25 ºC durante 7 dias para verificar a produção e a resistência ou sensibilidade a micocinas. As linhagens foram identificadas como produtoras de micocinas pela formação de um halo azul escuro próximo à colônia teste (MORAIS *et al*., 1997; PATARO *et al*., 1998; VICENTE, 2007).

3.4.5 Tolerância ao estresse

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

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Posteriormente, as leveduras foram transferidas para YP galactose 2%, YP maltose 2%, YP glicose 2%, YP glicose 20%, YP sacarose 20%, YP etanol 8 e 10%, e incubadas a 30 °C e 37 °C por 72 horas (VICENTE, 2007).

3.4.7 Teste de resistência a 5,5',5"-trifluoro-DL-leucina (TFL) e cerulenina

3.4.7.1 Teste de sensibilidade natural a TFL

As leveduras foram inoculadas em placas contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Em seguida, as leveduras foram transferidas por "replica plating" para meio mínimo contendo glicose (2%) como fonte de carbono, suplementadas e não com 1 mM de TFL. Essas placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas. As linhagens de levedura que crescem em tais condições são consideradas resistentes a TFL (ASHIDA *et al.*, 1987; CASALONE *et al*., 1997; BENDONI *et al*., 1999; CAVALIERI *et al*., 1999 *apud* VICENTE, 2007).

3.4.7.2 Teste de sensibilidade natural a cerulenina

As leveduras foram inoculadas em placas contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Em seguida, as leveduras foram transferidas por "replica

plating" para meio mínimo contendo glicose (2%), suplementadas e não com 25 µM de cerulenina. Essas placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas. As linhagens de levedura que crescem em tais condições são consideradas resistentes a cerulenina (ICHIKAWA *et al.*, 1991; ARIKAWA *et al*., 2000; VICENTE, 2007).

3.5 Determinação da atividade enzimática da invertase

3.5.1 Inoculação e crescimento das células.

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 72 horas. Após este período, as leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YPD 4% e de meio YP Rafinose 2% 24 horas, a 28 °C, sob agitação (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). O crescimento foi monitorado por medidas de $DO600_{nm}$ em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68). Prosseguiu-se o crescimento das leveduras até que a $DO600_{nm}$ atingisse uma unidade (SALGADO *et al.*, 2002).

3.5.2 Preparo de extratos celulares para determinação da atividade da enzima invertase

Cerca de 5 mL de cultura com $DO600_{nm}$ = 1 foram centrifugadas por 5 minutos, 4 °C, 1000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso em 3 mL de água destilada gelada. A amostra foi novamente centrifugada; o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 3 mL de tampão imidazol 200 mM (Imidazol 200 mM, $MgCl_2$ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7) e centrifugado nas mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de tampão imidazol 50 mM (Imidazol 50 mM, $MgCl_2$ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7) e 0,5 g de pérola de vidro a cada tubo. As células foram rompidas por agitação em vortex (3 X 60 segundos) com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Após esse procedimento, adicionou-se 2,5 µl de 100 mM PMSF (Phenylmetyl Sulphonyl Fluoride). O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga tipo eppendorf 1,7 mL e centrifugado por 5 minutos, a 3500 rpm (Heraeus Sepatech,

Biofuge 13). O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de amostra do aparelho de dosagem bioquímica (COBAS-FARA Roche®). O extrato livre de células foi estocado em temperatura de –20 °C até o momento da dosagem (SALGADO *et al*., 2002; VICENTE, 2007).

3.5.3 Dosagem da enzima invertase

A dosagem da enzima invertase foi realizada em um aparelho de dosagens bioquímica (COBAS-FARA Roche®). Foi utilizada como substrato para a reação uma solução de sacarose 0,3 M em acetato de potássio 100 mM, pH 5,1. Após 5 minutos de incubação a 30 °C, a reação era interrompida pela adição de NaOH 1 M e, em seguida, adicionado igual volume de HCl 1 M para neutralizar o pH da reação. Após esse procedimento, a glicose liberada foi determinada pelo método glicose-oxidase/peroxidase, tendo a ortodianisidina como reativo de cor e a leitura da absorbância foi feita a 546 nm. A atividade da enzima invertase foi expressa em nmoles de glicose. mg proteína^{-1}.min^{-1}. (GOLDSTEIN & LAMPEN, 1975; CELENZA & CARLSON, 1989; VICENTE, 2007).

3.6 Fermentações em escala piloto e ambiente de produção

3.6.1 Preparo do inóculo e multiplicação das leveduras

As leveduras foram estriadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% (p/v) e incubadas a 30 °C, por 48 horas. Após esse período, as leveduras foram inoculadas em 5 mL de meio YPD 2% (p/v) e incubadas a 28 °C, por 24 horas, sob agitação a 200 rpm (Incubador rotatório New Brunswich Model G25). Após esse período, a alíquota foi inoculada em 20 mL de meio YPD 2% (p/v), incubada a 28 °C, por 24 horas, sob agitação a 200 rpm. Essa alíquota foi transferida para 100 mL de meio YPD 2% (p/v), incubada a 28 °C, por 24 horas, sendo então transferida para 1000 mL de caldo de cana, previamente esterelizado, diluído a 5 °Brix final (p/v) e acrescido de extrato de levedura. As culturas foram incubadas a 28 °C, por 24 horas, sob agitação a 200 rpm.

Foi realizada essa etapa até obtenção de uma massa celular suficiente para iniciar a multiplicação das leveduras

A multiplicação das leveduras foi realizada em baldes plástico estéreis (Figura 2a), utilizando 10 L de caldo de cana-de-açúcar esterilizado, adicionado de extrato de levedura a 1% (p/v), diluído a 5 °Brix, sob aeração constante, feita através de injeção de ar, por compressor (BIG AIR modelo A 420), com capacidade de bombeamento de 4,5 litros de ar/minuto. Em seguida, as leveduras pré-crescidas foram inoculadas nesse meio, sendo que após seu crescimento e até que o caldo atingisse zero ºBrix, o vinho resultante foi separado das células e descartado (Figura 2b). Às células obtidas foi adicionado novo volume de caldo de cana 10 L, nas mesmas condições citadas anteriormente. Essa etapa de abastecimento foi repetida até a obtenção de uma massa celular suficiente, para iniciar o processo fermentativo.

Essa massa celular (pré-cultura) (Figura 2c) foi inoculada em 5 L de caldo de cana, em dornas de fermentação de inox com capacidade para 50 L, na concentração de 10^9 células/mL. Dando início à formação do pé de cuba, que representava 20% do volume útil da dorna de fermentação, o abastecimento com caldo de cana foi gradativo em relação ao volume 3 L e ao teor do ºBrix, 7, 9, 11, 13, 15, totalizando um volume final de 20 L, colocado em repouso, por 24 horas. Com esse processo esperava-se a adaptação das leveduras a um meio com concentração de sacarose superior ao utilizado na multiplicação das células, para o processo fermentativo. Após esse período, foram retirados 10 L do volume final obtido e descartado, sendo o restante denominado pé de cuba.

Já para a produção em escala de produção, foram utilizadas duas linhagens selecionadas, sendo que o preparo do inóculo foi realizado conforme descrito anteriormente. No entanto, a multiplicação das leveduras foi realizada em um biorreator-fermentador (Tecnal, modelo 15) com rotação do motor de 150-200 (rpm), 20% de aeração e temperatura a 30 °C. Foi utilizado caldo de cana-de-açúcar estéril, adicionado de extrato de levedura a 1% (p/v), diluído a 5 °Brix. As leveduras pré-crescidas foram inoculadas nesse meio, sendo que após seu crescimento e o caldo atingir a zero ºBrix, o vinho resultante foi separado das células e descartado. Às células obtidas foi adicionado novo volume de caldo de cana 10 L, nas mesmas condições citadas anteriormente. Essa etapa de abastecimento foi repetida até a obtenção de uma

Figura 2. Processo de multiplicação das linhagens de levedura (a), massa celular depois da retirada do vinho (b) e massa celular da linhagem LBCM 680 (c), selecionada na microrregião de Salinas, utilizando baldes plásticos com capacidade de 20 L e caldo de cana-de-açúcar estéril diluído a 5 ºBrix.

Figura 3. Propagador em aço inoxidável asséptico utilizado para a realização da propagação das células de leveduras, até obtenção de massa celular suficiente para abastecimento das dornas para produção de cachaça.

massa celular suficiente, para iniciar o processo de propagação das leveduras. Para a propagação das leveduras em escala de produção, foram utilizadas duas linhagens de leveduras (LBCM 678 e LBCM 680), selecionadas de dornas de fermentação da produção de cachaça, da microrregião de Salinas-MG. Essas leveduras foram multiplicadas em um propagador de camisa dupla em aço inoxidável de produção local na tornearia Xavier, onde se trabalhava em um ambiente asséptico (Figura 3), com o objetivo de aumentar a quantidade de massa celular.

Foi usado caldo de cana pasteurizado (90 °C), a 7 °Brix, e as leveduras foram crescidas por 24 horas, sob agitação de 25 a 32 rpm. Essa massa celular (pré-cultura) foi inoculada em 250 L de caldo de cana 9 ºBrix, em dornas de fermentação de aço inoxidável com capacidade para 1000 L, na concentração de 10^9 células/mL.

A extração do caldo de cana foi feito por meio de uma moenda de um terno (marca FALK 12 x 16), filtrado em uma peneira (Figura 4a). Em seguida passando pelos processos de decantação e diluição para 15° Brix, com adição de água (Figura 4b).

3.7 Parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos avaliados foram acompanhados diariamente sendo eles: consumo de sólidos solúveis (ºBrix), acidez total do vinho e teor alcoólico do vinho. Ao término da primeira fermentação, foram retirados 80% do vinho para destilação, sendo as dornas de fermentação reabastecidas com caldo de cana. Tal processo foi realizado durante 10 ciclos fermentativos. O experimento em escala piloto foi realizado no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – Campus Salinas - Salinas, (MG). Já o de escala de produção foi realizado na fazenda Experimental Santa Isabel do IFNMG – Campus Salinas.

3.7.1 Coleta das amostras para o acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo

A cada 0, 3, 6 e 9 dias, uma alíquota de 100 mL do mosto foi coletada assepticamente das diferentes dornas e foi inoculada em meio YPD 2% e incubada a 30 °C por 48 horas. Após esse período, foram coletadas aleatoriamente 100 colônias de

Figura 4. Caldo de cana sendo filtrado em peneira de aço inoxidável 2 mm (a), processo de decantação e diluição do caldo de cana-de-açúcar e aferição do ºBrix (b) para produção da cachaça.

cada placa de petri e inoculada em YPD 2% e incubada a 30 °C por 48 horas. Essas leveduras foram utilizadas para avaliação da prevalência e permanência das linhagens nas dornas de fermentação.

3.7.2 Fermentação em escala piloto e em escala de produção

O abastecimento das dornas de fermentação em escala piloto foi realizado gradativamente por três vezes (Figura, 5a), totalizando um volume final de 40 L. Sobre o pé de cuba que se encontrava com zero ºBrix, adicionavam-se 10 L de caldo a 15 ºBrix. Após o ºBrix do mosto atingir 3 ºBrix, as dornas de fermentação foram reabastecidas com mais 10 L de caldo de cana a 15 ºBrix. Esse processo foi repetido até o volume útil da dorna de fermentação alcançar 40 L (Figura, 5b), sendo que, após o último abastecimento, o meio foi colocado em repouso até zerar o ºBrix. O vinho obtido subsequentemente foi encaminhado para destilação, permanecendo nas dornas um volume de cerca de 20% de inóculo (pé-de-cuba), sendo reiniciado o reabastecimento das dornas de fermentação.

A taxa de consumo de sólidos solúveis (°Brix) foi determinada por medidas em refratômetro eletrônico portátil (marca ANTON PAAR modelo DMA 35A), com compensação automática de temperatura, a cada abastecimento.

O processo fermentativo em escala de produção foi realizado em quatro dornas de aço inoxidável com capacidade total de 1000 litros, sendo o volume útil de 800 litros, as fermentações foram realizadas em duplicata das duas linhagens selecionadas.

O abastecimento das dornas foi realizado gradativamente com caldo de cana-de-açúcar a 15 ºBrix, aferido por meio do sacarímetro de ºBrix (HG Brasil), num total de três abastecimentos, totalizando um volume final de 750 litros (Figura 5c). Após o último abastecimento deixava-se o mosto em repouso até zerar o ºBrix. O vinho subsequentemente era encaminhado para destilação, permanecendo nas dornas um volume de 20% do inóculo (pé-de-cuba) para a próxima fermentação.

As fermentações duraram aproximadamente 24 h, quando o teor de sólidos em suspensão (ºBrix) atingiu zero (Figura 5d). O vinho, então, era retirado para as dornas volantes onde era encaminhado para os alambiques. Após essa etapa de retirada e

Figura 5. Dornas em aço inoxidável com volume útil de 40 L, utilizadas nas fermentações em escala piloto no laboratório de microbiologia do IFNMG – Campus Salinas. Abastecimento gradativo das dornas (a) dornas abastecidas (b) dornas em aço inoxidável em processo fermentativo com volume útil de 800 L (c), dornas em final de fermentação em escala de produção (d) na produção de cachaça.

encaminhamento do vinho para a destilação, dava-se início ao reabastecimento das dornas. Sendo realizado 9 ciclos fermentativos.

Ao término de cada fermentação foram realizadas análises da acidez total e teor alcoólico do vinho conforme descrito nos itens 3.8.1 e 3.8.2.

3.7.3 Destilação em alambique de cobre

O mosto fermentado (vinho), deslevedurado por decantação, foi analisado quanto à acidez do vinho e grau alcoólico. A seguir foi encaminhado à destilação em um alambique de cobre com capacidade de 40 litros (Figura 6a), aquecido e mantido a temperatura interna em torno de 90 °C visualizado por um termômetro. O processo da destilação do vinho da escala de produção, foi realizado em dois alambiques simples de cobre e de um só corpo (Figura 6b), com capacidade útil de 600 litros, com termômetro, aquecimento a vapor e manômetro digital.

O destilado total foi fracionado em três partes: a primeira (5% do volume, correspondente à fração "cabeça"), a fração intermediária (80% do volume correspondente fração "coração") e a última (15% do volume, correspondente à fração "cauda" e descartada após destilação) utilizando a seguinte fórmula para determinação do volume a ser destilado:

$$VD = \frac{TAV \times VV}{TAC} \text{ onde:}$$

VD: Volume total de destilado;
TAV: Teor alcoólico do vinho;
VV: Volume do vinho;
TAC: Teor alcoólico da cachaça.

A fração do "coração" foi acondicionada em garrafas de vidro para as análises físico-químicas e teste de preferência.

Figura 6. Alambique de cobre para obtenção da cachaça, volume útil 40 L e aquecimento com fogo direto (a). Alambique de cobre, simples de um só corpo com volume útil de 600 L, com termômetro, aquecimento a vapor e manômetro digital, utilizado nas destilações em escala de produção (b).

3.8 Análises físico-químicas

3.8.1 Acidez total do mosto

A acidez total do mosto foi determinada por titulometria, com solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L, segundo as normas da ABNT (1997b). Sendo que, no final da fermentação, retirou-se 10 mL do vinho, transferiu-se esse volume para o erlenmeyer, completando esse volume para 100 mL com água destilada, e solução de fenolftaleína 1% como indicador, e por fim realizou-se a titulação com uma solução padrão de NaOH até a viragem do indicador.

3.8.2 Grau alcoólico do vinho (%)

O grau alcoólico foi determinado pelo uso do ebuliômetro, onde 20 mL das amostras foram utilizadas. A aferição do equipamento foi realizada diariamente com água destilada para verificar o ponto de ebulição da água. Em uma régua graduada, a temperatura de ebulição da água foi fixada no valor obtido através da leitura do termômetro no momento de estabilização da temperatura de ebulição. A temperatura de ebulição dos vinhos foi comparada com a da água e o resultado foi obtido diretamente na régua em % (v/v) de álcool. Os dados foram obtidos em triplicata.

As determinações dos compostos presentes no produto final (cachaça), tais como acidez total e volátil, grau alcoólico aparente e real, foram realizadas segundo metodologia estabelecida pelo MAPA, na Instrução Normativa nº. 24 de 08 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b). A determinação de aldeídos totais foi realizada de acordo com a metodologia da ABNT (1997c), por método espectrofotométrico.

Para poder determinar o grau alcoólico real da cachaça (% v/v), a 20 °C foi utilizada a metodologia conforme BRASIL (2005b), utilizado um destilador eletrônico (Super DDE da marca Gibertini). O grau alcoólico foi determinado com base na separação do álcool da amostra, por destilação, e sua posterior medição no densímetro eletrônico (marca ANTON PAAR modelo DMA 35A).

3.8.3 Compostos voláteis na cachaça

A determinação de acetaldeído, acetato de etila, metanol, álcoois superiores e furfural foram realizadas por cromatografia gasosa, cromatógrafo a gás Shimadzu 17A, com detector de ionização em chama, utilizando uma coluna capilar de polietileno glicol (Supelco) de 60 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor igual a 225 °C, temperatura do detector igual a 280 °C; fluxo de gás de arraste (hélio) 30 mL/min.; vazão dos gases no detector, hidrogênio 30 mL/min. e ar sintético 300 mL/min. e taxa de *split* igual a 30. A programação de temperatura do forno da coluna, durante a análise cromatográfica, foi inicialmente a 50 °C por 6 minutos e então foi elevada a 100 °C, a uma rampa de 15 °C/min., até 190 ºC (padrões) e 250 °C (amostras) por 2 min., a uma rampa de 20 °C/min. O volume injetado foi de 2,0 µl do destilado. As injeções foram realizadas em triplicata (BOSCOLO, 2000; NONATO, 2001; CARDOSO, 2004; VICENTE, 2007; SOUZA, 2010).

Para realizar as análises cromatográficas foi necessário realizar uma curva padrão, utilizando os padrões das substâncias investigadas, em concentrações distintas. Foram utilizados os seguintes padrões (Merck): acetato de isoamila (grau HPLC), álcool isoamílico (grau PA), etanol (grau PA), acetato de etila (grau PA), metanol (grau PA), 1-propanol (grau PA), acetaldeído (grau PA), isobutanol (grau PA) e furfural (grau PA). Tais padrões foram preparados em solução alcoólica 40% v/v (álcool etílico grau HPLC -Fisher Scientific e água destilada deionizada. Utilizando as áreas dos picos desses padrões associados com as áreas dos picos do padrão interno utilizado (n-pentanol – 2,5%), foi obtido um índice associado à concentração utilizada do padrão. Com base nesses dois parâmetros (concentração do padrão x relação área substância padrão/área padrão interno), a equação de regressão linear do gráfico foi obtida e a quantidade de cada composto de cada amostra foi determinada.

3.9 Teste de aceitação de cachaça

Diferentes amostras de cachaça foram submetidas ao teste de aceitação, a fim de avaliar se os consumidores gostavam ou desgostavam do produto. Foram recrutados 68

consumidores escolhidos aleatoriamente, incluindo docentes, alunos (maiores de 18 anos), servidores do IFNMG - Campus Salinas, moradores da cidade de Salinas e cidades circunvizinhas. A identificação dos degustadores foi feita por meio da faixa etária e sexo, além dos mesmos mencionarem com que frequência consumiam cachaça e a razão do consumo.

Os consumidores receberam as amostras de forma monádica e sequencial, codificadas com três dígitos, em volume de 20 mL em taças de cristal ISO padrão internacional de degustação, cobertas com vidro de relógio, em cabines individuais com iluminação colorida (vermelha), à temperatura entre 22-25 ºC. Os 68 consumidores avaliaram as duas amostras nos critérios de impressão global, aroma, sabor e acidez (queimação na deglutição) característico de cachaças. Cada consumidor recebeu uma ficha de avaliação contendo uma escala hedônica verbal de até 9 pontos (onde: 9 = gostei muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo), para que ele apontasse o quanto gostou ou desgostou de cada uma das amostras. Além disso, cada degustador indicou o motivo que o levou a dar a nota para cada uma das amostras.

3.10 Fermentações em escala laboratorial para acompanhar a cinética de formação dos compostos voláteis.

As leveduras foram retiradas dos tubos de preservação estocados em freezer – 80°C e uma alíquota de 200 µl de cada linhagem foi inoculada em 3 mL de caldo YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 24 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, reinoculadas em 150 mL de caldo YPD 2%, até a fase estacionária. O início da fermentação ocorreu com o inóculo de 10^9 células/mL em frascos de 500 mL com sistema de bloqueio de entrada de ar. O meio utilizado foi melado diluído a 8 ºBrix no volume de 300 mL. Os frascos foram mantidos durante o processo fermentativo a 30 °C por 24 horas onde zerou o ºBrix. Ao longo da fermentação nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas, alíquotas de 25 mL foram retiradas do meio fermentativo para extração dos compostos voláteis.

3.11 Análises bioquímicas, fisiológicas e moleculares das leveduras

3.11.1 Análises bioquímicas e fisiológicas

As linhagens de leveduras selvagens pré-selecionadas foram submetidas à metodologia de seleção de leveduras com características apropriadas à produção de cachaça proposta por Vicente (2007), tendo como objetivo avaliar a estabilidade fisiológica em algumas condições similares às encontradas nas dornas de fermentação da cachaça como o crescimento a 37 °C, etanol 8% e glicose 25% (PATARO *et al.*, 2000; VICENTE, 2007). As 7680 linhagens selvagens foram avaliadas sob os seguintes parâmetros: crescimento em YPD 2% 30 °C, YP sacarose 20%, YPD 20%, YP galactose 2%, YP maltose 2% e YP etanol 10% incubadas a 30 °C e 37 °C, resistência a TFL e cerulenina; floculação; capacidade de produção de micocinas (atividade Killer); não produção de H_2S. Para avaliar a estabilidade fisiológica, as linhagens foram crescidas em meio YPD 2% e incubadas a 30 °C e 37 °C por 48 horas. Ao final deste período, as linhagens foram submetidas aos testes mencionados anteriormente por réplica plating.

3.11.2 Identificação e análise do polimorfismo molecular das linhagens de leveduras

As leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio YPD 2%, incubadas (Incubador New Brunswick Model G25) a 30 °C, sob agitação de 200 rpm (agitador rotatório New Brunswick) e crescidas até se atingir a densidade óptica (DO) correspondente a 1. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 4 minutos, a 4 °C, e 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 2 mL de água destilada estéril. Após centrifugação a 3000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13) por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 200 µl tampão de extração (sorbitol 1 M, EDTA-Na_2 0,1 M, pH 7,5), em tubos eppendorfs com capacidade 1,5 mL. A seguir, adicionou-se 30 µl de solução liticase (5 U/µl liticase e 8 µl/mL β-Mercaptoetanol em tampão de extração) e agitou-se

ligeiramente (LOPEZ *et al.*, 2001). Esse tubo foi incubado por 2 horas a 37 °C. Após esse procedimento, foram adicionados 200 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA-Na_2, pH 7,4) e 10 µl de SDS 10% (w/v), agitando cuidadosamente. Em seguida, os tubos foram incubados por 5 minutos a 65 ºC. A seguir, adicionou-se 160 µl de acetato de potássio 1 M, mantendo-se em gelo, durante 30 minutos. Ao término desse tempo, procedeu-se à centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente identificado, adicionando-se o mesmo volume de álcool iso-propanol. Esse tubo foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, o tubo foi novamente centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 700 µl de etanol 70%. Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13); o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA obtido foi seco a 65 ºC. Em seguida, o DNA foi ressuspenso em 40 µl de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore) e sua concentração determinada através da A260 nm usando-se o Nanovue.

3.11.3 Amplificação do fragmento ITS1-ITS4 (PCR-ITS)

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*), correspondente à região intergênica do DNA ribossomal das leveduras, foi realizada, utilizando a técnica de PCR (Termociclador Eppendorf-Mastercycler) (WHITE et al., 1990 apud SOUZA, 2010) e os seguintes iniciadores:

ITS1 (T CCG TAG GTG AAC CTG CGG)
ITS4 (T CCT CCG CTT ATT GAT ATG C)

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 µl do tampão 10x, 0,7 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 µl de dNTPs 2.5 mM, 1 µl de cada primer (20 pmol/ µl), 1 U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen) e 1 µl de DNA genômico extraído das leveduras

selecionadas, diluídos para uma concrentração de aproximadamente 300 ng/µl em um volume final de 25 µl .

Os ciclos de PCR foram: uma desnaturação inicial a 94 ºC por 4 minutos; 34 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 1 minuto, anelamento a 52 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 10 minutos, seguido de uma extensão final a 72 ºC por 10 minutos.

Ao produto de PCR amplificado (10 µl) foi adicionado 1µl de *loading buffer* (6x – azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e sacarose 40% p/v). As amostras foram aplicadas em gel de algarose 1,2% (p/v) e a eletroforese conduzida em tampão TAE 1x (0,04 M TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0 ajustado com ácido acético). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/mL) sob agitação por 20 minutos, sendo revelado e fotografado em foto documentador (AlphaImager ® Mini). O marcador de DNA 1 Kb (invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular.

3.11.4 Purificação do produto de PCR-ITS

A 15 µl do produto de PCR adicionou-se 210 µl de TE (10 Mm Tris, 1mM EDTA, pH 8) e 25 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,1 e 250 µl de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 25:24: 1). A mistura foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 13.000 rpm por 10 min. (Heraeus Spatech, Biofuge 13). Retirou-se a fase superior, a qual foi transferida para um novo tubo. Para precipitar o DNA, adicionaram-se 2 volumes de etanol 100% gelado. O tubo foi mantido a –70 ºC por 1 hora. Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos (Heraeus Spatech, Biofuge 13). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 68 ºC por 15 minutos e ressuspenso em 20 µl de água Mili-Q.

3.11.5 Digestão do fragmento ITS

Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação e purificados foram digeridos com as enzimas de restrição *CfoI, HaeIII e HinfI* (HERAS VASQUEZ *et al.,* 2002). Para cada reação de digestão, foram utilizados 15 µl de DNA, 2 µl do tampão especificado pelo fornecedor da enzima, 0,5 µl de enzima e água Mili-Q estéril

suficiente para um volume final de 20 µl por tubo. As amostras foram, então, colocadas na estufa a 37 °C, *overnight*.

3.11.6 Eletroforese em gel de agarose

Aos produtos da digestão 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 (0,04 M TRIS, 1 mM EDTA, pH 8, ajustado com ácido acético). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (2 µg/ml), sob agitação, por 30 minutos. O marcador de DNA 100-3000bp (Axygen Biosciences) foi usado como padrão (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

3.11.7 Caracterização do polimorfismo das leveduras por RAPD – PCR

Para caracterização do polimorfismo das leveduras também foi realizada a técnica de RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Foram utilizados os seguintes iniciadores:

EI1 (CTGGCTTGGTGTATGT)
LA1 (GCGACGGTGTACTAAC) (PATARO *et al.*, 2000 *apud* SOUZA, 2010).

A reação foi realizada em um volume final de 25 µl, o qual continha 1 µl de DNA genômico (300 ng), 20 pmol/µl de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 2,5 µl do tampão 10x, 0,75 µl de $MgCl_2$ e 1 U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen). A amplificação ocorreu a partir de uma etapa de desnaturação inicial a 95 ºC por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 1 minuto, anelamento a 44 ºC por 2 minutos e extensão a 72 ºC por 1,5 minutos. Após último ciclo, houve uma extensão final a 72 ºC por 10 minutos (DE BARROS *et al.*, 1996; PATARO *et al.*, 2000).

A análise do produto de RAPD-PCR foi conduzida em gel de poliacrilamida 8% (acrilamida 30% e bis-acrilamida 1%), após 6 horas de corrida eletroforética a 120

volts. O gel foi corado com prata, conforme protocolo a seguir: fixação com solução de fixação (etanol 10% e ácido acético 0,5%) por 10 minutos; lavagem rápida com água Mili-Q, coloração por 10 minutos com solução de coloração (etanol 10%, ácido acético 0,5% e nitrato de prata 12 mM); lavagem com água Milli-Q durante 15 segundos; revelação com solução de desenvolvimento (NaOH 0,75 M e formaldeído 38%) até o aparecimento da cor. O gel foi, então, fotografado em um foto documentador (AlphaImager ® Mini) e analisado. O marcador de DNA 1 Kb (Invitrogen) foi usado como padrão (DE BARROS *et al.*, 1996; PATARO *et al*., 2000).

3.11.8 Identificação e polimorfismo das leveduras por COX – PCR

Foram utilizadas como molde amostras de DNA extraídas de acordo com o item 3.11.2. O gene mitocondrial *COX I* que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase, foi utilizado para análise devido à variação no número e à posição dos íntrons do gene COX que é peculiar a cada linhagem (LOPEZ *et al*., 2003). Os íntrons do *COX I* foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando os seguintes *primer*s:

3L (GCTTTAATTGGWGGWTTTGG)
3R (ATTGTCATACCATTTGTYCTYAT)
4L (GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA)
5R (GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT)

O DNA foi amplificado em termociclador (Eppendorf-Mastercycler). A reação de amplificação continha 20 pmol/µl de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 2,5 µl do tampão 10x, 0,7 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl de DNAmt (300 ng), em um volume final de 25 µl. A amplificação ocorreu a partir de uma etapa de desnaturação a 95 ºC por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 1 minuto; anelamento a 51 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 2 minutos, com extensão final a 72 ºC por 5 minutos. Para visualização dos produtos de amplificação, os produtos de COX-PCR (12 µl) foram misturados a 3 µl de *loading-buffer* aplicados em gel de poliacrilamida 6% e revelados por coloração com prata, como descrito no item anterior.

3.11.9 Análise de microssatélites

Em *S. cerevisiae*, seis microssatélites foram descritos como abundantes e altamente polimórficos e têm sido usados na identificação de linhagens de leveduras (PÉREZ *et al.,* 2001; SHULLER *et al*., 2004; LEGRAS *et al.*, 2005; SOUZA, 2010). Nesse sentido, seis pares de *primers* foram utilizados conforme Tabela 2. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler), em dois sistemas multiplex, utilizando 1 µl de DNA genômico (30 ng), 0,25 mM de dNTP, 2,0 µl do tampão 10x, 1,6 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 2,0 U de Taq DNA platinum polimerase (Invitrogen) e 1,0 µl de cada *primer* por reação. A reação do Multiplex "A" continha 2,5 pmol/µl de cada par de *primer* ScAAT4 e ScAAT6, assim como 15,0 pmol/µl do par de *primer* ScAAT1. Para a reação do Multiplex "B", foram utilizados 5,0 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 15 µl.

A amplificação seguiu com uma etapa de desnaturação a 95 ºC por 4 minutos; 29 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 1 minuto; anelamento a 55 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 2,5 minutos. A reação de amplificação prosseguiu com 25 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 30 segundos, anelamento a 48 ºC por 30 segundos, e extensão a 72 ºC por 30 segundos e com uma extensão final a 72 ºC por 5 minutos. Os produtos de PCR foram diluídos (1:5 para o Multiplex "A" e 1:20 para o Multiplex "B") e 2 µl de cada diluição foram adicionados a 7,75 µl de Tween20 (a 0,1%) e 0,25 µl de padrão de DNA. As amostras foram desnaturadas a 94 ºC por 5 minutos e separadas por eletroforese capilar no sequenciador MegaBace 1000 (GE Healthcare) (injeção 9 Kva, 60 s, para ambas as reações dos multiplex A e B) e usando como referência o padrão de DNA ^{TM}ET550-R Size Standart. As análises foram feitas com o uso do software Fragment Profiler versão 2.0 (GE Healthcare).

Tabela 2. *Primers* utilizados na amplificação de 6 *locus* de microssatélites para *S. cerevisiae*

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

3.11.10 Identificação e polimorfismo das leveduras por mtDNA-RFLP

As células de leveduras selecionadas foram inoculadas em 3 mL de meio YPD 2% e incubadas até a fase estacionária, a 28º C, sob agitação de 200 rpm em incubador New Brunswick Model G25. As culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 1.000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de água milli-Q estéril. As amostras foram transferidas para tubo eppendorf e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento celular ressuspenso em 200 µl de sorbitol 1M, EDTA 0,1M, pH 7, 5, com adição de 13 µl de solução de liticase (5 U/µl de liticase e 8 µl/mL de β-mercaptoetanol em tampão de extração). Os tubos foram então incubados a 37 ºC por 3 horas e a formação de esferoplastos foi monitorada opticamente em microscópio. Em seguida, adicionaram-se 200 µl de 50 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA, pH 7,4 e 13 µl de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) 10%, e a mistura foi incubada a 65 ºC por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 200 µl de acetato de potássio 1 M, os tubos foram colocados em gelo por 50 minutos e subsequentemente centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf e o DNA foi precipitado pela adição de um volume igual de isopropanol, *overnight*, a temperatura de -20 ºC. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado. Ao DNAmt foram adicionados 30 µl de água Milli-Q estéril e 2 µl de RNAse, seguida de incubação a 37 ºC por 1 hora. Em seguida, foi lavado com etanol 100%. Procedeu-se à nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNAmt lavado com etanol 70%. Procedeu-se à nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNAmt seco a 68 ºC durante 10 minutos. Após este procedimento, o DNA foi ressuspenso em 30 µl de água Milli-Q estéril (QUEROL & BARRIO, 1990; QUEROL *et al*., 1992a; QUEROL *et al*., 1992b; LOPEZ *et al*., 2001).

Após a purificação do DNA, os fragmentos foram digeridos com a enzima *Hinf I* (Gibco BRL Life Technologies). Para tanto, foram adicionados ao tubo, 20 µl do fragmento obtido (DNAmt), 2 µl de Tampão (10x REACT 2), 1 µl da enzima *Hinf I.* A digestão com a enzima de restrição foi conduzida *overnight* a 37 °C. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1x. Após a

revelação com brometo de etídeo (2 µg/mL), o gel foi revelado e fotografado usando sistema foto documentador (AlphaImager ® Mini).

3.12 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados no mínimo três vezes. Os resultados apresentados mostram os valores médios e seus respectivos desvios-padrões. As análises estatísticas foram feitas por comparações das médias, aplicando os testes de Tukey e Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os resultados dos testes fermentativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foi também utilizada a Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA), que é uma análise estatística multivariada capaz de transformar linearmente um conjunto original de variáveis em um conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas, o qual contém a maior parte de informação do conjunto original. Na análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *score* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados (FERREIRA *et al.*, 1999). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico MINITAB Release 14 for Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação das leveduras

O isolamento e a identificação de leveduras utilizadas neste trabalho basearam-se na metodologia de identificação de *S. cerevisiae* desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular e Molecular aplicada às linhagens de leveduras isoladas de dornas de fermentação. Essa metodologia gerou uma patente de invenção que se encontra depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (PI0304436-0 A2; VICENTE *et al*., 2006).

Essa metodologia combina a seleção de linhagens capazes de resistir a diferentes tipos de estresse, causado durante o processo fermentativo como altas temperaturas, elevados teores de etanol e resistência a variações osmóticas, com características especiais como capacidade de flocular, incapacidade de produção de ácido sulfídrico e alta atividade invertásica. Além disso, essas características são associadas a testes de resistência às drogas cerulenina e 5,5´,5´´-trifluoro-DL-leucina (TFL), que selecionam linhagens com alto potencial de produção de álcoois superiores e seus ésteres (ICHIKAWA *et al*., 1991; ARIKAWA *et al.*, 2000; *apud* VICENTE *et al*., 2006).

A Tabela 3 apresenta um perfil das linhagens isoladas de mosto de 14 destilarias da microrregião de Salinas, Minas Gerais. Coletaram-se 16 amostras de mosto das destilarias, sendo que, em duas destilarias, foram coletadas duas amostras, pois trabalhavam com dois tipos de fermento. Essas amostras foram inoculadas em meio YPD 2% (p/v) adicionado de ampicilina 100 µg/mL. Após o crescimento a 30 ºC por 48 horas foram obtidas aleatoriamente 480 colônias de leveduras de cada unidade de produção. Para a identificação taxonômica das leveduras isoladas como *S. cerevisiae*, foram empregados meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono e de assimilação de nitrogênio como descrito por Vaughan-Martini e Martini (1993).

Inicialmente, as colônias de leveduras foram testadas para a capacidade de assimilação de fontes de nitrogênio como lisina para eliminação de leveduras de outras espécies, ainda que a espécie *S. cerevisiae* seja predominante nos processos fermentativos de produção de cachaça (MORAIS *et al*., 1997; PATARO *et al*., 2000,

OLIVEIRA, 2005). Porém os gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são comumente isolados. Bactérias também podem estar presentes, principalmente em meios pouco ácidos ou em altas temperaturas (MORAIS *et al*., 1997; PATARO *et al.,* 1998, 2000; GUERRA *et al.,* 2001, SCHWAN *et al*., 2001; GOMES *et al.,* 2007; VIANNA *et al*., 2008).

Dos resultados obtidos nesta etapa da seleção (Tabela 3), duas unidades de produção (Tabua e Preciosa) tiveram sucessivamente 5% e 20% das colônias excluídas nesta etapa. No entanto, não foi confirmada esta tendência para as demais unidades, conforme resultado mostrado na Tabela 3, demonstrando que o número de colônias excluídas nessa etapa foi elevado, variando de 87,5% (T. O. Curallin) a 42,5% (Cachoeirinha). As leveduras com características bioquímicas compatíveis com a espécie *S. cerevisiae* foram selecionadas para estudos posteriores e as demais eliminadas.

4.2. Testes complementares de seleção

4.2.1 Resistência a condições de estresse

Durante a fermentação alcoólica, as células de leveduras não encontram um ambiente fisiológico de condições ideais, e são expostos simultaneamente e sequencialmente a várias condições de estresse, sendo altas concentrações de sacarose e etanol, considerados os mais importantes (QUEROL *et al*., 2003). De fato, segundo Betz e colaboradores (2004) e Ding e colaboradores (2010) concentrações de etanol acima de 4–6% são estressantes para as células de leveduras podendo levar à inibição do crescimento e à morte.

A fermentação do caldo de cana-de-açúcar na produção de cachaça pode ocorrer em temperaturas elevadas e conduzir a altas concentrações de etanol, de modo que tais características podem determinar a diversidade observada de linhagens *S. cerevisiae* prevalentes na produção da bebida (PATARO *et al*., 2000). Assim, as condições específicas de temperatura e de concentração de etanol podem ser usadas como critério de seleção de linhagens autóctone.

Tabela 3. Procedimentos de isolamento, seleção, avaliação bioquímica e fisiológica das linhagens da espécie *S. cerevisiae* da microrregião de Salinas – MG

PRODUTOR	Colônias	Saldo após Testes de Crescimento	Saldo após Resistência ao Estresse	Saldo após Resistência a Drogas	Linhagens Floculantes	Saldo após a atividade da enzima Invertásica
Tabua	480	456	20	20	4	1
Preciosa	480	386	20	14	5	2
Anísio Santiago	480	227	49	4	4	1
Majestade	480	219	78	4	4	1
EAFSalinas	480	189	41	3	3	1
Meia Lua	480	75	10	10	2	1
Cachoeirinha	480	276	30	15	6*	1
Canarinha	480	222	96	17	6	1
Seleta S	480	263	148	20	11*	1
Seleta C.	480	164	67	9	6	1
T.O Curralin	480	60	28	7	4*	1
T.O Indaiá	480	213	96	18	5*	1
Salineira FC	480	191	113	15	8*	1
Salineira FP	480	159	64	11	7*	1
George	480	182	27	10	5*	2
Lua Cheia	480	188	49	10	4*	1
Saldo após testes	**7680**	**3470**	**936**	**187**	**34**	**18**

***linhagens não floculantes escolhidas com base na dupla resistência às drogas.**

Com o intuito de selecionar linhagens de *S. cerevisiae* resistentes a fatores estressantes como alta temperatura, concentração de etanol, avaliamos o fenótipo de 3470 linhagens de leveduras (Tabela 3), 936 linhagens resistiram às estas condições, alcançando um saldo positivo de 27,5%.

4.2.2 Seleção de linhagens resistentes a TFL e Cerulenina

Essa parte do processo seletivo busca isolar linhagens de *S. cerevisiae* melhor adaptadas ao processo fermentativo e em especial selecionar linhagens resistentes a drogas como 5,5´,5´´ trifluoro-D-Leucina (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 o ácido capróico, consequentemente com maior capacidade de produção de componentes aromatizantes (SOUZA *et al*., 2012).

De início, as linhagens foram expostas a TFL e cerulenina para seleção das linhagens resistentes a estes compostos. Dos grupos de linhagens analisadas, 100% das linhagens da unidade de produção Tabua, são naturalmente resistentes a este análogo de leucina (Tabela 3); nas demais unidades as linhagens apresentaram um perfil de resistência muito heterogêneo.

Ao final do teste foram obtidas linhagens de leveduras resistentes a ambos os compostos, as quais perfizeram um total de 187 linhagens, correspondendo a 19,91% do total das linhagens analisadas.

4.2.3 Floculação

Leveduras com características floculantes são de grande interesse na produção de bebidas devido a fatores operacionais e econômicos (VESTREPEN *et al*., 2001 e 2003c *apud* OLIVEIRA, 2005). Assim, as 187 linhagens de leveduras resistentes às drogas TFL e cerulenina foram submetidas ao teste de floculação espontânea na presença de 2% de glicose. Das leveduras analisadas podemos observar que aquelas procedentes das unidades de produção Anísio Santiago, Majestade e EAFSalinas apresentaram um perfil de floculação em 100% das linhagens selecionadas, como

mostrado na Tabela 3. Já as linhagens de leveduras das demais unidades apresentaram uma heterogeneidade de floculação dentro da condição analisada. Dessa forma, foram isoladas 34 linhagens da microrregião de Salinas que apresentaram a característica floculante. Porém, linhagens de oito unidades de produção não apresentaram o perfil de floculação, mas foram selecionadas em função da dupla resistência às drogas. Esse fenômeno desempenha um importante papel na produção de cachaça, principalmente para os produtores que não têm centrífuga para fazer a separação das células do vinho, ou seja, deriva em uma separação econômica.

4.2.4 Dosagem de invertase

Na fabricação da cachaça, o principal açúcar encontrado no mosto é a sacarose e o primeiro passo, para sua utilização pela levedura *S. cerevisiae* é a hidrólise extracelular, através da enzima invertase. Dessa forma, obtêm-se glicose e frutose, que são transportadas para o interior da célula, degradadas pela via glicolítica até piruvato e transformadas em etanol e gás carbônico pelo processo de fermentação alcoólica (BARNET, 1981; GANCEDO & SERRANO, 1989). Além disso, a sacarose pode ser hidrolisada no meio extracelular, com posterior internalização dos produtos (glicose e frutose), pela invertase periplasmática, ou o açúcar pode ser transportado ativamente para o interior da célula, onde é hidrolisado pela invertase intracelular e/ou maltases.

As 34 linhagens de leveduras floculantes, somadas a 50 linhagens selecionadas em função da dupla resistência às drogas, foram submetidas ao teste de dosagem da atividade da enzima invertase. A enzima invertase em *S. cerevisiae* é codificada pelo gene *SUC2* e catalisa a quebra da sacarose em frutose e glicose. Como a sacarose é o principal açúcar presente no caldo da cana-de-açúcar, a dosagem dessa enzima é uma das formas de verificar a capacidade fermentativa da levedura (EKUNSANMI & ODUNFA, 1990; PATARO *et al*., 1998). Na Tabela 3, podemos observar o resultado da atividade invertásica das linhagens analisadas. As linhagens de leveduras com atividade invertásica superior a 10.000 U.A.E. foram consideradas com maior capacidade fermentativa. Das 84 linhagens avaliadas, 18 dessas possuem uma atividade invertásica superior a 10.000 U.A.E. e foram submetidas à caracterização por ensaio molecular e

experimento de fermentação. Na Tabela 4, encontram-se descritas as linhagens selecionadas da microrregião de Salinas - MG através dos testes bioquímicos.

4.2.5 Identificação molecular das leveduras

Na identificação molecular de leveduras, a amplificação da região de ITS (*internal transcribed spacer region*) tem sido adequada para discriminação entre espécies (MITTERDORFER *et al.*, 2002; PRAMATEFTAKI *et al.*, 2000; VICENTE, 2007; SOUZA, 2010). Assim sendo, foram realizadas reações de PCR com DNA genômico das 18 linhagens de leveduras selecionadas na microrregião de Salinas - MG, juntamente com linhagens usadas como padrão negativo (*Lachancea. kluyveri*). Utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4, ocorre a amplificação de amplicon característico de 850 pb, característica da espécie *S. cerevisiae* (WHITE *et al.*, 1990). Essa região do rDNA mostra baixa variabilidade intraespécie e alto polimorfismo inter-espécie o que justifica o uso da técnica para identificar espécies. De fato, para todas as linhagens isoladas de unidades de produção de cachaça, o produto de amplificação apresentou um fragmento de aproximadamente 850 pb. A espécie controle *Lachancea kluyveri* apresentou um *amplicon* inferior a 850 pb (Figura 7).

Segura *et al*., (2010), descreveu que o fragmento amplificado das regiões ITS-5.8S, para leveduras da espécie *S. cerevisiae*, apresentou em média 850 pb, embora uma variação de 10 pb possa ocorrer. Guillamon e colaboradores (1998) encontraram 880 pb para esse mesmo fragmento.

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. Sendo assim, ITS PCR utilizando *primers* específicos para as regiões conservadas 18S e 28S, resulta na amplificação das regiões intergênicas espécie específicas que variam de tamanho de uma espécie para outra, o que permite identificar as leveduras em nível de espécie (GARDES *et al*., 1991; HENRY *et al.*, 2000 *apud* SOUZA, 2010).

Tabela 4. Linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG, a partir de testes bioquímicos.

Linhagens *	**Destilaria**
LBCM 630	Cachaça Preciosa
LBCM 631	Cachaça Preciosa
LBCM 633	Cachaça Tabua
LBCM 668	Cachaça Anísio Santiago
LBCM 669	Cachaça Majestade
LBCM 670	Cachaça EAFSalinas
LBCM 671	Cachaça Meia Lua
LBCM 672	Cachaça Cachoeirinha
LBCM 673	Cachaça Canarinha
LBCM 674	Cachaça Seleta selvagem
LBCM 675	Cachaça Seleta Caipira
LBCM 676	Cachaça Terra de Ouro Curralin
LBCM 677	Cachaça Terra de Ouro Indaiá
LBCM 678	Cachaça Salineira F.C.
LBCM 679	Cachaça Salineira F.P
LBCM 680	Cachaça George
LBCM 681	Cachaça Lua Cheia
LBCM 682	Cachaça Beija Flor

***** Linhagens isoladas de caldo de cana-de-açúcar fermentado na safra 2008.

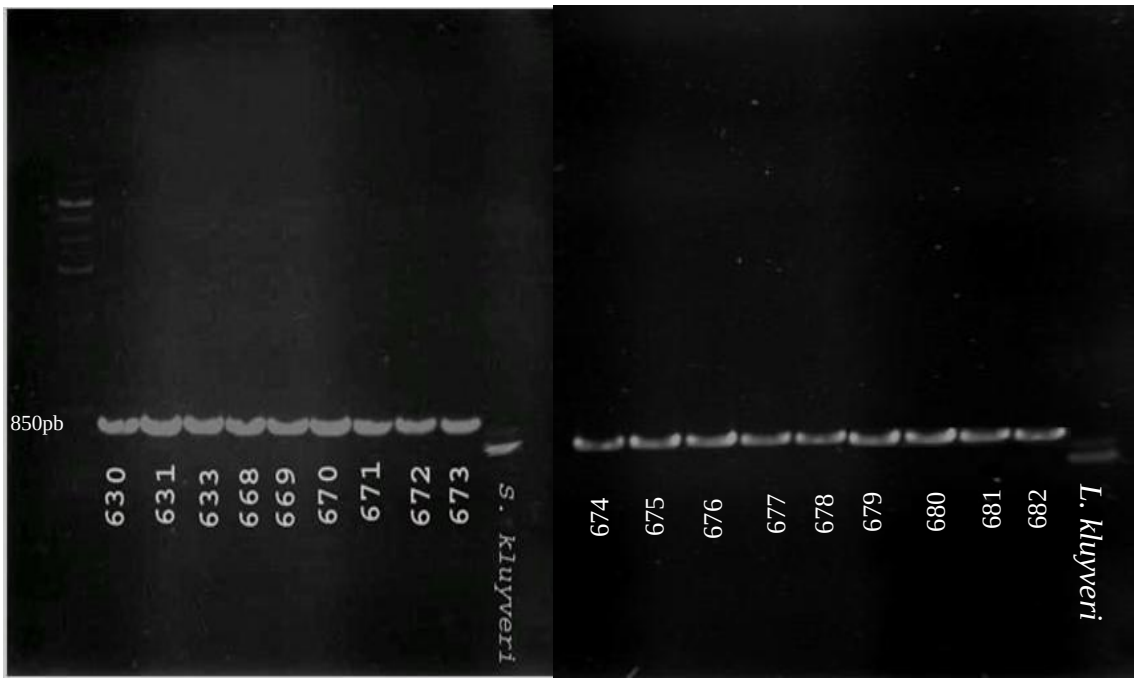


Figura 7. Identificação molecular das leveduras por amplificação da região de ITS. Eletroforese em gel de agarose mostrando o fragmento ITS das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea kulyveri*, amplificado a partir dos *primers* ITS1 e ITS4. PM representa o padrão de peso molecular (1 KB Invitrogen).

4.3 Fermentação em escala piloto das linhagens selecionadas

4.3.1 Avaliação dos parâmetros relacionados ao desempenho fermentativo das linhagens

Das 18 linhagens selecionadas por apresentarem características desejáveis, 15 linhagens foram escolhidas aleatoriamente para serem submetidas à fermentação em escala piloto, utilizando dornas com capacidade de 40 L. Como demonstrado por Oliveira e colaboradores (2004), o desempenho fermentativo de uma determinada linhagem é importante para que esta possa dominar o processo de fermentação. Desse modo, além da seleção das linhagens de leveduras utilizadas na produção de cachaça pelos critérios bioquímicos e fisiológicos descritos anteriormente, analisamos as linhagens quanto ao consumo de sólidos solúveis (variação do consumo em relação ao tempo), ciclos fermentativos (em 10 dias de experimento), teor alcoólico e acidez total do vinho. Esses dados estão apresentados nas Figuras 8 e 9, Painéis a, b, respectivamente.

4.3.1.1 Taxa de consumo de sólidos solúveis

Para todas as linhagens foram adotadas as mesmas condições de fermentação. Na Figura 8a, pode ser constatado que 7 das 15 linhagens estudadas apresentaram o mesmo comportamento para o consumo de sólidos solúveis, por hora, pois, quanto maior o consumo, melhor é o desempenho da levedura. As 15 linhagens avaliadas dividiram-se em três grupos distintos pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As linhagens LBCM 679, 633, 630 e 670 apresentaram um baixo consumo de sólidos solúveis, mostrando, assim, um baixo desempenho fermentativo. Na Figura 8b, podemos observar os ciclos fermentativos para as linhagens em estudo durante 10 dias de condução do experimento, onde as linhagens LBCM 633 e 670 tiveram 3 e 5 ciclos fermentativos consecutivos, já as linhagens LBCM 630 e 679 tiveram 7 ciclos fermentativos, as linhagens LBCM 681e 668 tiveram 9 ciclos fermentativos e as demais linhagens apresentaram o mesmo comportamento tiveram 10 ciclos fermentativos.

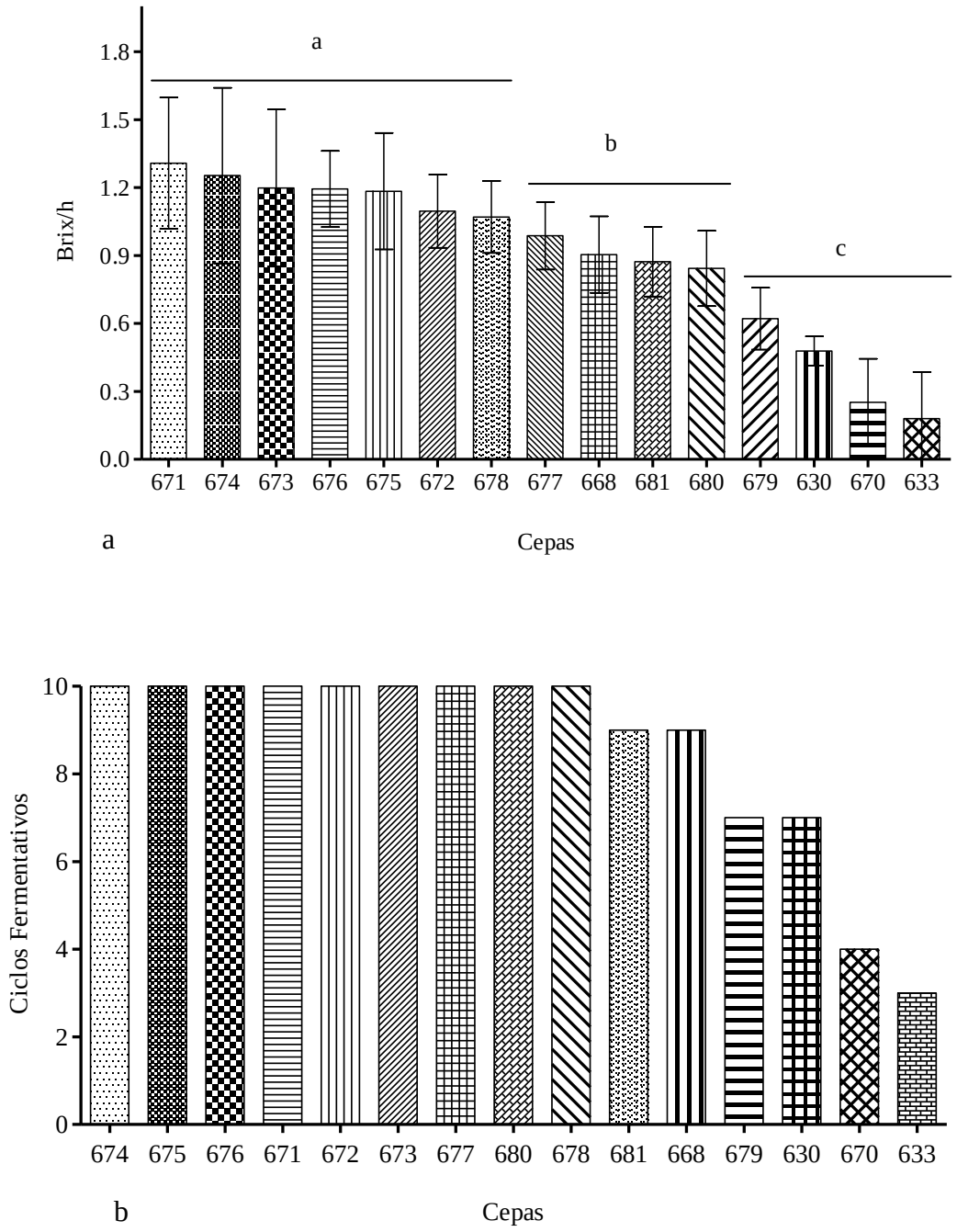


Figura 8. Avaliação do consumo de sólidos solúveis e ciclos fermentativos. Média do do consumo de sólidos solúveis (a) e ciclos fermentativos (b), avaliados em escala piloto no ano de 2009 das linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.1.2 Análise do Teor alcoólico do vinho

Os teores alcoólicos obtidos para o vinho estão demonstrados na Figura 9a. Esse critério está diretamente ligado ao rendimento produtivo. Quatorze linhagens apresentaram melhor desempenho, porém não diferindo entre si. Os teores alcoólicos das amostras apresentaram valores médios entre 7,25 e 8,9% v/v. Segundo Maia (2006), o teor alcoólico do vinho deve situar-se em torno de 6,8% a 8,5% v/v, podendo aumentar em sistemas com maior eficiência e controle de fermentação.

A produção de etanol por leveduras normalmente se encontra na faixa de 5% a 10% v/v (LIMA, 2001), cuja variação de concentração foi observada no presente estudo assim como em outros trabalhos encontrados na literatura.

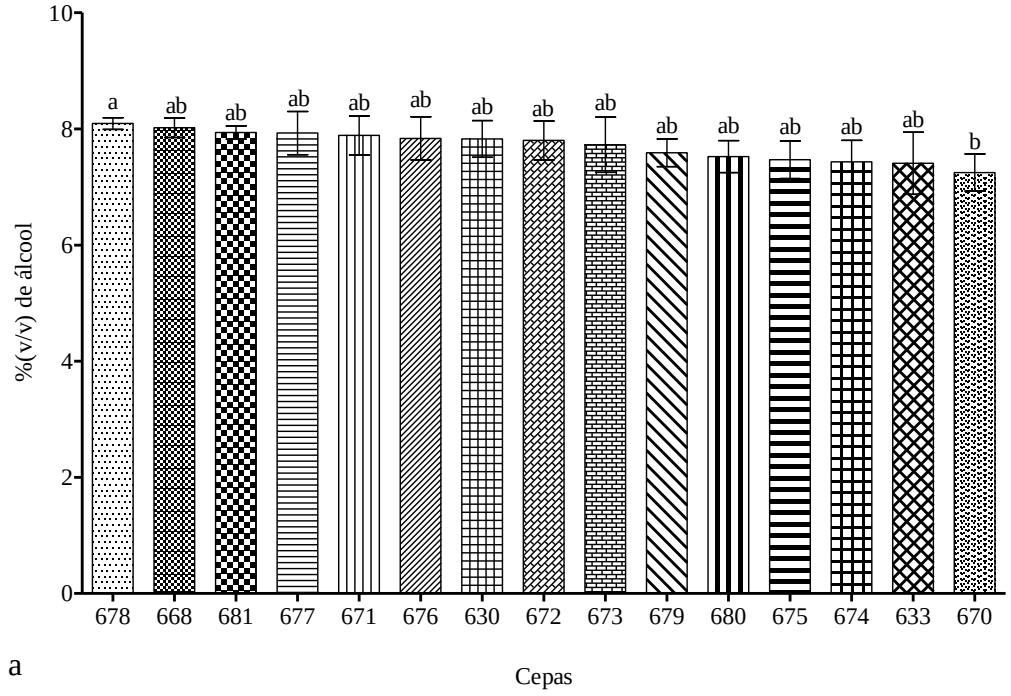
Silva e colaboradores (2008) realizaram 16 fermentações de caldo de cana-de-açúcar, utilizando leveduras selecionadas e encontraram valores de teor alcoólico variando entre 6 e 9% v/v. Em outro estudo, realizado por Silva e colaboradores (2009), os autores utilizaram leveduras selecionadas de diferentes procedências nas fermentações de caldo de cana-de-açúcar e encontraram teores alcoólicos ao final da fermentação que durou mais de 70 horas entre 5,4 e 9,2% v/v.

As médias de produção de etanol ao final da fermentação apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) somente para a linhagem LBCM 678 em relação à linhagem LBCM 670, as demais não diferiram entre si.

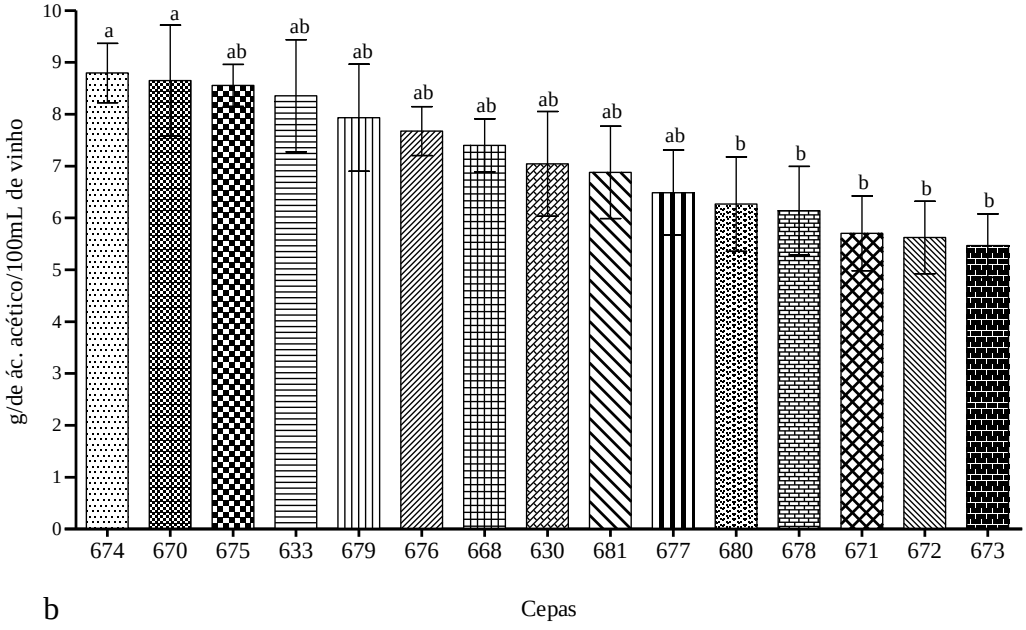
4.3.1.3 Acidez do vinho

Das 15 linhagens estudadas, 2 linhagens apresentaram maior acidez do vinho, sendo elas a LBCM 674 e LBCM 670, as demais linhagens não diferiram estatisticamente entre si, mostrando, assim, um mesmo comportamento no processo fermentativo. Como pode ser observado na Figura 9b.

Segundo dados da literatura, existe uma correlação positiva entre a acidez crescente do vinho e a concentração de bactérias no mosto, assim como há uma correlação negativa destas com o rendimento alcoólico. Entretanto, Amorim & Oliveira (1982) ressaltam que a acidez do vinho não é um diagnóstico de contaminação, havendo a necessidade de se recorrer a análises microbiológicas.



a



b

Figura 9. Avaliação do teor alcoólico e acidez do vinho. Média do teor alcoólico do vinho expresso em % (v/v) (a) e acidez total do vinho (b), avaliado em escala piloto no ano de 2009 das linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2 Parâmetros físico-químicos da cachaça

4.3.2.1 Teor da acidez volátil

Alguns ácidos orgânicos excretados no meio de fermentação são derivados de vias intermediárias, como o acético, málico e succínico. O ácido acético, que é o ácido orgânico predominantemente excretado no meio de crescimento, é produzido pela oxidação do acetaldeído, com remoção de hidrogênio, na reação oposta à redução normal do acetaldeído a etanol (JANZANTTI, 2004). O grau de acidez das cachaças constitui fator de qualidade, pois durante a produção dessa bebida, os ácidos reagem com os álcoois presentes e aumentam a formação de ésteres (LIMA, 2001).

Ácido acético é quantitativamente predominante e sua concentração varia de 60% a 95% da acidez total. O excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente "agressivo" em aguardente de cana, depreciando a qualidade da bebida (CHERUBIN, 1998; JANZANTTI, 2004). As proporções dos ácidos nas bebidas alcoólicas são determinadas em grande extensão pela linhagem da levedura e condições de fermentação e, em menor extensão, pelo substrato utilizado (JANZANTTI, 2004). *S cerevisae* na presença de oxigênio pode converter até 30% do açúcar do mosto em ácido acético (BATISTA, 2008).

Para acidez volátil das linhagens testadas, os valores variaram entre 12,87 e 32,68 mg de ácido acético.100 mL^{-1} de álcool anidro, com teor médio de 19,73 mg de ácido acético.100 mL^{-1} de álcool anidro (Tabela 5).

Valores de acidez volátil semelhantes aos encontrados neste estudo foram obtidos por Jerônimo (2004) que, utilizando, uma linhagem de *S. cerevisiae*, o teor de acidez volátil apresentou grande variação, de cerca de 7 a 365 $mg.L^{-1}$ em ácido acético. Entretanto, Silva e colaboradores (2009a), que também avaliaram amostras de cachaça produzidas em laboratório a partir de leveduras selecionadas de diferentes regiões do estado de Minas Gerais por meio de cromatografia gasosa encontrou apenas 1 amostra (9%) cuja concentração ultrapassou o limite permitido pela legislação brasileira e sendo superior às demais amostras analisadas (671,86 mg.100 mL^{-1} de álcool anidro).

Segundo Cardoso (2006), a acidez volátil é um parâmetro que depende do processo fermentativo, do controle dos fatores de linhagem da levedura utilizada, pureza

da fermentação, tempo e temperatura da fermentação, manejo do mosto e, principalmente, da higienização dos equipamentos e utensílios, sendo este último essencial para minimizar a ocorrência de alta acidez nas aguardentes. O excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente "agressivo" em aguardente de cana, depreciando a qualidade da bebida (CHERUBIN, 1998).

No que diz respeito ao teor de aldeídos (Tabela 5), o teor encontrado (em mg.100 mL^{-1} de álcool anidro) variou de 8,22 a 20,18 do composto de referência (acetaldeído). Levando-se em conta o limite máximo tolerado pela legislação (30 mg de acetaldeído.100 mL^{-1} de álcool anidro), todas as amostras analisadas respeitaram o padrão exigido.

A maior parte dos ésteres é constituída por ésteres de etila, formados durante a fermentação e destilados junto com o etanol. Essas reações ocorrem porque o etanol pode reagir com ácidos derivados do ácido pirúvico, como ácido lático e acético, bem como ácidos orgânicos de cadeias curtas (butírico, capróico, caprílico, cáprico e láurico) (JANZANTI, 2004; JERÔNIMO, 2004).

Vários fatores interferem na síntese de ésteres, tais como a estirpe da levedura, a composição do meio, aeração (inibe a formação de ésteres) e temperatura (PEDDIE, 1990; BERRY, 1995). O principal éster da cachaça é o acetato de etila, o qual em pequenas concentrações incorpora um aroma de frutas à bebida, que é desejável e agradável. Em quantidades excessivas, porém, confere aroma indesejável e enjoativo (MAIA, 1994; PEREIRA *et al*., 2003; JERÔNIMO, 2004; CARDOSO, 2006).

Em relação aos ésteres, foi encontrado um teor médio do composto de referência (acetato de etila) de 15,5 mg.100 mL^{-1} de álcool anidro, com resultados variando entre 5,9 e 63,9, respeitando, portanto, o limite máximo (200 mg de acetato de etila.100 mL^{-1} de álcool anidro) estabelecido pela legislação. Esses valores estão coerentes com os relatados pela literatura (BARCELOS *et al*., 2007; SOUZA *et al*., 2012).

Quanto aos álcoois superiores totais, a faixa de concentração variou entre 252,9 a 533,5 mg.100 mL^{-1} de álcool anidro. Levando-se em conta o limite máximo estabelecido pela legislação (360 mg.100 mL^{-1} de álcool anidro), apenas 3 linhagens apresentaram valor acima do permitido pela legislação (Tabela 5).

.

Tabela 5. Acidez volátil l (mg/ác. acético/100mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras produzidas em escala piloto (dornas de 40 litros) em 2009.

Cepa	Acidez Volátil	Acetaldeído	Acetato de etila	Metanol	Álcoois Superiores	Furfural	Lactato de Etila
630	26,57 ± 4,23^{bcd}	17,28 ± 5,55 ^{abc}	14,77 ± 3,10 ^{c}	9,92 ± 1,93^{b}	330,8 ± 70,98^{c}	nd	nd
633	27,30 ± 5,05^{bcd}	18,32 ± 8,45 ^{abc}	63,90 ±19,55 ^{a}	8,97 ± 3,25^{b}	533,5 ± 85,61^{a}	nd	nd
668	18,74 ± 2,49^{abcd}	15,39 ± 4,78 ^{abc}	14,40 ± 2,48 ^{c}	7,47 ± 1,24^{b}	485,4 ± 63,99^{a}	1,04 ± 2,31^{a}	18,25 ± 33,56^{a}
670	32,68 ± 5,94^{bcd}	20,18 ± 3,34^{ac}	27,31 ± 8,35 ^{b}	2,61 ± 1,52^{a}	322,1 ± 22,08^{c}	1,73 ± 2,38^{a}	nd
671	15,11 ± 6,75^{ad}	14,49 ± 6,74 ^{abc}	10,90 ± 2,54 ^{d}	10,32 ± 2,39^{b}	419,5 ± 99,01^{b}	nd	61,72 ± 2,03^{b}
672	15,12 ± 5,75^{abcd}	15,70 ± 6,48 ^{ac}	7,830 ± 3,35 ^{d}	4,29 ± 4,25^{a}	252,9 ± 116,8^{c}	0,22 ± 0,67^{b}	4,81 ± 2,70^{b}
673	16,65 ± 5,15^{acd}	15,97 ± 6,24 ^{abc}	7,830 ± 2,46 ^{d}	7,24 ± 2,68^{b}	300,9 ± 39,98^{c}	nd	11,81 ± 8,05^{a}
674	20,35 ± 4,32^{abcd}	10,27 ± 5,50 ^{abc}	8,095 ± 1,70^{d}	2,27 ± 1,87^{a}	372,7 ± 86,03^{b}	0,20 ± 0,67^{b}	5,81 ± 8,01
675	17,23 ± 2,77^{abcd}	10,17 ± 3,03 ^{abc}	5,931 ± 1,31 ^{d}	1,84 ± 2,82^{a}	291,7 ± 46,86^{c}	0,52 ± 1,19^{b}	5,81 ± 1,95^{b}
676	18,80 ± 4,05^{abcd}	13,10 ± 5,71 ^{abc}	7,807 ± 2,15 ^{d}	8,56 ± 3,96^{b}	348,5 ± 49,03^{c}	0,43 ± 1,44^{b}	17,11 ± 16,31^{a}
677	18,57 ± 2,31^{abcd}	14,29 ± 4,80 ^{abc}	10,77 ± 4,50 ^{d}	11,17 ± 4,51^{b}	256,4 ± 52,77^{c}	nd	9,37 ± 2,83^{b}
678	20,09 ± 3,97^{abcd}	8,225 ± 4,61 ^{ab}	13,51 ± 6,90 ^{c}	7,28 ± 1,02^{b}	298,3 ± 48,72^{c}	0,59 ± 1,34^{b}	6,26 ± 7,43^{b}
679	21,23 ± 5,91^{abcd}	18,26 ± 6,25 ^{abc}	12,89 ± 1,05 ^{c}	5,84 ± 1,85^{a}	335,1 ± 46,84^{c}	nd	nd
680	12,87 ± 4,06^{a}	12,31 ± 5,89 ^{abc}	10,48 ± 4,64 ^{d}	8,10 ± 4,79^{b}	262,5 ± 25,57^{c}	1,79 ± 3,79^{a}	19,68 ± 14,46^{a}
681	14,71 ± 2,75^{ad}	12,22 ± 5,25 ^{abc}	16,14 ± 6,47 ^{c}	7,77 ± 1,99^{b}	406,2 ± 65,91^{b}	nd	16,14 ± 36,45^{a}

*nd: Não detectado.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, para um mesmo composto, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No tocante aos teores de metanol (em mg.100 mL^{-1} de álcool anidro), encontramos uma faixa de 1,8 a 10,3. Portanto, todas as amostras apresentaram-se abaixo do limite máximo previsto pela legislação para metanol em cachaça (20 mg.100 mL^{-1} de álcool anidro).

Para analisar a similaridade entre as linhagens selecionadas, utilizamos o método de Análise de Componentes Principais (PCA). Nesse estudo, utilizando as respostas encontradas na Tabela 5, construímos a matriz para análise no método PCA considerando os valores de acidez volátil em ácido acético, acetaldeído, acetato de etila, metanol, alcoóis superiores, furfural e lactato de etila, como variáveis e dispostas em colunas enquanto as linhagens, como amostras, em fileiras.

As amostras ficaram bem distintas umas das outras, marcadas pelas localizações bem definidas de cada uma no gráfico score (Figura 10). Para as linhagens LBCM 633, 670, 630, 675, 679 e 674 apresentam-se mais dispersas, e, portanto, maior diferença em relação às outras amostras que parecem formar um grupo menos heterogêneo.

Em função disso, e por razões operacionais, dentre as 9 linhagens mais agrupadas, seis linhagens foram avaliadas para a repetibilidade dos resultados numa segunda safra produtiva. As linhagens escolhidas para essa etapa foram: LBCM 668, 671, 676, 678, 680 681. Outros fatores que também influenciaram nessa seleção foram o alto consumo de sólidos solúveis e o maior teor alcoólico no vinho demonstrado particularmente por essas linhagens.

Dentre os parâmetros fermentativos avaliados no ano de 2010, podemos observar que, para o parâmetro consumo de sólido/solúveis, houve uma formação de dois grupos distintos. As linhagens LBCM 668 e LBCM 681 tiveram menor consumo (Figura 11a), porém quando avaliamos em relação aos ciclos fermentativos estas linhagens tiveram 9 e 8 ciclos consecutivos em 10 dias de fermentação, onde as demais linhagens avaliadas tiveram 10 ciclos (Figura 11b), sendo este um fator importante no processo produtivo da cachaça. No entanto, no que diz respeito ao teor alcoólico do vinho e a acidez no vinho, não houve uma nítida separação das linhagens (Figura 12ab). Os ciclos fermentativos não interferiram nos parâmetros fermentativos teor alcoólico e acidez no vinho.

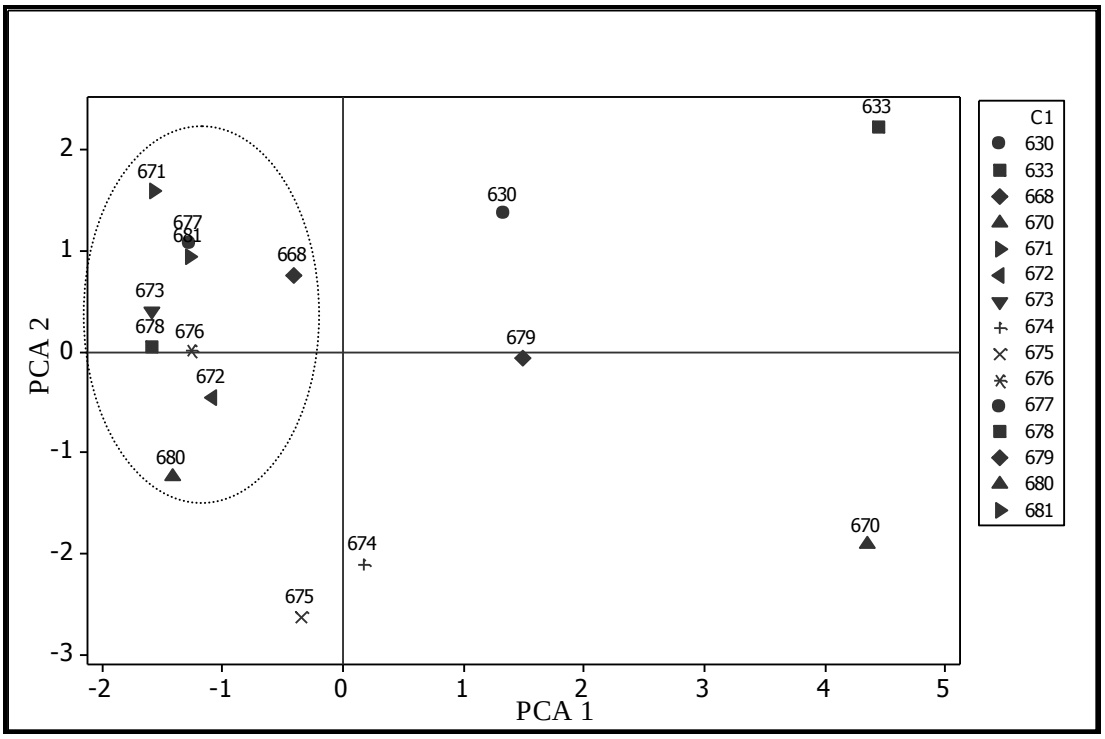


Figura 10. Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis. Das Amostras de cachaças produzidas no ano de 2009, com as diferentes linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG, foram analisadas em relação a compostos voláteis.

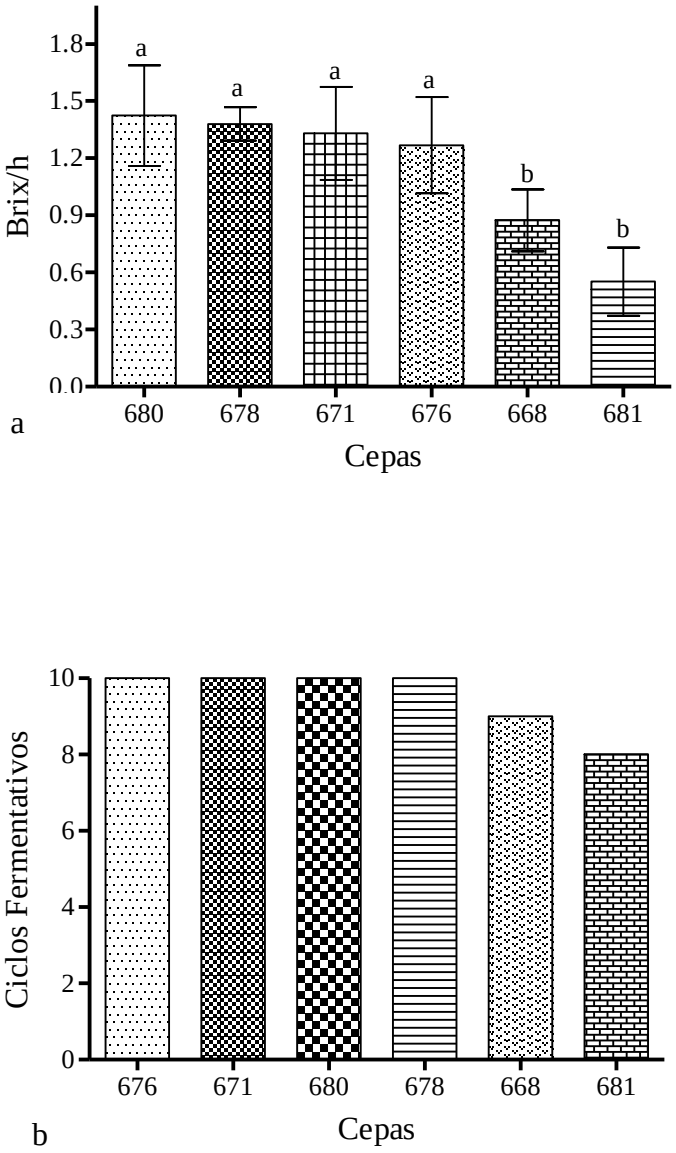


Figura 11. Avaliação do consumo de sólidos solúveis e ciclos fermentativos. Média do do consumo de sólidos solúveis (a) e ciclos fermentativos (b), avaliados em escala piloto no ano de 2010 das seis linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

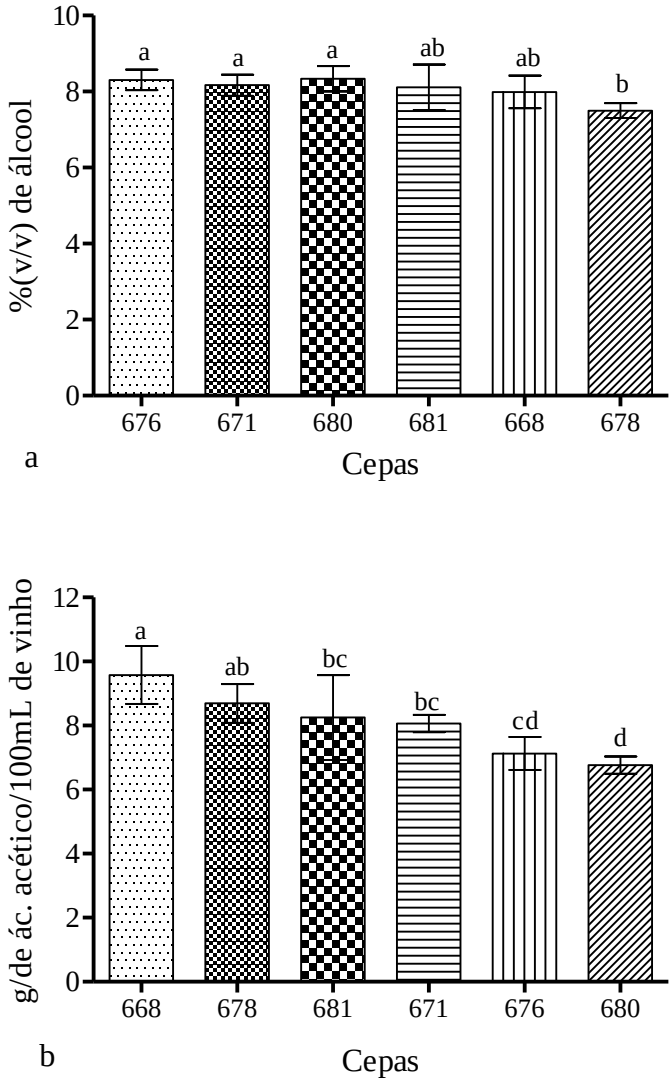


Figura 12. Avaliação do teor alcoólico e acidez do vinho. Média do teor alcoólico do vinho expresso em % (v/v) (a) e acidez total do vinho (b) avaliado em escala piloto no ano de 2010 das linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 6 apresentamos os compostos voláteis das cachaças produzida no ano de 2010, utilizando as seis linhagens selecionadas em 2009. Foi analisada a similaridade entre as seis linhagens selecionadas pelo método de Análise de Componentes Principais (PCA), nas mesmas condições do realizado anteriormente. Ou seja, usando os dados da Tabela 6, construímos a matriz para análise no método PCA considerando os valores de acidez volátil em ácido acético, acetaldeído, acetato de etila, metanol, alcoóis superiores. Furfural e lactato de etila não foram utilizados devido não ter sido detectado nas amostras de cachaça produzidas no ano de 2010. Como podemos observar na Figura 13, a variação ocorrida entre as seis amostras pode ser explicada pelo Componente Principal onde, 33% das linhagens tende-se a agrupar e 67% ficou disperso Componente Principal.

Como as amostras não ficaram bem distintas umas das outras, no gráfico score (Figura 13), comparamos, então, as médias das seis linhagens selecionadas nos dois anos consecutivos 2009 e 2010, em que foram realizados os experimentos. Nas mesmas condições, utilizamos o método de Análise de Componentes Principais (PCA). Para realizarmos, assim, a seleção da ou das linhagens para ser/serem utilizadas na escala de produção.

Como podemos observar na Figura 14, a variação ocorrida entre as amostras de cachaça do ano de 2009 e 2010, pode ser explicada pelo Componente Principal onde ocorreu a formação de 2 grupos (Figura 14), duas linhagens ficaram dispersas a LBCM 668 devido à grande produção de aldeídos e a LBCM 678 com maior destaque no consumo de sólidos solúveis (Figura 14). Esse foi o fator essencial na seleção da linhagem LBCM 678, para ser utilizada nos experimentos em escala de produção, além de outros fatores essenciais na produção de cachaça. Analisando outros fatores, observamos que a linhagem LBCM 680 teve maior desempenho principalmente em função do teor alcoólico do vinho.

Tabela 6. Acidez volátil l (mg/ác. acético/100 mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes linhagens de leveduras produzidas em escala piloto (dornas de 40 litros) em 2010 das leveduras selecionadas na microrregião de Salinas-MG.

Cepa	Acidez Volátil	Acetaldeído	Acetato de etila	Metanol	Álcoois Superiores	Furfural	Lactato de Etila
668	33,87 ± 6,74^{bc}	32,60 ± 7,95 ^{b}	8,55 ± 0,57	nd	463,1 ± 115,3^{bc}	nd	nd
671	19,41 ± 4,71^{ac}	15,21 ± 6,33 ^{bc}	8,33 ± 0,51	nd	269,6 ± 57,75^{ac}	nd	nd
676	21,40 ± 6,02^{ac}	13,13 ± 6,02 ^{ac}	8,49 ± 0,19	5,74 ± 0,43	352,7 ± 116,4^{c}	nd	nd
678	42,78 ± 5,41^{b}	2,6 ± 1,66^{a}	9,91 ± 0,19 ^{a}	6,75 ± 0,13^{a}	200,5 ± 98,94^{a}	nd	nd
680	16,69 ± 6,79^{a}	12,24 ± 10,91^{ac}	8,36 ± 0,37	5,56 ± 0,18	263,7 ± 105,5^{ac}	nd	nd
681	22,26 ± 2,07^{ab}	18,12 ± 8,39 ^{bc}	8,41 ± 0,41	5,71 ± 0,28	243,3 ± 43,99^{ac}	nd	nd

nd – não detectado dentro do limite de detecção do aparelho

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, para um mesmo composto, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

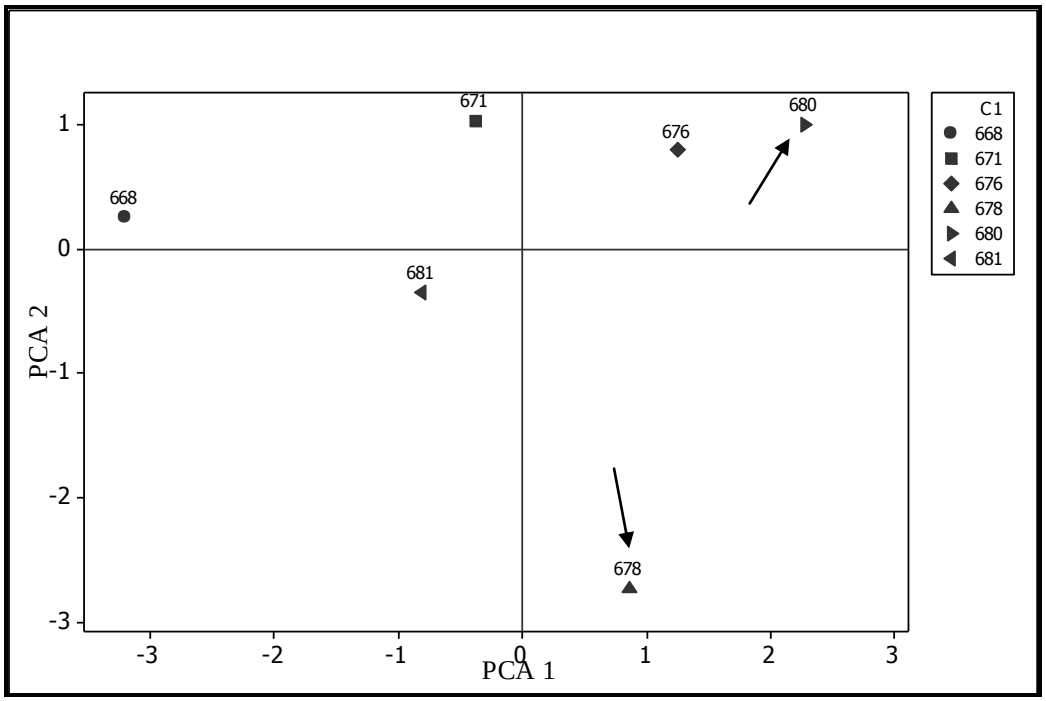


Figura 13. Análise Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis das amostras de cachaças produzidas no ano de 2010, com as 6 linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG.

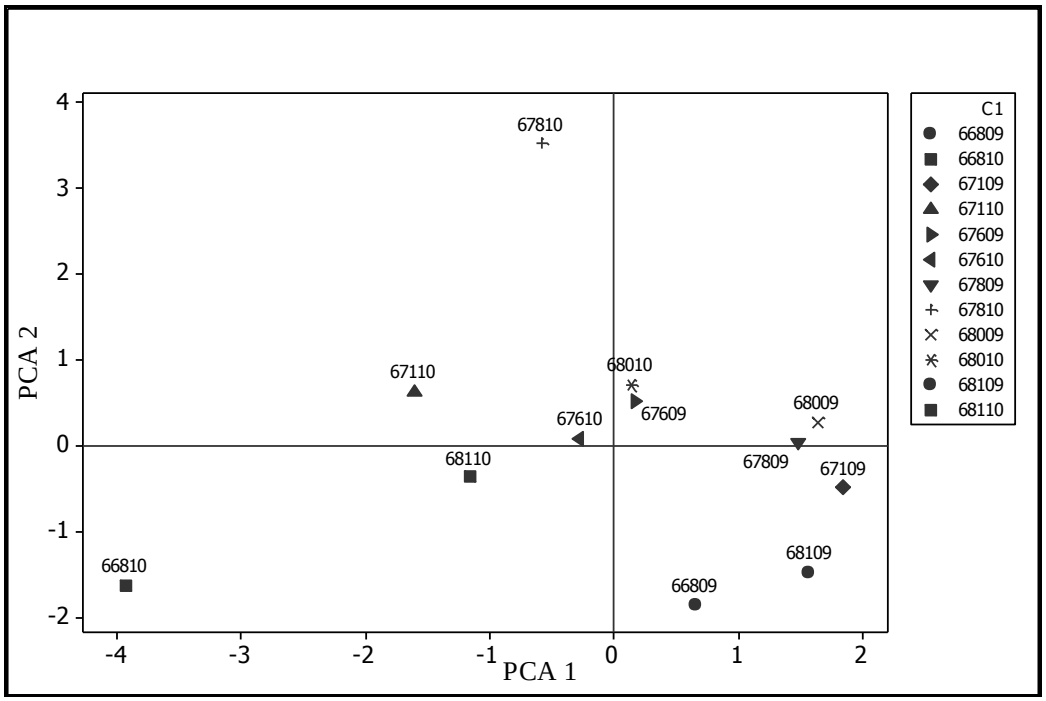


Figura 14. Análise Gráfico de PCA scores para análise de compostos voláteis das amostras de cachaças produzidas no ano de 2009 e 2010, com as 6 linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG.

4.3.2.2 Fermentação em escala de produção

Para os ensaios em escala de produção, foram utilizadas dornas em aço inoxidável com capacidade de 1000 L, e em duplicata para melhor avaliação das linhagens. O período de fermentação para as linhagens foi de 24 horas nos nove ciclos fermentativos, corroborando o fato de que a fermentação alcoólica atinge uma atenuação completa (0 °Brix) em um período de 24 a 36 horas.

Quando comparados os parâmetros fermentativos da produção em pequena escala e em escala de produção, podemos observar na Figura 15 que ambas as linhagens apresentaram apenas pequenas diferenças entre os experimentos conduzidos em pequena escala (2010) e em escala de produção (2011) sugerindo assim que é possível a utilização dessas linhagens de leveduras selecionadas em ambiente de produção.

4.4 Determinação dos componentes voláteis da cachaça

A Tabela 7 apresenta os resultados das dosagens dos teores de: acidez volátil, acetaldeído, acetato de etila, metanol, álcool isoamílico, furfural e lactato de etila produzidos pelo destilado do caldo fermentado pelas linhagens LBCM 678 e LBCM 680 obtidos em escala de produção, conforme descrito em material e métodos. Como pode ser observado na Tabela 7, só houve diferença estatística para acetaldeído entre as linhagens selecionadas. Os demais compostos foram semelhantes para as linhagens LBCM 678 e LBCM 680. A análise estatística foi realizada com a análise de variância (ANOVA) de cada composto e Test t de *studen*t para comparação das médias das amostras.

O acetaldeído é um composto que diminui a qualidade da cachaça e, quando ingerido, interfere no sistema nervoso central, portanto é importante quantificá-lo, sendo que sua concentração deverá ser a mínima possível. Os aldeídos são comuns no processo inicial da fermentação, tendendo a desaparecer no final. A causa do excesso de aldeídos nas cachaças pode ser uma indicação de oxidação espontânea (PEREIRA *et al.*, 2003; VILELA *et al*., 2007). Das amostras de aguardente produzidas em laboratório avaliadas por Silva e colaboradores (2009), aproximadamente 64% apresentaram níveis elevados de acetaldeído, sendo que uma amostra elaborada com fermento selecionado

apresentou valor de 178,60 mg.100 mL^{-1} álcool anidro, concentração ainda maior que as encontradas neste estudo. Silva e colaboradores (2006), avaliando aguardentes produzidas com diferentes linhagens de leveduras, também encontraram valores baixos de ésteres totais, variando de 9,70 a 32,30 mg.100 mL^{-1} álcool anidro para ésteres em acetato de etila. Os autores explicaram que esse fato se deve à separação da fração cabeça (10%) na destilação, a qual contém a maior concentração de ésteres, principalmente, acetato de etila e outros compostos com baixo ponto de ebulição como acetaldeído e metanol. Silva e colaboradores (2009), avaliando amostras de cachaça produzidas com fermentos isolados de diferentes regiões de Minas Gerais, concluíram que, em relação aos ésteres, expressos em acetato de etila, todas as amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação brasileira. Oliveira e colaboradores (2005) também encontraram valores de acetato de etila entre 9,4 a 36,5 mg.100 mL^{-1} álcool anidro em 10 cachaças produzidas com diferentes linhagens de leveduras em batelada única.

Os álcoois superiores e ésteres são compostos presentes na cachaça que se incorporam ao sabor e ao aroma da bebida. Esses compostos estão presentes em pequenas quantidades, mas o suficiente para oferecer características próprias à cachaça (CARDELLO & FARIA, 1998; BOSCOLO *et al.*, 2000; NONATO *et al*., 2001; OLIVEIRA *et al*., 2005).

4.5 Teste de aceitação do consumidor

A aceitabilidade global das cachaças, produzidas por nove fermentações sucessivas das linhagens LBCM 678 e LBCM 680, foi realizada no laboratório de Análise sensorial do IFNMG – Campus Salinas, sendo considerada satisfatória pelos provadores. Comparando o perfil das amostras, não foi possível distingui-las entre si

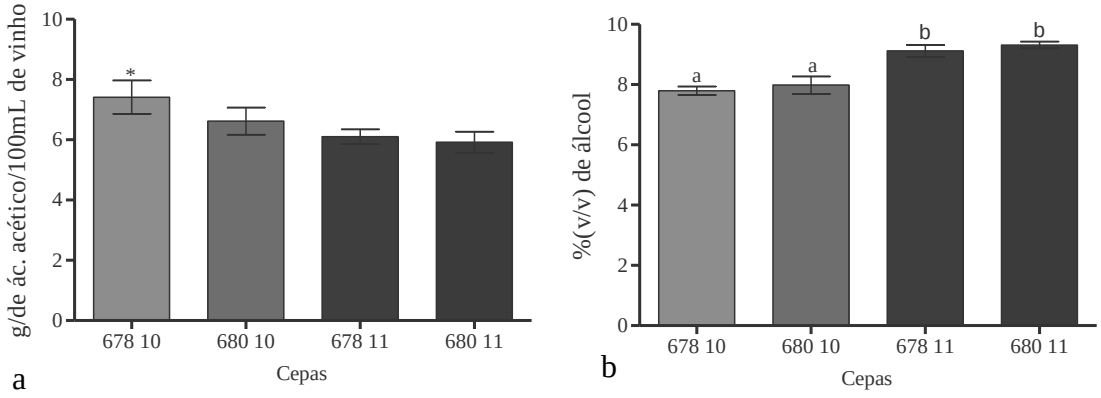


Figura 15. Avaliação da acidez total e teor alcoólico do vinho. Media da acidez total do vinho (a) e média do teor alcoólico do vinho expresso em % (v/v) (b), avaliado em escala piloto no ano de 2009 e 2010 em ambiente de produção no ano de 2011 das duas linhagens selecionadas na microrregião de Salinas – MG. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7. Resultado da análise de cachaças recém destiladas, produzidas em escala de produção das cepas selecionadas LBCM 678 e LBCM 680 em 2011, Acidez volátil l (mg/ác. acético/100mL de a.a) e compostos voláteis (mg/100 mL de a.a) em cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras produzidas em escala de produção (dornas de 1000 litros) em 2011.

Cepa	Acidez Volátil	Acetaldeído	Acetato de etila	Metanol	Álcoois Superiores	Furfural	Lactato de Etila
678	13,60±1,41	5,964±1,91*	12,54±1,02	2,909±0,20	260,9±34,11	nd	nd
680	12,99±2,17	6,635±1,94	13,47±0,82	3,104±0,17	227,8±26,95	nd	nd

nd - Não detectado.

*Valores diferem significativamente entre a cepa num mesmo composto, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

uma vez que apresentaram notas de avaliação sensorial intermediária na escala hedônica.

As amostras foram aceitas pelos consumidores em relação à impressão global não apresentando diferença significativa, dados estes iguais aos de Oliveira (2006), o qual observou em seu trabalho que as cachaças produzidas apresentaram variações nos teores dos principais compostos secundários, que não resultaram em diferenças perceptíveis em relação aos atributos de impressão global.

A Figura 16 apresenta o resultado do percentual das notas atribuídas às amostras pelos consumidores, quanto ao atributo impressão global, refletindo também, neste caso, a aceitação do consumidor da amostra com base na memória afetiva aos atributos aroma e sabor, avaliados isoladamente conforme dados de Forlin (2005).

A acidez é um parâmetro característico da cachaça, responsável pela queimação na deglutição que, encontrada em elevada concentração, pode levar o consumidor a uma rejeição maior do produto.

A figura 17 apresenta o comportamento dos consumidores em relação à acidez das amostras de cachaça, em que se obteve um comportamento similar para os critérios avaliados.

4.6 Cinética da formação e determinações de esteres e álcoois superiores

Compostos aromáticos desempenham importante papel no aroma e no sabor de bebidas alcoólicas derivadas de fermentações desempenhadas por leveduras, contribuindo, assim, para a aceitação ou não do produto pelo mercado consumidor. Dessa forma, as duas linhagens selecionadas para produção em grande escala, linhagens LBCM 678 e LBCM 680, 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. Esses compostos foram extraídos do meio de cultura conforme descrito no item 3.10, em Materiais e Métodos. Como pode ser observado, as duas linhagens apresentaram um mesmo perfil de formação, assim como uma quantidade muito similar na produção de n-propanol (Figura 18a). Comportamento similar de produção

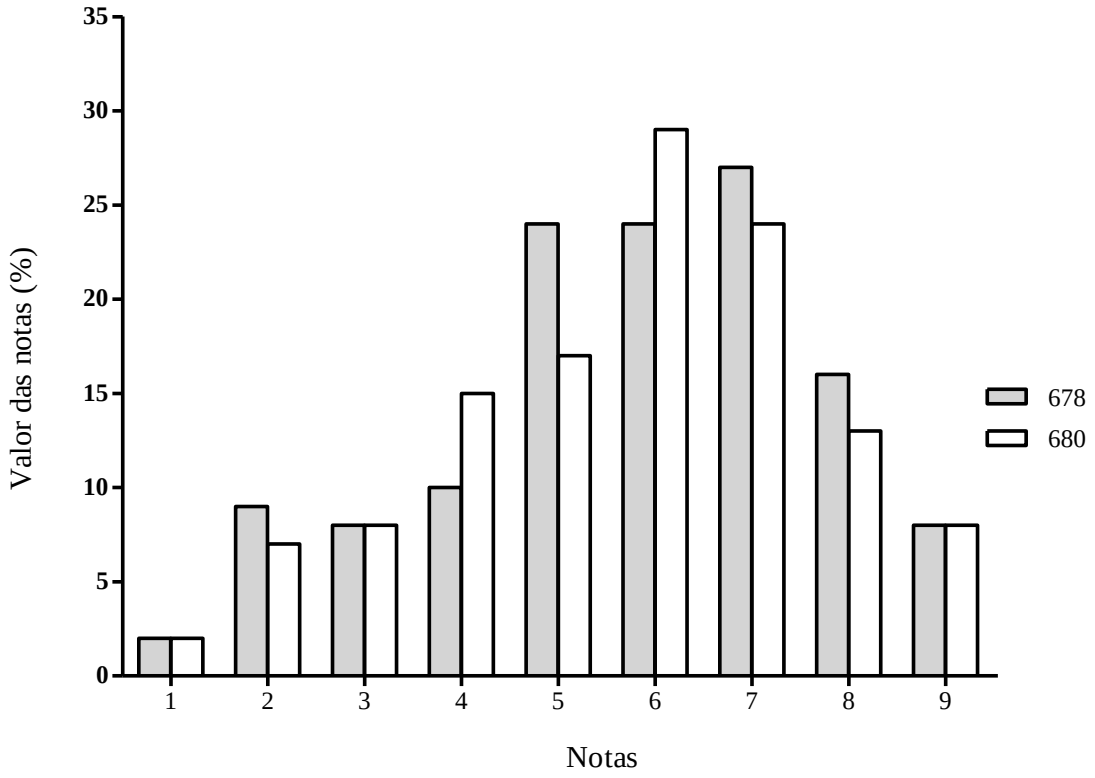


Figura 16. Resultado do percentual das notas atribuídas pelos consumidores quanto à impressão global das cachaças produzidas em escala de produção com as leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680 selecionada na microrregião de Salinas – MG.

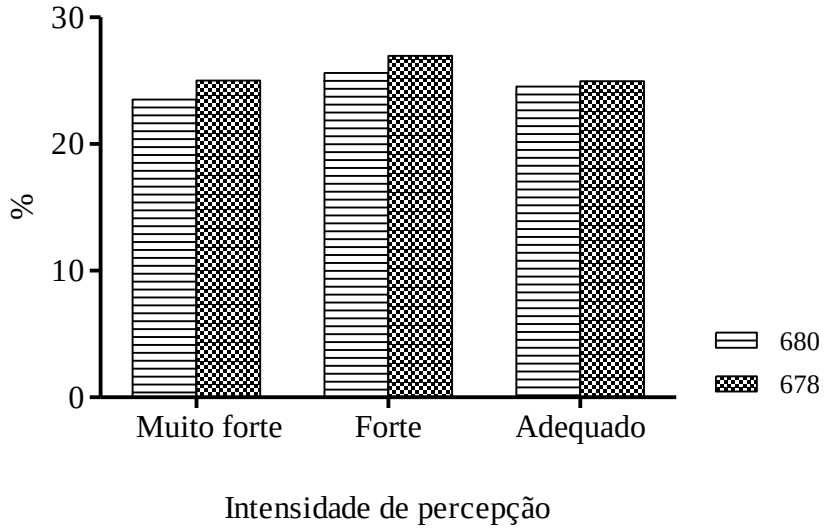


Figura17. Resultado do percentual Intensidade de percepção quanto à acidez das cachaças produzidas em escala de produção com as leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680 selecionada na microrregião de Salinas – MG.

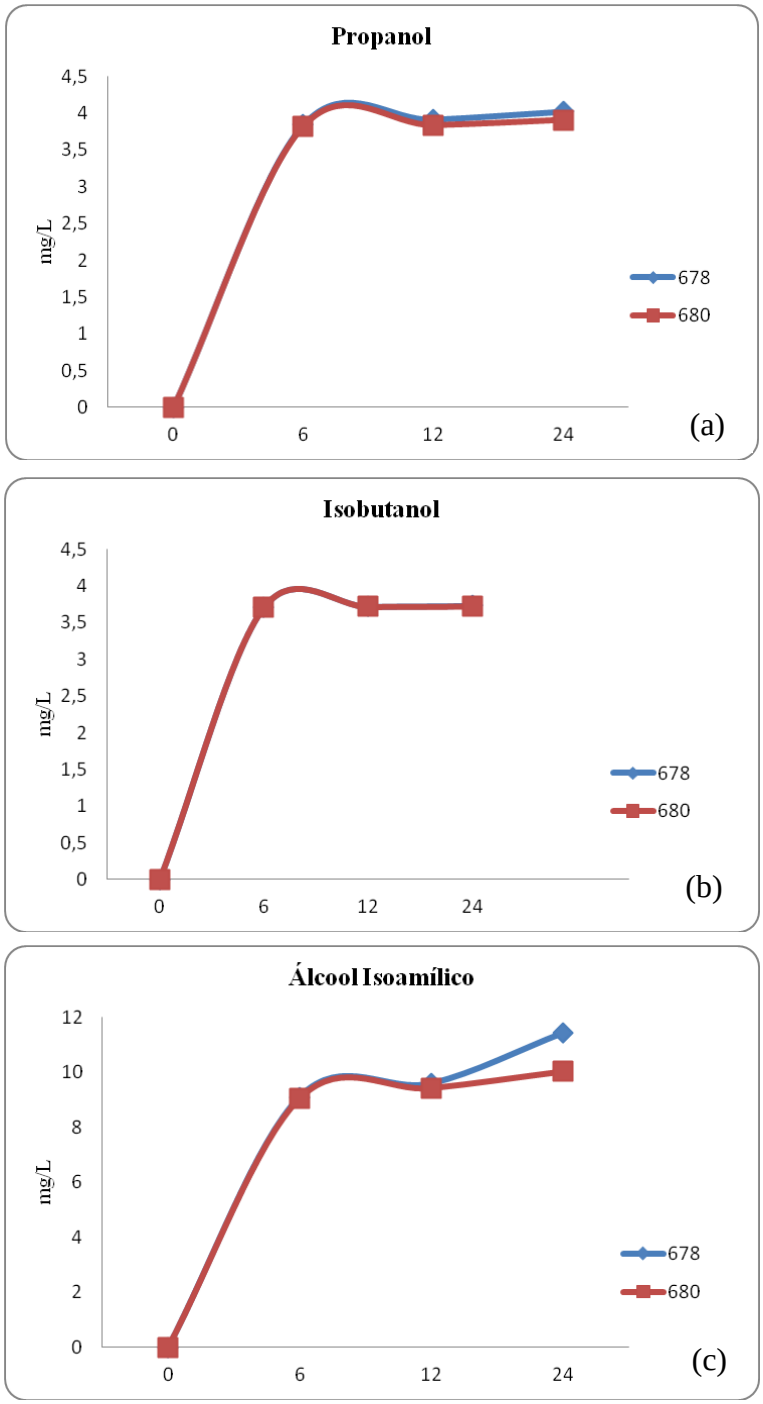


Figura 18. Cinética de formação dos compostos secundários n-propanol (a), isobutanol (b) e álcool isoamílico das linhagens LBCM 678 e LBCM 680. As linhagens foram inoculadas em meio melaço a 8 ºBrix e as amostras foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas.

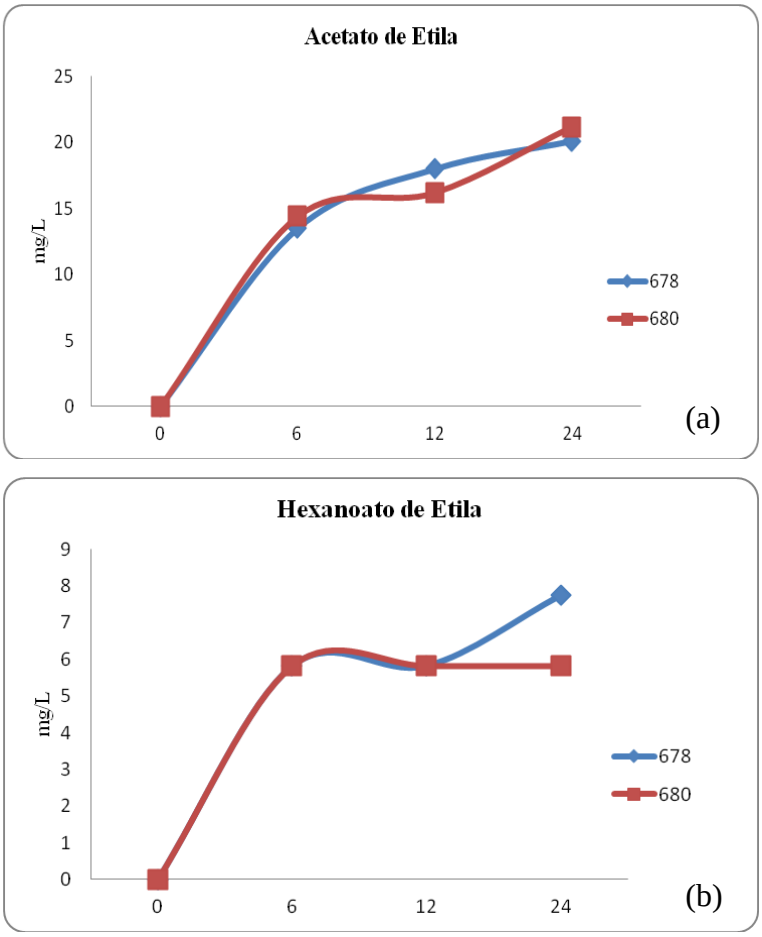


Figura 19. Cinética de formação dos compostos secundários acetato de etila (a) e hexanoato de etila (b) das linhagens LBCM 678 e LBCM 680. As linhagens foram inoculadas em meio melaço a 8 ºBrix e as amostras foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas.

equivalente entre as linhagens foi também observado para o isobutanol (Figura 18b) e álcool isoamílico (Figura 18c).

Ésteres voláteis são responsáveis pelo aroma frutado de bebidas fermentadas e consequentemente constituem um grupo vital de compostos aromáticos desejáveis em cervejas e vinhos. Dessa forma, foi avaliado o octanoato de etila, decanoato de etila, porém não foi dectectado dentro dos limites do equipamento. O acetato de etila analisado não apresentou diferença na cinética fermentativa das duas linhagens (Figura 19a). assim como para o ester hexanoato de etila (Figura 19b). Foi analisado um ciclo fermentativo de 24 horas, pois estas linhagens, quando levadas para escala de produção, atingiram um ciclo equivalente, não justificando um ciclo superior a este período citado.

4.7 Caracterização molecular das linhagens selecionadas

4.7.1 Confirmação da espécie das leveduras selecionadas

Embora nas linhagens LBCM 678 e LBCM 680 tenham sido identificados, após amplificação com os primers ITS1-ITS4, fragmentos de aproximadamente 850 pb, característico da espécie *S.cerevisiae* (Figura 20) e, para confirmar a identificação dessas linhagens como sendo *S. cerevisiae*, os produtos de amplificação da região ITS das linhagens isoladas e selecionadas foram digeridos com as endonucleases de restrição *HaeIII, HinfI e CofI*. A digestão do produto de amplificação com *HaeIII* gerou fragmentos de 320, 220, 180 e 145 pb (Figura 21) e, realizada a digestão com o produto de amplificação com *HinfI*, revela 2 fragmentos com 395 e 145pb, conforme mostrado na Figura 22. O perfil obtido pela digestão do produto de amplificação com *Cfo*I gerou dois fragmentos, um entre 300 e 400 pb e outro entre 100 e 200 pb (Figura 23).

Coton e colaboradores (2010) demonstraram que a digestão do produto ITS-5.8S de *S. cerevisiae* pela enzima *CfoI* produz 3 fragmentos com 380, 360 e 160 pb. Porém, Souza (2010) verificou também três fragmentos, contendo 385, 365 e 135 pb. Da mesma maneira, os padrões de restrição mostrados na Figura 22 correlacionam-se com os dados publicados por Coton e colaboradores (2006), que obtiveram, como produto da digestão por *HinfI*, dois fragmentos, contendo 395 e 145 pb. Guillamón e colaboradores

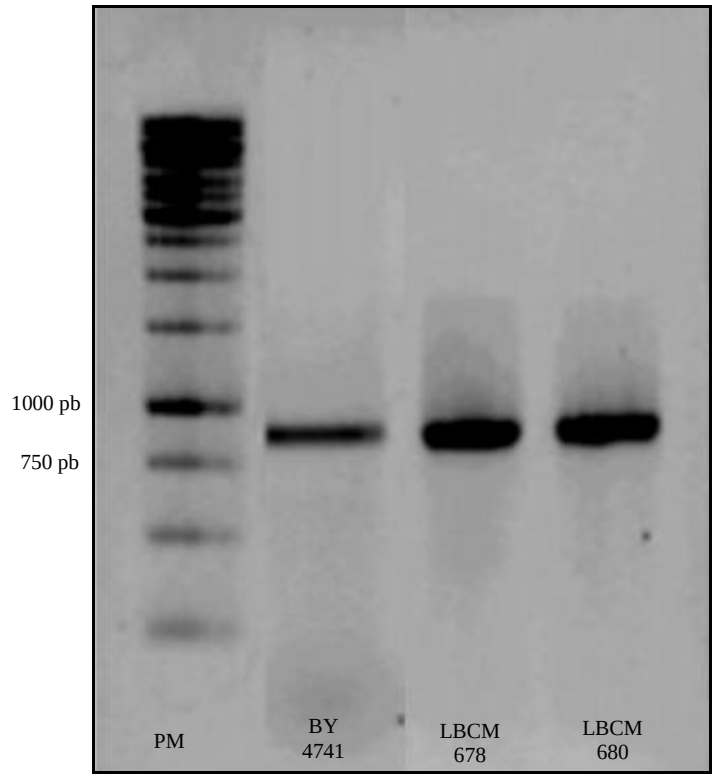


Figura 20. Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o fragmento ITS da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680, amplificado a partir dos *primers* ITS1 e ITS4. PM representa o padrão de peso molecular (1 KB Invitrogen).

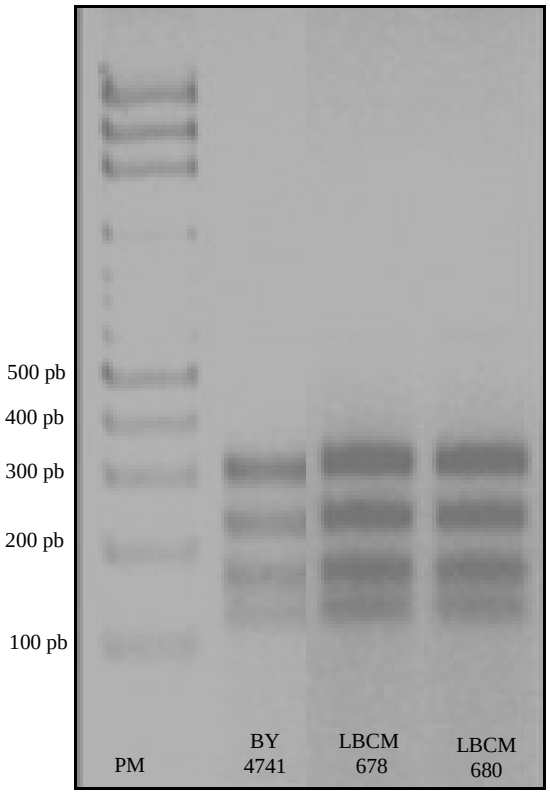


Figura 21. Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o produto de digestão do fragmento de ITS – 5.8S com a endonuclease enzima de digestão *HaeIII*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680. PM representa o padrão de peso molecular (100-3000 bp Axygen Biosciences).

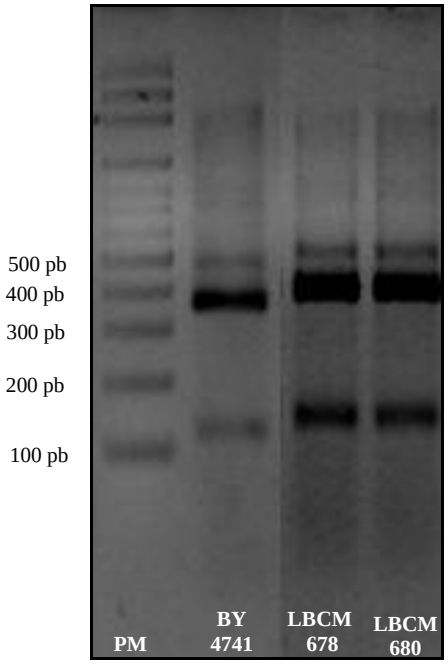


Figura 22. Gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima *HinfI*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680. PM representa o padrão de peso molecular (100-3000 bp Axygen Biosciences).

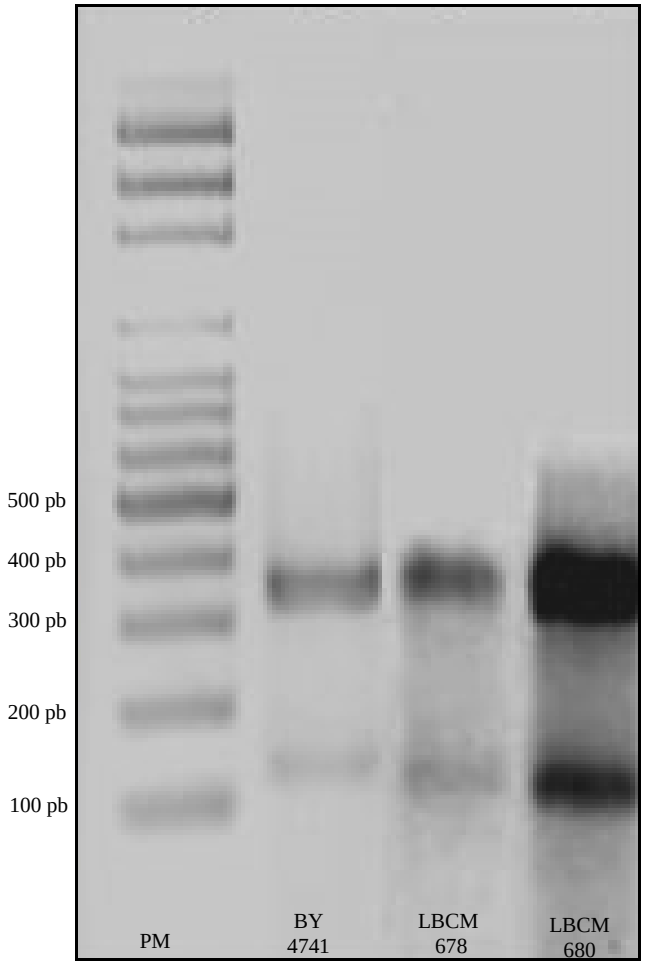


Figura 23. Fragmentos de restrição das regiões ITS-5.8S, em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (1 µg/mL), após digestão com a enzima *CfoI*, da linhagem laboratorial BY 4741 e das linhagens selvagem LBCM 678 e LBCM 680. PM representa o padrão de peso molecular (100-3000 bp Axygen Biosciences).

(1998) também relatam um produto com dois fragmentos, dessa vez contendo aproximadamente 365 e 155 pb. Nos resultados apresentados por Segura e colaboradores, (2010), foram obtidos 3 fragmentos com aproximadamente 364, 121 e 77 pb.

Portanto, o tamanho dos fragmentos das linhagens LBCM 678 e LBCM 680 está de acordo com o previsto para a região ITS1-ITS4 de *S. cerevisiae* (http://db.yeastgenome.org), confirmando, assim, as linhagens como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*.

4.7.2 Verificação da prevalência - acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo pelo Método de identificação por mtDNA-RFLP

Durante o processo fermentativo, o método de mtDNA – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of mitocondrial DNA*) foi usado para monitorar a prevalência e a permanência das linhagens de leveduras LBCM 678 e LBCM 680 durante o processo fermentativo. Cerca de 100 colônias de leveduras obtidas a cada intervalo de 3 ciclos fermentativos em um total de 9 ciclos sucessivos de fermentação foram submetidas à análise de RFLP do DNA mitocondrial. As linhagens predominaram em 100% ao longo dos 9 ciclos de fermentação, correspondendo ao perfil RFLP do DNA mitocondrial da linhagem inoculada (Figura 24).

Apesar desse método não diferenciar entre as leveduras LBCM 678 e LBCM 680, é um método para identificar a presença de linhagens do gênero *S.* e linhagens das molecularmente distintas em fermentações espontâneas. De fato, a análise do pérfil de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA-RFLP) tem sido apontada como uma técnica eficiente para caracterizar e diferenciar linhagens industriais de *S. cerevisiae* (Guillamón *et al.,* 1996; López *et al.,* 2001). Dessa forma, mtDNA-RFLP tem-se mostrado útil para diferenciar linhagens isoladas de um mesmo mosto e para monitorar a persistência e a prevalência de linhagens específicas durante todo o processo fermentativo, além de ser uma técnica rápida, fácil e de relativo baixo custo (SCHÜLLER, 2004; ARAÚJO *et al.,* 2007; GOMES *et al.,* 2007; BERNARDI *et al*., 2008; BADOTTI, 2009; SILVA *et al*., 2009; MARINI *et al.*, 2009, SOUZA *et al*., 2012).

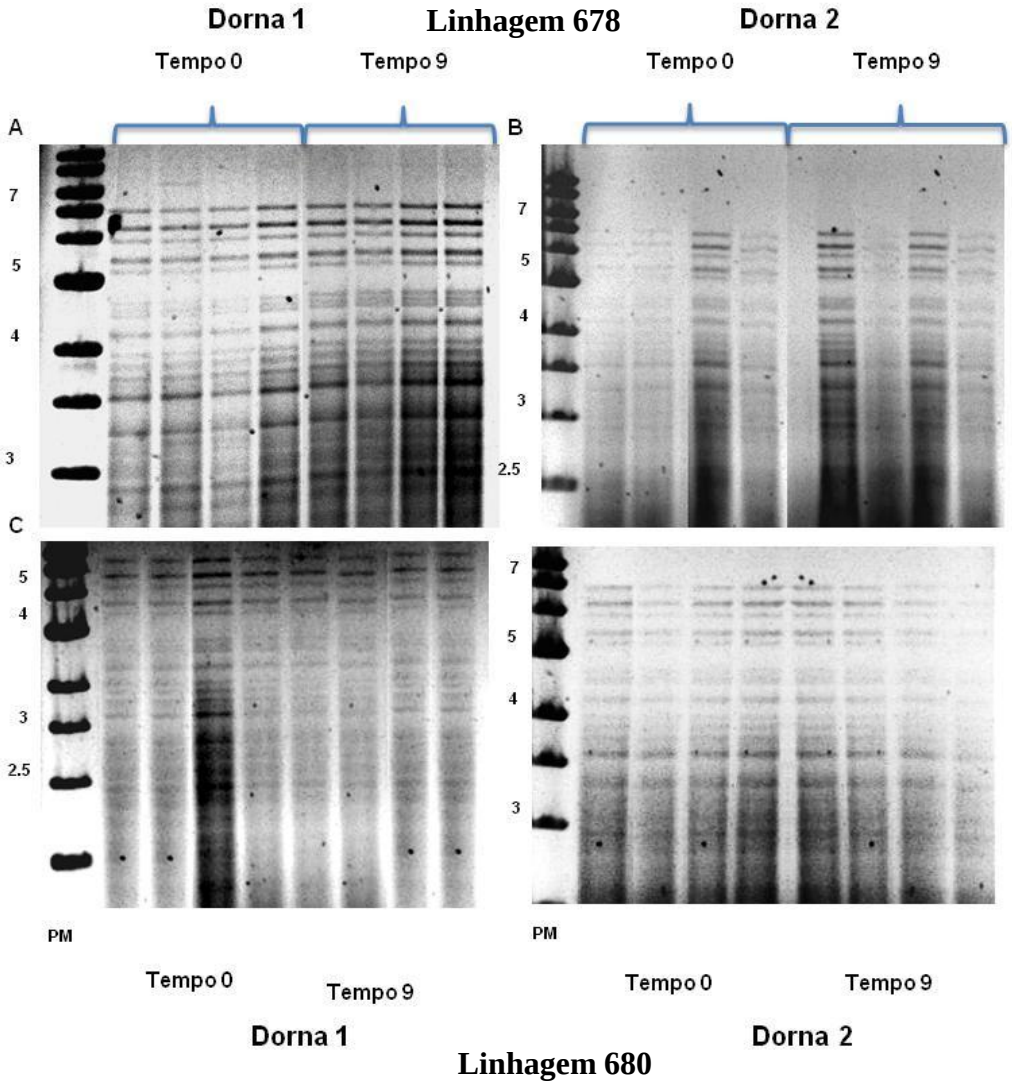


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do mtDNA-RFLP (*mitocondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism*) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680. São mostradas 4 colônias para cada tempo inicial e final do experimento. PM representa o padrão de peso molecular (100-3000 bp Axygen Biosciences).

4.7.3 Polimorfismo molecular das duas linhagens selecionadas

4.7.3.1 Diferenciação por RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Com o objetivo de comparar geneticamente as linhagens de *S. cereviseie*, foi estudada a variabilidade por meio da reação de RAPD, usando DNA genômico das 2 linhagens selecionadas LBCM 678 e LBCM 680, e com a utilização dos *primers* EI1 e LA1, foi obtido um padrão de amplificação de fragmentos de DNA para as linhagens.

Em vários trabalhos tem sido descrita a utilização da técnica de RAPD-PCR para diferenciar linhagens de leveduras e determinar o grau de polimorfismo (BARROS LOPES *et al*., 1996; GUERRA *et al.*, 2001; PEREZ *et al*., 2001; PLENGVIDHYA *et al*., 2004; VICENTE, 2007). Essa técnica foi utilizada em nosso trabalho para diferenciação de indivíduos e demonstrar a grande variabilidade de linhagens que ocorre durante a fermentação da cachaça como descrito por Guerra e colaboradores (2001).

O perfil de bandas gerado pelas linhagens LBCM 678 e LBCM 680 foi muito similar, quer seja pelas bandas detectadas quer pela intensidade da coloração obtida, não havendo diferença significativa entre as linhagens (Figura 25a). De fato, Guerra e colaboradores (2001), estudando a diversidade de linhagens *S. Cerevisie,* durante o processo fermentativo da cachaça, observaram poucas diferenças de perfil de bandeamento entre as leveduras isoladas utilizando o método de RAPD-PCR. Estes autores atribuiu essa observação à possibilidade de existência de mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções distribuídas no genoma. Em estudo sobre a dinâmica de leveduras selvagens e linhagens iniciadoras em vinho tipos *Riesling* e *Chardonnay*, observou-se que é possível distinguir algumas linhagens selvagens, mas não todas, utilizando diferentes *primer*s em reações de PCR (EGLI *et al.*, 1998). Porém, Oliveira e colaboradores (2008), usando as mesmas condições dessa técnica para avaliar o perfil de bandas, gerado por linhagens isoladas de diferentes destilarias do Estado de Minas Gerais, observou que elas foram similares, porém o método não foi eficiente para delimitação das linhagens selecionadas.

4.7.3.2 Diferenciação por COX-PCR

Também é uma técnica utilizada no intuito de verificar o polimorfismo entre as linhagens estudadas. É um método baseado na variação do número e posição dos introns no gene mitocondrial COX1, sendo que a variação destes introns tem sido também reportada entre linhagens da mesma espécie (LÓPEZ *et al.*, 2003).

Em função dos resultados obtidos anteriormente, as linhagens foram submetidas a este método para diferenciação das linhagens *S. cerevisiae* utilizadas na produção de cachaça. Na Figura 25b, podemos observar o resultado da reação de amplificação usando os 4 *primers* 3L, 3R, 4L e 5R, na qual as linhagens de leveduras LBCM 678 e LBCM 680 apresentaram um perfil similar. Oliveira e colaboradores (2008), ao avaliar o perfil de bandas, gerado por linhagens isoladas de diferentes destilarias do Estado de Minas Gerais, observou que as linhagens apresentaram um perfil diferenciado, mostrando que, apesar da grande similaridade há um polimorfismo molecular, entre as linhagens analisadas.

4.7.4 Análise de microssatélites

Na identificação dos microssatélites, foram utilizados seis pares diferentes de *primers* seguido da metodologia descrita por Péres e colaboradores (2001) e Souza (2010). Sendo demonstrado na Tabela 8, onde diferentes polimorfismos foram encontrados dentre as 2 linhagens selvagem isoladas.

Uma variação de alelos foi encontrada entre as 2 linhagens estudadas. Os *loci* ScAAT1 e ScAAT3 têm sido descritos como os que apresentam maior grau de polimorfismo (PÉREZ *et al.*, 2001; SHULLER *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008, SOUZA, 2010). Nossos resultados confirmam que os *loci* ScAAT1, ScAAT2 e ScAAT3 permitiram identificar diferenças polimórficas; porém os demais *loci* apresentaram similaridade.

Além disso, foram identificados oito novos alelos sendo eles: 153 pb e 180 pb do *lócus* ScAAT1, alelos 361 pb e 385 pb do *lócus* ScAAT2, alelos 235 pb do *lócus* ScAAT3, alelos 332 pb do *lócus* ScAAT4, alelos 234 pb do *lócus* ScAAT5 e alelos 261 pb do *lócus* ScAAT6. Oliveira e colaboradores (2008), ao avaliar linhagens isoladas de

diferentes destilarias das regiões de Salinas, Jequitinhonha, Ouro Pretos, Perdões e Lavras no estado de Minas Gerais também encontraram novos alelos.

A técnica de microssatélites, que utiliza sequências (*primers)* curtas de até seis nucleotídeos, os quais são encontrados no genoma de vários micro-organismos, foi relatada como muito útil para *S. cerevisiae* (BALEIRAS-COUTO *et al.,* 1996; PEREZ; GALLEGO & HIDALGO, 2001). Schuller e colaboradores (2004) realizaram um levantamento de métodos moleculares para identificação de leveduras, sendo a combinação de dois *loci* (ScAAT1 e ScAAT3) geradores de maior polimorfismo. Essa técnica de microssatélites configura-se uma ferramenta poderosa e promissora para o estudo em grande escala como a determinação da proximidade genética (estudos filogenéticos) e distribuição biogeográfica de linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, tendo como desvantagens o maior custo em investimentos de equipamentos, requerendo, ainda, pessoas com maior qualificação para a sua execução (SCHULLER *et al.*, 2004).

Apesar da indicação dos *loci* ScAAT1 e ScAAT3 como os que apresentam maior grau polimórfico (PÉREZ *et al.*, 2001b; SCHULLER *et al.,* 2004), o *locus* ScAAT1 foi o marcador com maior polimorfismo, apresentando 4 alelos. Além dos 41 alelos (51 linhagens) previamente descritos para ScAAT1-ScAAT6 (PÉREZ *et al.,* 2001), oito novos alelos foram identificados no presente estudo, utilizando 2 linhagens selvagem (153, 180, 361, 385, 235, 332 234 e 261 pb). Souza (2010), analisando a diversidade alélica de quatro linhagens selvagens isoladas de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, sendo elas: Patos, Divinópolis, Araguari e Januária, encontrou quatro novos alelos (354, 283, 286 e 296 pb). A maior parte dos alelos encontra-se distribuída na linhagem LBCM 680. Porém as linhagens LBCM 678 e LBCM 680 compartilham os alelos mais frequentes para os marcadores ScAAT2, ScAAT3, ScAAT4, ScAAT5 e ScAAT6 (361, 250, 332, 228, 234 e 261 pb respectivamente). Alelos distintos e únicos foram identificados em quatro dos seis marcadores analisados (ScAAT1, ScAAT2, ScAAT3, ScAAT5 e ScAAT6). Uma situação peculiar está na presença de quatro alelos comuns a duas linhagens para os lócus ScAAT4, ScAAT5 e ScAAT6 (332, 228-234 e 261 pb respectivamente).

Observou-se, também, entre as duas linhagens estudadas, um distinto grau heterozigótico. Souza (2010) também observou esta evidência em três das quatro

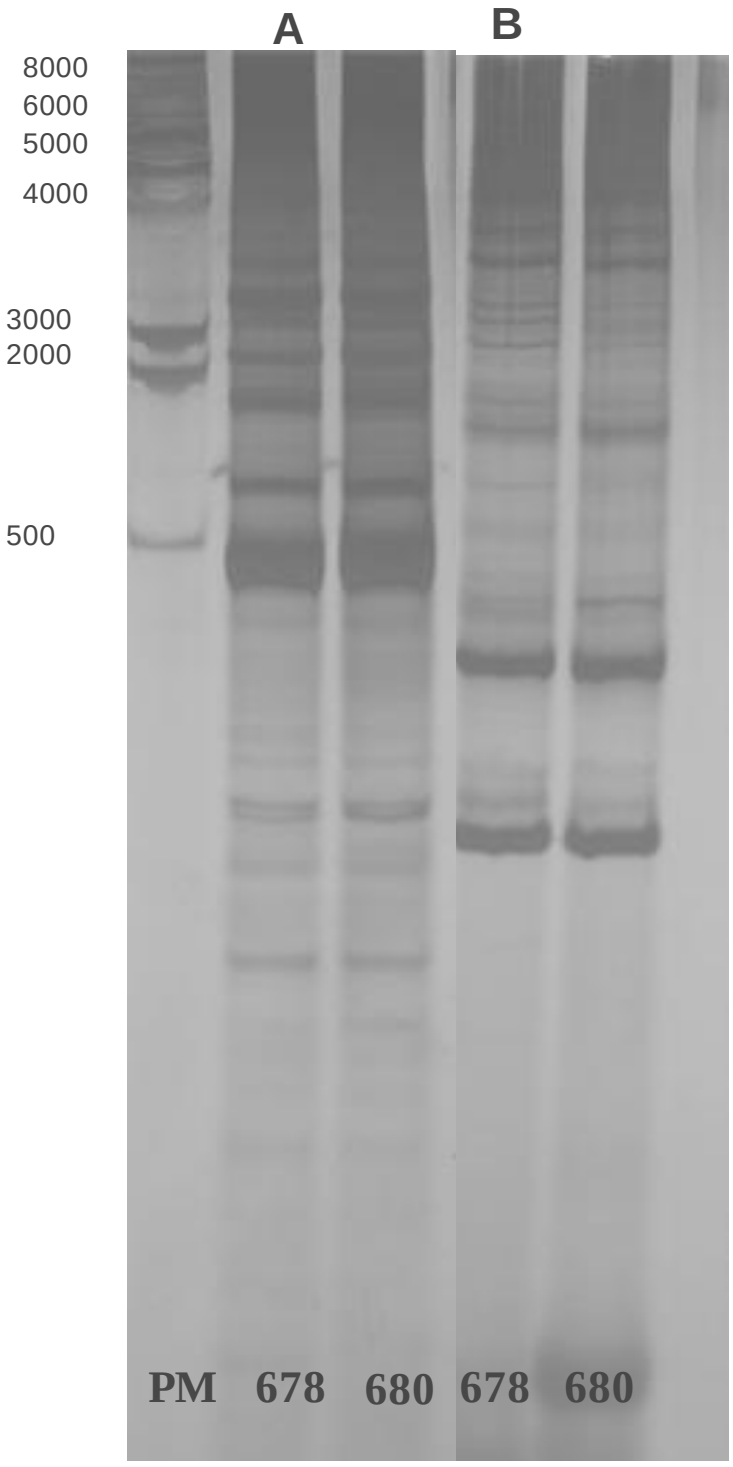


Figura 25. RAPD-PCR (a) e COX-PCR (b) das linhagens de leveduras *S. cerevisiae* LBCM 678 e LBCM 680, isoladas de destilarias da microrregião de Salinas (MG) em 2008. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

Tabela 8. Diversidade alélica de duas linhagens selvagens selecionadas da microrregiãode Salinas – MG comparadas com a linhagem W303.

Linhagem	ScAAT1	ScAAT2	ScAAT3	ScAAT4	ScAAT5	ScAAT6
	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos
LBCM 678	153 - 192	361	250	332	228 – 234	261
LBCM 680	180 - 231	361 – 385	235 – 250	332	228 – 234	261
W303	180	323	261	403	271	231

linhagens estudadas. Os *loci* ScAAT4, ScAAT5 e ScAAT6 não apresentaram nem uma variação entre os alelos. Porém Souza (2010) observou essa característica somente para os *loci* ScAAT5 e ScAAT6. Oliveira e colaboradores (2008) não observou esta evidência para as linhagens estudadas. Segundo Souza (2010), o aparecimento de alelos raros e de um baixo nível de homozigotos aponta para a existência de sub-populações isoladas de linhagens de leveduras com constituição genética distinta.

Portanto, levando todos esses aspectos em consideração podemos concluir que essa metodologia evidencia que não somente as duas linhagens são molecularmente distintas, como também corroboram o alto grau de polimorfismo apresentado entre linhagens de *S. cerevisiae* isolados de diferentes regiões. No contexto da criação de estratégia de obtenção de uma Indicação Geográfica tipificada como Denominação de Origem, essa metodologia mostrou-se mais adequada.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho podemos concluir que:

Foram isoladas 7680 linhagens de leveduras oriundas de diferentes dornas de fermentação da microrregião de Salinas (MG), mas somente 18 linhagens de *S.cerevisiae* apresentaram características apropriadas para atender às condições empregadas no processo produtivo da cachaça, a saber LBCM: 630, 631, 633, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681,682

As 15 linhagens testadas no processo fernentativo em escala piloto apresentaram bons resultados em relação à produção de compostos aromatizantes.

No estudo de fermentação em escala piloto, das 6 linhagens analisadas LBCM: 668, 678, 671, 676, 680, 681, as linhagens LBCM 678 e LBCM 680 apresentaram melhor desempenho fermentativo e parâmetros físico-químicos. E quando testadas em ambiente de produção, apresentaram resultados similares em relação a tempo de fermentação, teor alcoólico e acidez do vinho, álcool superior e ésteres.

Em relação à caracterização molecular, nossos resultados demonstraram que a análise de microssatélites permitiu uma nítida distinção dentre as linhagens analisadas, sendo identificados entre as duas linhagens analisadas 8 novos alelos, ao contrário das técnicas de RAPD-PCR e COX-PCR, que não apresentaram distinção entre as linhagens. Uma vez mais, nosso laboratório encontra evidências de que o uso combinado de diferentes técnicas para a análise do polimorfismo das linhagens é a estratégia mais adequada.

Em resumo, a caracterização molecular mostrou grande polimorfismo entre as linhagens selecionadas e claras diferenças sobre linhagens isoladas de outras regiões de Minas Gerais, o que, a nosso ver, constitui-se numa estratégia adicional para o requerimento de Indicação Geográfica do tipo Denominação de Origem, baseado na linhagem isolada da região e que apresente propriedades mais adequadas à produção de cachaça.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Determinação do teor alcoólico – NBR 138920. São Paulo: ABNT, 1997a.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856. São Paulo: ABNT, 1997b.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Determinação de aldeídos - São Paulo: ABNT, 1997c.

Amorim, H. V.; Oliveira, A. J. Infecção na fermentação: Como evitá-la. Álcool e Açúcar, São Paulo, v.2, n.5, p.12-18, 1982.

APEX – AGÊNCIA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS. Disponível em: <http://www.apexbrasil.com.br/noticia_detalhe.aspx=180. Publicado em 23 mar. 2006. Acesso em 25 mar. 2011.

Aquarone, E.; Lima, U. De A.; Borzani, W. Alimentos e bebidas produzidas por fermentação. São Paulo: Edgar Blucher, 1983. 227p.

Araújo, R. A. C.; Gomes, F. C. O.; Moreira, E. S. A.; Cisalpino, P. S.; Rosa, C. A. Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça. Brazilian Journal Microbiology, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 217-223, 2007.

Aresta, M.; Boscolo, M.; Franco, D.W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. Journal Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 6, n. 49, p. 2819-2824, 2001.

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. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(6), 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(8), 2061-2065.

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

Baleiras Couto, M. M; Eijsma, B.; Hofstra, H.; Huis In't Veld, J.H.J. & van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (1):41–46.

Baleiras-Couto, M., Reizinho, R., Duarte, F., 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. Int. J. Food Microbiol, 102, 49-56.

Baleiras-Couto, M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M., 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. J. App. Bacteriol., 79, 525-535.

Barcelos, L. F. V.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Anjos, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. Química Nova. v. 30, n.4, p. 1009-1011, 2007.

Barnet, J. A. The utilization of dissacharides and some other sugars by yeasts. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Washington, v. 39, p. 347-404, 1981.

Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D., 1990. Yeasts: Characteristics and identification. 2ª ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Barros Lopes, M., Soden, A., Hebschke, P. A., Langridge. P. (1996). PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site *primer*s. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12), 4514-4520.

Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A., Langridge, P. (1998). Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48, 279-286.

Batista, F. R. M. Estudo do processo de destilação alcoólica continua: Simulação de plantas industriais de produção de álcool hidratado, álcool neutro e cachaça. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas - SP. 2008.

Bendoni B., Cavalieri D., Casalone E., Polsinelli M. & Barberio C. (1999) Trifluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine. FEMS Microbiol. Lett. 180: 229-233.

Bernardi, T.L., Pereira, G.V.M., Cardoso, P.G., Dias, E.S. and Schwan, R.F. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP.). World J Microbiol Biotechnol 24, 2705–2712.

Berry, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. Fermented Beverage Production. 1 ed. London: Blackie Academic & Professional, Cap 2, p. 32-44, 1995.

Betz, C.; Schlenstedt, G. & Bailer, S.M. (2004) Asr1p, a novel yeast Ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. The J. Biolog. Chem. 279 (27): 28174–28181.

Berthels NJ, Cordero Otero RR, Bauer FF, Thevelein JM, Pretorius IS (2004) Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS Yeast Res 4:683-689.

Borges, Carlos Alexsandro. Avaliação da qualidade de cachaças do estado da Bahia. 2011. 66f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2011.

Boscolo M., Bezerra C.W.B., Cardoso D.R., Neto B.S.L. & Franco D.W. (2000) Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugarcane spirit. J Braz Chem Soc 11: 86-90.

Bradbury, L. M. T.; Fitzgerald, T. L.; Henry, R. J.; Jin, Q. S.; Waters, D. L. E. *The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal* 2005; 3:363-370.

BRASIL. Lei n. 9279, de 14 de maio de 1996. Regulam direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Presidência da República, Brasília, DF, 14 de maio de 1996. Disponível em: < https://www.planalto.gov.br/> Acesso em 19.maio. 2012.

BRASIL. Decreto n° 6.871, de 4 de junho de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamenta a Lei n° 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF, 4 de junho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005 - Junho de 2005. Aprovar 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005 b. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 set. 2005b. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 2.314 de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 5 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 4062 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.

Buschiazzo, E & Gemmell, N. J. (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes BioEssays 28:1040–1050.

Campelo, E. A. P. Agronegócio da cachaça de alambique de Minas Gerais: panorama econômico e social. Revista Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 7-18, setembro/outubro2002.

Campo. E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. Journal of Chromatography A, 1140, 180-188. 2006.

Cardello, H. M. A.B.; Faria, J.B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante envelhecimento em tonel de carvalho (Quercus Alba L). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.18, n.2, p.169-175, 1998.

Cardoso, Andrade-Sobrinho LG, Leite-Neto AF, Reche RV, Isique WD, Ferreira MM, Lima-Neto BS And Franco DW (2004). Comparation between cachaça and rum using pattern recognition methods. *J Agric Food Chem* 52: 3429-3433.

Cardoso, M. G. das. Análises físico-químicas de aguardente. In: In: CARDOSO, M. G. Das. (Ed.). Produção de Aguardente de Cana. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p., cap. 5, p. 203-232.

Carvalho, G. B. M.; Bento, C. V.; Almeida E Silva, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. Revista Analytica, n.25, out./nov., 2006.

Casalone, E., Fia, G., Barberio, C., Cavalieri, D., Turbanti, L., Polsinelli, M. (1997). Genetic and biochemical of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. *Res. Microbiol*. 148, 613-623.

Cavalieri, D., Casalone, E., Bendoni, B., Fia, G., Polsinelli, M., Barbeiro, C. (1999). Trifluoroleucine resistance and regulation of α-isopropylmalate synthase in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet*. 261, 152-160.

Celenza, J. L., Carlson, M. (1989). Multational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol*. 9, 5045-5054.

Cerdán, T. G.; Mozaz, S. R. & Azpilicueta, C. A. Volatile composition of aged wine in used barrels of french oak and of american oak. Food Research International , 35, 603-610. 2002.

Cherubin, R. A.. Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*). 1998. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de são Paulo, Piracicaba, 1998.

Cocolin, L., Pepe, V., Comitini. F., Comi. G., Ciani. M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* 5, 237-245.

Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., Cocolin, L. (2000). Mitochondrial DNA restriction enzime analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine producing area of Collio (Italy). *Inter. Journal of Food Microb*. 58, 117-121.

COOCACHAÇA: Cooperativa da cachaça de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.coocachaca.com/>. Acesso em: 20 set. 2008.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. International Journal of Food Microbiology 108: 130-135.

Coton, M. - Romano, A. – Spano, G. et al. 2010. Occurrence of biogenicamine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. In Food Microbiology, vol. 27, issue 8, 2010, p. 1078-1085.

D´Hautcout, O., Smart, K. A. (1999). Measurement of brewing yeast flocculation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57(4), 123-128.

Dato Mcf, Pizauro Jm Jr, Mutton Mjr (2005). Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of ‘‘cachaça’’. Braz J Microbiol 36:70–74.

De Barros L.M., Rainieri S., Henschke P.A. & Langridge P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. Int.J.Syst.Bacteriol. 49: 915-924.

De Barros L.M., Soden A., Henschke P.A. & Langridge P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. Appl.Environ.Microbiol.62: 4514-4520.

Ding, J; Huang, X; Zhao. N; Gao. F; Lu, Q & Zhang, K. (2010) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein Asr1p. J. Microbiol. Biotechnol. 20(12): 1630–1636.

Ekunsanmi, T. J., Odunfa, S. A. (1990). Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activies of same yeast strains isolated from steep water of fermentationg cassava tubers. *J. Appl. Bacteriol*. 69, 672-675.

Erten, H. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of Kloeckera apiculata and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 373–379. 2002.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 329-337.

Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra. E., Querol, A., (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. Inter. *Journal of Food Microbiol*. 70, 1-10.

Fernández-Espinar, M.T., Martorell, P., de Llanos, R., Querol, A., Querol., 2006. Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages. In: The Yeast Handbook – Yeast in Food and Beverages (Querol, A., Fleet, F.T., eds), Heidelberg: Springer-Verlag, pp 55-82.

Ferreira M.M.C., Antunes A.M., Melgo M.S. & Volpe P.L.O. (1999) Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. Quím.Nova 22: 724-731.

Field, D. & Wills, C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in Saccharomyces cerevisiae, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. Proc Natl Acad Sci 95(4):1647-52.

Fleet, G. H., Gillian, M. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 727-728.

Forlin, F. J. Maturação de cachaça em recipientes de poliéster com extrato de madeira de carvalho. 2005. 174f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

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. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4076-4078.

Gancedo, C.; Serrano, R. Energy-yielding metabolism. The Yeast, London, v. 3, n. 2, p. 205-259, 1989.

Gao, C., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and Kloeckera *apiculata*. Journalof Applied Bacteriology 65, 405– 410.

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.

Goldstein, A., Lamen, J. O. (1975). β-D-fructofuranoside fructo-hidrolase from yeast. *Methds enzymol*. 42, 504-511.

Gomes , F. C. O.; Silva, C. L. C.; Marini, M. M.; Oliveira, E. S.; Rosa, C. A. use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. Journal of *Applied and Environmental Microbiology*, Malden, v. 103, n.6, p. 2438-2447, 2007.

Gomes, F. C. O.; Badotti, F.; Silva, P. A B. Da; Campos, C. R. A.; Sales, A. C.; Schwan, R. F.; Rosa, C. A. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas *Saccharomyces cerevisiae*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 25-31, jan./fev. 2009.

Gonçalves, Cleber Miranda; ROSA, Carlos Augusto; UETANABARO, Ana Paula Trovatti. Manual de Boas Práticas: Cachaça de Alambique. Bahia- Ilhéus: Editus, 2009.

Guerra, J. B., Araújo, R. C. A., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S.A., Mendonça-Hagler, L. C., Rosa. C. R. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. Letters in Applied Microbiology. 33, 106-111.

Guillamón J.M., Barrio E., Huerta T. & Querol A. (1994) Rapid characterization of four species of the Saccharomyces sensu stricto complex according to mitochondrial DNA patterns. Int.J.Syst.Bacteriol. 44: 708-714.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol., 169, 387-392.

Hansen, E.H.; Nissen, P.; Sommer, P.; Nielsen, J.C.; Arneborg, N. The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentation of

grape juice with Saccharomyces cerevisiae. Journal of *Applied and Environmental Microbiology,* 91, 541–547. 2001.

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. Journal of Applied Bacteriology 65, 23–28.

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. L., mingorance-cazorla, l., clemente-jimenez, j. M., rodriguez-vico, F. (2002). Identification of yeast epecies from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 1503, 1-7.

Howell, K.S.; Bartowsky, E.J.; Fleet, G.H. & Henschke, P.A. (2004) Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. Lett Appl Microbiol. 38(4):315-20.

Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., Imayasu, S. (1991). Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agri. Biol. Chem*. 55(8), 2153-2154.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. Mercado externo. IBRAC. Disponível em: http://www.ibrac.net. Acesso em: 22 abril. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. Mercado interno. IBRAC. Disponível em: http://www.ibrac.net. Acesso em: 22 abril. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agro 2006, http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias. Acesso em: 23 março 2011.

Janzantti, N. S. Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça. 2004. 179f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.

Jeronimo, E. M. O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça. 2004. 121f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2004.

Jibiki, M., Ishibiki, T., Yuuki, T., Kagami, N. (2001). Application of polymerase chain reaction to determine the flocculation properties of brewer´s lager yeast. *J. Am. Brew. Chem.* 59(3) 107-110.

Jin, Y., Ritcey, L. L., Speers, R. A., Dolphin, P. J. (2001). Effect of cell surface hydrobicity, charge, and zimolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 59(1), 1-9.

Jin, Y., Speers, R. A. (2000). Effect of environmental conditions on the floculation of *Saccharomyces cerevisiae. J. Am. Soc. Brew. Chem*. 58(3), 108-116.

Jiranek V., Langridge P. & Henschke P.A. (1995a) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. Appl.Environ.Microbiol. 61: 461-467.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A. (1995b). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H_2S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *American Journal of Enology and* Viticulture 46(2), 269-273.

Kaosowski, G., Czuprynski, B., 2006. Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. J. Food Eng. 72, 242–24.

Kuypers, M.MM.; Lavik, G. Woebken, D. Schmid, M. Fuchs, B.M. Amann, R. Barker Jøregensen, B. & Jetten, M.S.M. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 102., 6478–6483.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 21, 97-129.

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.

Legras. J. L., Karst. F. (2003). Optimisation of interdelta analysis *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters* 221, 249-255.

Lilly, M., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2), 744-753.

Lima, A. J. B.; Cardoso, M. G.; Guerreiro, M. C.; Pimentel, F. A. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. Química Nova. v.29, n.2, p. 247-250, 2006.

Lima, U. A.; Basso, L. C.; Amorim, H. V. In: Lima, U. A. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p.1- 43. (Biotecnologia Industrial; v.3).

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

Lopez V., 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.

Lopez, V., M. T. Fernadez-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.

López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernandez-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 68, 75-81.

Lyness, C. A., Steele, G. M., Stewart, G. (1997). Investigating ester metabolism: characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 55(4), 141-146.

Machado, A. F. As indicações geográficas no Brasil e no mundo. Um panorama atual. In: Luis Felipe Balieiro Lima. (Org.). Propriedade Intelectual no Direito Empresarial. 1 ed. São Paulo: Quartier Latin, 2009, v. 01, p. 155-196.

Maia, a. B. R. A., pereira, a. J., schwabe, w. K. (1994). 2° Curso de Tecnologia para Produção de Aguardente de Qualidade. Fundação Christiano Ottoni. 74p.

Maia, A. B.; Campelo, E.A.P. Tecnologia da Cachaça de Alambique. SEBRAE/MG; Sind Bebidas. Belo Horizonte 2006.

Malgoire, J.Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J.M., Mallié, M., 2005. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. J. Clin. Microbiol. 43, 1133–1137.

Mamede, M. E. O., & Pastore, G. M. (2004). Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da ‘‘Serra Gaúcha’’ (RS). Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24 (3), 453–458.

Mariangeli. P., Angelozzi. D., Ciani. M., Clementi. F., Mannzzu. I. (2003). Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Research* 1664, 1-9.

Marinangeli, P.; Clementi, F.; Ciani, M.; Mannazzu, I. (2004) SED1 polymorphism within the genus Saccharomyces. FEMS Yeast Res 5(1):73-9.

Marini, M.; Gomes, F. C. O.; Silva, C. L. C.; Cadete, R. M.; Badotti, F.; Oliveira, E. S.; Cardoso, C. R.; Rosa, C. A. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 235-242, 2009.

Martinez, F., Toledano, F., Millán, C., Ortega, J. M. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from 'Pedro Ximenez' grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiol*. 7, 217-225.

Mason, A. B., Dufor, J. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1278-1298.

Miranda, M.B.; Martins, N.G.S.; Belluco, A.E.S.; Horii, J.; Alcarde, A.R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 4, p.897-901, 2007.

Mitterdorfer, G., Mayer. H. K., Kneifel, W., Viernstein, H., (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 93, 521-530.

Morais, P. B.; Rosa, C. A.; Linardi, V. R.; Pataro, C.; Maia, A. B. R. A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 241-243, 1997.

Mutton, M.J.R., Mutton, M.A. Aguardente de cana: produção e qualidade. Jaboticabal: Fundação Estadual de Pesquisas Agronômicas, 1992. 171 p.

Nonato, E.A.; Carazza, F.; Silva, F.C.; Carvalho, C.R. And Cardeal, Z.L. (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.

Oliveira Es, Cardello Hmab, Jerônimo Em, Souza Elr, Serra Ge (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. Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais. 2001. 135p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

Oliveira, E. S; Maia, A. B. R.A; Rosa, C. A. Silva, C. L. C. Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não produtoras de h2s e de referência). B.CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 405-422, jul./dez. 2006.

Oliveira, E. S.; Rosa, C. A.; Morgano, M. A.; Serra, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. World Journal of Microbiology and Biotechnology, London, v. 20, n. 1, p. 19-24, Feb. 2004.

Oliveira, V. A. (2005) Seleção e caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de cachaça de alambique no Estado de Minas Gerais Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). NUPEB. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, Minas Gerais.

Oliveira, V. A.; Vicente, M. A.; Fietto, L. G.; Castro, I. M.; Coutrim, M. X.; Schüller, D; Alves, H. ; Casal, M. Santos, J. O.; Araujo, L. D.; Silva, P. H. A.; Brandão, R. L. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 74, n° 3, p. 693-701, 2008.

Pataro, C.; Santos, A.; Correa, S.R.; Morais, P.B.; Linardi, V.R.; Rosa, C.A. (1998). Physiological characterization of yeasts isolated from artesanal fermentation in an aguardente distillery. Revista de Microbiologia. 29: 104-108.

Pataro C., Guerra J.B., Petrillo-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. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 89: 24-31.

Pataro, C., Guerra, J. B., Petrillo-Peixoto, M. L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V. R., Rosa, C. A. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 88, 1-9.

Pataro, C.; Gomes, F. C. O.; Araújo, R. A. C.; Rosa, C. A.;Schwan, R. F.; Campos, C. R.; Claret, A. S.; Castro, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. Informe Agropecuário: Cachaça Artesanal de Minas, Belo Horizonte, v.23, n.217, p. 37-43, 2002a.

Peddie, H.A.B.; Ester formation in brewery fermentations. Journal of the Institute of Breweing, London, v.96, p.327-331, sept./oct. 1990.

Pereira, N. E.; Cardoso, M. Das G.; Azevedo, S. M.; Morais, A. R. De.; Fernandes, W.; Aguiar, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, MG, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, set./out., 2003.

Perez, M. A., Gallego, F. J., Hidalgo, P. (2001b). Evolution of molecular techiques for the genetc characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters* 205, 375-378.

Perez, M. A., Gallego, F. J., Martinez, I. and Hidalgo, P. (2001a). 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.

Piggott, J. R.; Paterson, A. The contributions of the process to flavour in Scotch malt whisky. In: PIGGOTT, J. R.; PATERSON, A. (Eds.). Distilled beverage flavour: recent developments. New York: VCH, 1989. 352p.

Plengvidhya, V., Breidt, Jr., Fleming, H. P. (2004). Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Intern. Journal of Applied and Environmental Microbiology.*

Powell, C. D., Quain, D. E., Smart, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *Fems Yeast Research* 3, 149-157.

Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M. A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing áreas of Greece. *Journal of Apllied Microbiology*. 89, 236-248.

Pretorius I.S. & Bauer F.F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. Trends Biotechnol. 20: 426-432.

Pretorius I.S. & Hoj P.B. (2005) Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. Austral Grape Wine Res 11: 83-108.

Querol A. & Barrio E. (1990) A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res. 18: 1657.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentation conducted by active dry yeast strains. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2948-2953.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 15, 439-446.

Ravaneli, G. C.; Madaleno, L.L.; Presotti, L.E.; Utton, M.A.; Mutton, M.J.R. Spittlebug infestation in sugarcane ffects ethanolic fermentation. Scientia Agricola, v.63, n.6, p. 543-546, 2006.

Richard, G.F.; Kerrest, A. & Dujon, B. (2008) Comparative genome and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. Microbiol. Molec Biol Rev. 72 (4):686-727.

Richards, K.; Goddard, M. & Gardner, R. (2009) A database of microsatellite genotypes for Saccharomyces cerevisiae. A van Leeuw. 96:355-359.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 86, 169-180.

Sales, A. C. Registro de estabelecimento, equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de aguardente. In: CARDOSO, M. G. das. (Ed.). Produção de aguardente de cana-de-açúcar. Lavras: UFLA, 2001. 264 p., cap. 2, p. 51-112.

Salgado, A. P. C., Schuller, D., Casal, M., Leão, C., Leiper, F. C., Carling, D., Fietto, L. G., Trópia, M., J., Castro, I. M., Brandão, R. L. (2002). Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Letters* 532, 324-332.

Salles, G; Buso, C.; Ciampi, A. Y.; Moretzsohn, M.C. & Amaral, Z. P. S. (2003) Desenvolvimento e aplicação de marcadores microssatélites em Maçaranduba. Circular Técnica Embrapa, 20. 1ª edição, 25 p.

Sanni, A. I., Lonner, C. (1993). Identification of yeast isolated Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* 10, 517-523.

Santiago, A. L. F. A questão ambiental nos alambiques de cachaça paulistas. 2008. Centro Universitário Senac, Santo Amaro, SP, abril 2008.

Schüller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. (2004) Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*.

Schüller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M. (2004a). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*. 231, 19-26.

Schwan, R. F.; Carvalho, F. P.; Dias, D. R.; Castro, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. das. (Ed.). Produção de aguardente de cana. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p., cap. 3, p. 101-135.

Schwan, R. F.; Castro, H. A. de. Fermentação. In: Cardoso, M. G. das. (Ed.). Produção de aguardente de cana-de-açúcar. Lavras: UFLA, 2001. 264 p, Cap. 3, p. 113-127.

Schwan, R. F.; Mendonça, A. T.; Silva jr., J. J.; Rodrigues, V.; Wheals, A. Microbiology and physiology of cachaça fermentations. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

SEBRAE, (2002). Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique de Minas Gerais. P 56.

SEBRAE; SEAMA. Recomendações de controle ambiental para produção de cachaça. Vitória, 2001.

SEBRAE-MG. Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

Segura, L.E.; Kirchmayr, M.R.; Flores, E.P.; Gschaedler, A.C. (2010) PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas e-Gnosis [online] Vol. 8, Art. 2.

Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology, 26, 1135-1145.

Silva, J. A.; Damasceno, B. P. G. L.; Silva, F. L. H.; Madruga, M. S.; Santana, D. P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. Química Nova, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

Silva, C. L. C.; Vianna, C. R.; Cadete, R. M.; Santos, R. O.; Gomes, F. C. O.; Oliveira, E. S.; Rosa, C. A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. *International Journal of Food Microbiology*, Oxford, v. 131, n. 2-3, p. 203-210, 2009.

Silva, P. H.; Santos, J. O.; Araújo, L. D.; Faria, F. C.; Pereira, A. F.; Oliveira, V. A.; Vicente, M. A.; Brandão, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 1, p. 1-7; jan-mar, 2009a.

Silva, S. P.; Análise da produção familiar de cachaça no território Alto Rio Pardo - MG. In: Congresso SOBER (Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural), 48, 2010, Campo Grande. Grupo de Pesquisa: Desenvolvimento Rural, Territorial e regional. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2010.

Silva-Filho, E.A. (2003) Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. [tese]. Recife: Universidade de Federal de Pernambuco.

Silva-Filho, E. A., Brito dos Santos SK, Resende Ado M, de Morais JO, de Morais MA Jr, Ardaillon Simões D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. Antonie van Leeuwenhoek, n. 88, p. 13–23, 2005

Soratto A.N.; Varvakisii G.; Horii, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.27, n.4, out./dez. 2007.

Souza, A. P. G.; Vicente, M. A.; Klein, R. C.; Fietto, L. G.; Coutrim, M. X.; Silva, P. H. A.; Afonso, R. J. F.; Araújo, L. D.; Bouillet, L. E. M.; Castro, I. M.; Brandão, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. Antonie van Leeuwenhoek (2012) 101:379–392.

Souza, A. P. G., (2010). Caracterização bioquímico-molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). NUPEB. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, Minas Gerais.

Valsechi, O. Aguardente de cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ, 1960, 90 p. *apud* DIAS, Sílvia Maria Borim Côdo. O processo da destilação. In: CARDOSO, Maria das Graças (Ed.). Produção de aguardente de cana. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p., cap. 4, p. 132-202.

Vaudano E, Garcia-Moruno E (2008) Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band profile analysis. Food Microbiol 25:56–64.

Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1993). A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 16, 113-119.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Delvaux, F. R., Winderickx, J., Thevelein, J. M., BAUER, F. F., PRETORIOS, I. S. (2001). Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae. J. Am. Sac. Brew. Chem.* 59(2), 69-76.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickc. J., Pretorius I. S., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R., (2003b). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutient-signalling pathways. *FEMS Yeast Research* 1598, 1-12 b.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F. R. (2003c). Yeast flocculation: what brewers should know. *Journal of Applied and Environmental Microbiology. Biotechnol*. 61, 197-205 c.

Vestrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. N. P., Derdelinckx, G., Dufour, J., Pretorius I. S., Winderickc. J., Thevelein, J. M. (2003a). 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(9), 5228-5237 a.

Vianna, C. R.; Silva, C. L. C.; Neves, M. J.; Rosa, C. A. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistence. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 93, n.1-2, p. 205-217, 2008.

Vicente, M.A, Fietto L.G, Castro, I.M, Santos, A.N.G, Coutrim, 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 108:51–59.

Vicente, M.A. (2007). Caracterização Molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação da cachaça de alambique. Tese de Doutoramento do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Techera, A.G., Jubany, S., Carrau, F.M. & Caggero, C., 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 33, 71-75.

Vilela, F. J.; Cardoso, M. G.; Masson, J.; Anjos, J. P. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. Ciência e Agrotecnologia. v.31, n.4, p. 1089-1094, 2007.

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 (Inns, M. A., gelfrand, D. H., Sninsky, J. J., Whith, T. J. Eds) p. 315-322. Academic Press. New York.

Yokota, F. Fabricação de aguardente de cana. Série Fermentações Industriais, nº 2, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Toselts". Campinas, SP, 1995, 92p.

Yoshizawa, K. (1999). Sake: Production and Flavor. *Food. Rev. Int* 15(1), 83-107.