

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LEVEDURA *Dekkera*
bruxellensis VISANDO À ELABORAÇÃO DE CACHAÇAS DIFERENCIADAS**

Denise Castro Silva

Recife, 2013

DENISE CASTRO SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LEVEDURA *Dekkera
bruxellensis* VISANDO À ELABORAÇÃO DE CACHAÇAS DIFERENCIADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Profº Drº Marcos Antonio de Moraes Júnior

Co-orientador: Drº Esteban Espinosa Vidal

Recife, 2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S586a Silva, Denise Castro

Análise do perfil metabólico e organoléptico da levedura *Dkkera bruxellensis* visando à elaboração de cachaças diferenciadas / Denise Castro Silva. – Recife: O Autor, 2013.

64 f. : il.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Coorientador: Esteban Espinosa Vidal

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Bebidas alcoólicas 2. Aguardente 3. Leveduras (Fungos) I. Moraes Júnior, Marcos Antonio de (orientador) II. Vidal, Esteban Espinosa (coorientador) III. Título.**

641.21

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-086

DENISE CASTRO SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data da Aprovação _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^o Dr^o MARCOS ANTONIO DE MORAIS JÚNIOR
Departamento de Genética – UFPE

Prof^a Dr^a MÁRCIA VANUSA DA SILVA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr^o WILL DE BARROS PITA
Departamento de Genética – UFPE

MEMBROS SUPLENTE:

Prof^a Dr^a. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr^a CAROLINA ELSZTEIN
Departamento de Genética – UFPE

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Marcos Morais, por ter me aceitado mesmo sem me conhecer, pelo conhecimento adquirido, pela paciência e por ser amigo.

Ao meu co-orientador Esteban, pelo conhecimento que me passou e pela boa vontade.

Ao Dr. Giuliano Elias, pela oportunidade de desenvolver os experimentos com vinhos na EMPRAPA-SEMIÁRIDO, por ter sido sempre tão gentil e por estar sempre pronto a ajudar.

A minha mãe, pelo amor e apoio incondicional, e por ter me ensinado a viver.

A minha avó, pelo amor e dedicação constante.

À Arthur, por ser amigo, por me amar mesmo nas minhas ausências e por me fazer feliz.

A minha irmã, por ser amiga e companheira.

Aos meus tios, pelo cuidado.

A Rosivânia e Demétrio, pelo carinho e pelo apoio durante esses dois anos.

Ao Pastor Sérgio e Família, por terem me acolhido, pelo carinho e pelos bons exemplos.

Aos meus colegas do Labem, pelo apoio na pesquisa, amizade, pelo conhecimento compartilhado e momentos de descontração.

A Anjélica, Jackeline, Carol e Josy, pelo companheirismo, pela boa convivência, e pela torcida nesta etapa profissional.

A FACEPE pela concessão da bolsa de pós graduação.

RESUMO

A aguardente de cana-de-açúcar, também conhecida como cachaça, é uma bebida genuinamente brasileira que vem ganhando espaço no mercado internacional de bebidas destiladas. Os compostos voláteis são responsáveis pelo sabor característico dessa bebida e são produzidos pelas leveduras durante o processo fermentativo. A relevância da levedura *Dekkera bruxellensis* no contexto fermentativo tem despertado o interesse em analisar a viabilidade de utilização desta levedura para a produção de cachaça. Neste trabalho, foram analisados o perfil metabólico e a produção de compostos aromáticos pela levedura *D. bruxellensis* durante a fermentação no caldo de cana e em diferentes meios sintéticos com diversas fontes de nitrogênio. Os ensaios foram realizados em pequena escala, simulando as condições empregadas na produção de cachaça artesanal. Os resultados mostraram que, a suplementação do meio com aminoácidos ramificados exerce uma forte influência no metabolismo e na produção de aromas da levedura *D. bruxellensis*. Foi também confirmado que essa levedura é capaz de assimilar fontes de nitrogênio alternativas como os aminoácidos ramificados, porém, com rendimentos fermentativos menores aos observados em meios com fontes de nitrogênio preferenciais, como o sulfato de amônio. Sendo assim, esses resultados confirmam a grande influência da fonte de nitrogênio no metabolismo de alcoóis superiores e ésteres, ratificam a relevância de estudar mais a fundo as necessidades de nitrogênio para um melhor controle dos aromas que são formados no processo fermentativo e poderá abrir perspectivas para a utilização industrial desta levedura na elaboração da cachaça.

Palavra-chave: cachaça, fermentação alcoólica, alcoóis superiores, ésteres voláteis, via de Ehrlich, nitrogênio

ABSTRACT

The sugar cane spirit, also known as *cachaça*, is a genuinely Brazilian drink that has increased its market share among international distilled beverages. The volatile compounds are responsible for the characteristic taste of the drink and are produced by the yeast during the fermentation process. The relevance of the yeast *Dekkera bruxellensis* in the fermentation context has stimulated interest in examining the feasibility of using this yeast for the production of *cachaça*. This work, we analyzed the metabolic profile and the production of aromatic compounds by yeast *D. bruxellensis* during fermentation in sugar cane and in different synthetic media with different nitrogen sources. Assays were performed on a small scale, simulating the conditions employed in the production of craft *cachaça*. The results show that supplementation of the medium with branched amino acids have a strong influence on the metabolism and production of flavors on the yeast *D. bruxellensis*. It was also confirmed that this yeast is able to assimilate alternative nitrogen sources such as branched amino acids, but with lower fermentative yields to those observed in the media with preferential nitrogen sources such as ammonium sulfate. As such, these results confirm the strong influence of the nitrogen source in the metabolism of higher alcohols and esters, they confirm the relevance of studying further the nitrogen needs for better control of scents which are formed in the fermentation process and may open prospects for industrial use of this particular yeast in the preparation of *cachaça*.

Key words: *cachaça*, alcoholic fermentation, higher alcohols, volatile esters, Ehrlich pathway, nitrogen.

Lista de figuras

Revisão bibliográfica	Página
Figura 1. Linhagens da espécie <i>Dekkera bruxellensis</i> . (A) linhagem CBS 74; (B) linhagem CBS 2499; (C) linhagem GDB 248 (industrial) em meio YPD (Microscopia de contraste de fase) Retirado de (Leite, 2012).	19
Figura 2. Catabolismo dos aminoácidos. Via de Ehrlich (Adaptado de Hazelwood <i>et al.</i> ,2008).	25
Figura 3. Síntese de leucina e valina em <i>S. cerevisiae</i> (modificado de www.biocyc.org)	26
Artigo	
Figura 1. Variação da biomassa de <i>Dekkera bruxellensis</i> durante os experimentos de fermentação em meio natural de caldo de cana (SCJ), no meio completo (YPS) e nos meios minerais com suplemento de sulfato de amônio (MMS) e com suplemento de aminoácidos ramificados (MMS+AA). Os valores representam as médias de dois ensaios biológicos, com replicatas técnicas para cada ponto	47
Figura 2. Perfil fermentativo da linhagem industrial GDB 248 de <i>D. bruxellensis</i> nos meios SCJ, YPS, MMS e MMS + AA. O perfil metabólico de consumo de sacarose (painel A), produção de etanol (painel B), acetato (painel C) e glicerol (painel D) são apresentados.	49
Figura 3. Cinética de produção de acetato de etila (painel A), propanol (painel B), isobutanol (painel C) e da soma de álcool amílico e isoamílico - fração AI (Painel D) pela linhagem GDB 248 durante a fermentação dos meios SCJ, YPS, MMS e MMS+AA	51

Lista de tabelas

Revisão bibliográfica

Página

Tabela 1. Composição típica da cachaça segundo o novo Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça. **15**

Artigo

Tabela 1. Viabilidade, composição dos meios de cultura e parâmetros fermentativos em ensaios utilizando a linhagem GDB 248. (N = nitrogênio, FAN = *free amino nitrogen*) **46**

Tabela 2. Concentração final e produtividade máxima (P_{max}) dos compostos voláteis produzidos por *Dekkera bruxellensis* durante a fermentação de meio natural SCJ, do meio completo YPS e nos meios minerais MMS e MMS+AA. **50**

Lista de abreviações

AATFase	Álcool acetiltransferase
Aprox.	Aproximadamente
AI	Fração de álcool amílico e isoamílico
CO ₂	Dioxido de carbono
cel.	Células
EUA	Estados Unidos da América
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
L	Litro
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogenionico
N	Nitrogênio
w/v	Massa/ volume
v/v	Volume/ volume
°Bx	Graus °Brix
r.p.m	Rotações por minuto
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1. IMPORTÂNCIA DA CACHAÇA NO BRASIL	14
1.2. LEGISLAÇÃO DA CACHAÇA	14
1.3. ELABORAÇÃO DA CACHAÇA	15
1.4. AS LEVEDURAS DO PROCESSO FERMENTATIVO	17
1.5. <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> : ASPECTOS GERAIS	19
1.5.1. <i>Fisiologia de Dekkera bruxellensis</i>	20
1.6. SUBSTÂNCIAS ORGANOLÉPTICAS	21
1.6.1 <i>Álcoois superiores</i>	23
1.6.2. <i>Via de Ehrlich</i>	24
1.6.3. <i>Relação entre anabolismo e catabolismos dos aminoácidos ramificados</i>	25
1.6.4. <i>Ésteres</i>	26
1.6.4.1. <i>Ésteres de acetato</i>	26
1.6.4.2. <i>Ésteres de ácido graxo</i>	27
1.7 METABOLISMO DO NITROGÊNIO	27
1.7.1. <i>Aspectos gerais</i>	27
1.7.2. <i>Assimilação da fonte de nitrogênio</i>	28
1.7.3. <i>Influência do nitrogênio na formação dos compostos organolépticos</i>	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
2. CAPÍTULO II: MANUSCRITO	38
ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> COM VISTAS À ELABORAÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS DIFERENCIADAS	38
CONCLUSÃO	59
ANEXOS COMPLEMENTARES	60

INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida destilada genuinamente brasileira que nos últimos anos vem posicionando-se no mercado internacional pelo seu aroma e *bouquet* especial, esta aguardente é produzida a partir da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar. Durante o processo de fermentação alcoólica, além de serem produzidos majoritariamente etanol e dióxido de carbono, são elaborados outros compostos derivados do metabolismo secundário que são os principais responsáveis pelo sabor particular e característico desta bebida. Entre esses, os alcoóis superiores e os ésteres voláteis representam o maior grupo e o mais importante. Estes são responsáveis pelo sabor e aroma floral e frutado altamente desejados nas bebidas alcoólicas. A quantidade desses compostos no mosto fermentado e por consequência no destilado depende de múltiplos fatores, dos quais se destacam as condições de fermentação, a natureza da fonte de nitrogênio e a cepa de levedura empregada.

Muitas leveduras têm sido testadas para a produção de bebidas fermentadas pela capacidade de produção de etanol e de substâncias aromáticas. A espécie *Dekkera bruxellensis* é utilizada na produção de cervejas Belgas do tipo Lambic, embora sua principal reputação seja a de contaminar destilarias de álcool combustível e vinícolas em todo o mundo, estando associada à queda do rendimento em etanol e a mudanças no aroma e sabor dos vinhos. Entretanto, nos últimos anos esse conceito tem mudado, pois trabalhos recentes mostram que isolados industriais dessa levedura apresentam rendimentos finais de fermentação comparáveis aos de *Saccharomyces cerevisiae*, que é a levedura normalmente usada em processos fermentativos, embora a produtividade ainda seja menor.

Considerando a importância da cepa de levedura na produção de cachaça e a relevância da levedura *D. bruxellensis* no contexto fermentativo, tem se despertado o interesse em analisar a viabilidade de utilização desta levedura como fermento para a produção de uma cachaça com qualidades sensoriais diferenciadas. Sendo assim, neste trabalho foi determinado o perfil metabólico e a produção de compostos sensoriais pela levedura *D. bruxellensis* GDB 248 em ensaios fermentativos simulando condições industriais, utilizando o caldo de cana e meios sintéticos com altas concentrações de nitrogênio na forma de sulfato de amônio ou de aminoácidos ramificados. A influência destes parâmetros na produção de compostos importantes para o aroma e sabor das bebidas alcoólicas foi avaliada. Desta forma, o presente estudo gerou dados sobre o comportamento fisiológico da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 em função das diferentes fontes de nitrogênio,

bem como poderá abrir perspectivas para a utilização industrial desta levedura na elaboração da cachaça.

1. CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Importância da cachaça no Brasil

A aguardente de cana de açúcar conhecida como “cachaça” é a bebida destilada tradicional brasileira. Esta bebida espirituosa é a mais consumida no Brasil e nos últimos anos vem posicionando-se no mercado internacional pelo seu aroma e *bouquet* especial. A cachaça está intimamente ligada à história e cultura do Brasil, presente na música, na culinária, e nas festas populares, entre outros. O setor produtivo da cachaça desempenha importante papel na economia nacional. O Brasil possui uma capacidade instalada de produção de 1,2 bilhão de litros por ano, com cerca de 40.000 produtores, entretanto apenas 15% são registrados (IBRAC). O setor ainda enfrenta muitas dificuldades, tais como, o alto índice de informalidade, falta de higiene e segurança alimentar durante o processo de produção, falta de divulgação do produto, baixa competitividade das cachaças de alambiques e a falta de suporte efetivo das instituições governamentais. Em Abril de 2012 os EUA reconheceram a cachaça como um produto exclusivo e genuinamente brasileiro, esse reconhecimento permitiu às empresas brasileiras venderem o destilado nos Estados Unidos apenas com o nome de cachaça, ficando proibido o uso da denominação cachaça por empresas de outros países.

1.2. Legislação da cachaça

De acordo com a Legislação Brasileira, cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*), com teor alcoólico de 38 a 48% (v/v) em volume, a 20 °C (BRASIL,1997 e 2005). A Tabela 1 dispõe sobre os padrões de identidade e qualidade da aguardente de cana e cachaça mencionando especificamente os seguintes itens: grau alcoólico e teores de açúcares totais, acidez volátil em ácido acético, alcoóis superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico), furfural somado a hidroximetilfurfural, aldeídos em acetaldeído e ésteres totais em acetato de etila (BRASIL,1997).

Após a destilação, a cachaça está pronta para o consumo, mas pode ser envelhecida em tonéis de madeira como parte importante do processo de sua fabricação para a melhora do sabor,

como ocorre com outras bebidas fermento-destiladas, tais como uísque e rum. De acordo com Piggott e colaboradores (1989) o envelhecimento de bebidas consiste em armazená-las adequadamente em barris de madeira por um tempo determinado, ação que produz mudanças na composição química, no aroma, no sabor e na cor da bebida e, portanto, na qualidade sensorial. Esta etapa, no entanto, é opcional de acordo com a Legislação Brasileira. A aguardente de cana será denominada envelhecida, quando contiver pelo menos 50% de aguardente de cana envelhecida em tonéis de madeira, por pelo menos um ano, podendo ser adicionado caramelo para padronização da cor (BRASIL, 1997). As normas exigem controle sobre contaminantes como carbamato de etila, acroleína, álcool sec-butílico, álcool n-butílico, chumbo, arsênio, cobre e metanol (BRASIL, 2005).

Tabela 1: Composição típica da cachaça segundo o novo Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça.

Composto	Limite Máximo
Teor alcoólico	38 a 48 % etanol v/v
Ésteres em acetato de etila	200 mg/100mL de álcool anidro
Acidez volátil em ácido acético	150 mg/100mL de álcool anidro
Aldeídos em aldeído acético	30 mg/100mL de álcool anidro
Furfural e Hidroximetilfurfural	5 mg/100mL de álcool anidro
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1- butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol)	360mg/100mL de álcool anidro

Fonte: BRASIL, 2005

1.3. Elaboração da cachaça

Como mencionado anteriormente, a cachaça é obtida através da destilação do mosto fermentado do caldo de cana (Pataro *et al.*, 2001). Durante a fermentação alcoólica além de produzir-se majoritariamente etanol e dióxido de carbono, são elaborados outros metabolitos derivados do metabolismo secundário que, junto com os compostos provenientes do processo de envelhecimento (se este acontecer) são os principais responsáveis pelos sabores particulares e característicos desta bebida. O início do processo de produção da cachaça ocorre com o plantio, colheita e moagem da cana. O caldo de cana-de-açúcar é filtrado e clarificado por decantação, retirando parte das impurezas em suspensão, seguida pela fermentação do caldo resultante da moagem. A concentração de açúcar varia de 120-140g/L, principalmente sob a forma de sacarose, e

o teor de nitrogênio na forma de amônio livre assimilável varia em torno de 100 mg/L (O'connor-Cox e Ingledeew, 1989; Espinosa Vidal *et al.*, 2012). Essas concentrações dependem diretamente da variedade da cana empregada e das condições agrônômicas de cultivo.

A produção em pequena escala ou tradicional é feita por produtores rurais em alambiques de cobre, gerando um produto diferenciado quando comparado a produção em larga escala, que é feita utilizando colunas contínuas de aço inoxidável (Oliveira *et al.*, 2004). Um ciclo curto de fermentação artesanal dura de 18-30 h, com altos teores diários de álcool, presença de uma alta concentração de leveduras (10^9 células/mL, aprox.10-12% cel. w/v), alta pressão de dióxido de carbono, temperatura elevada (entre 30 e 33 °C) e ausência de agitação do meio (Guerra *et al.*, 2001; Espinosa Vidal *et al.*, 2012). A maioria das destilarias tradicionais produz esta alta biomassa por meio da fermentação espontânea, entanto uma minoria usa a incorporação de leveduras industrial. O fermento caipira, espontâneo ou natural é preparado por vários métodos, incluindo o desenvolvimento da microbiota no caldo de cana puro, ou com uma mistura de milho moído, cru ou tostado, pó de arroz e frutas cítricas para diminuir o pH. Depois de um período de tempo que varia de 5 a 20 dias a microbiota, majoritariamente leveduras, porém com a presença de bactérias e fungos filamentosos, atinge níveis suficientemente altos para permitir o começo do ciclo de fermentação, o qual consiste em adição diária de caldo de cana até a conclusão do volume da cuba (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 2001). A população de levedura presente nessa fermentação está em constante mudança, devido à introdução de novas cepas vindas do caldo de cana, levando em consideração que o processo não é estéril (Pataro *et al.*, 1998).

Na produção industrial ocorre à adição de uma linhagem selecionada de *S. cerevisiae*, isso contribui para acelerar o processo e garantir a qualidade da bebida produzida (Bernardi *et al.*, 2008). Adicionam-se também vitaminas, substâncias nitrogenadas à base de fósforo e sais minerais para favorecer o crescimento e a atividade da levedura; bactericidas e antibióticos para minimizar a proliferação de bactérias contaminantes; substâncias antiespumantes para evitar a formação de espumas e ácidos para ajuste do pH entre 4,5 e 5,0 (Pinheiro *et al.*, 2011).

Após o término da fermentação do caldo, o chamado mosto ou vinho é transferido para alambiques de cobre onde é destilado. Durante a destilação ocorre a separação das substâncias voláteis, assim como algumas reações químicas dentro dos destiladores (Boza e Horii, 1998). O destilado finalmente é diluído com água até a concentração de etanol atingir 38 a 40% (v/v), em seguida segue-se para o engarrafamento ou para maturação em barris de carvalho por tempo indeterminado. Como resultado, o perfil organoléptico da cachaça vai depender da qualidade da matéria-prima, do processo de fermentação empregado e do tipo de envelhecimento selecionado. O

tipo de alambique e a técnica de destilação também afetam o sabor dos destilados. Por exemplo, o cobre age de forma a reduzir o teor de compostos sulfurados voláteis no destilado, e, portanto, o desagradável odor típico de sulfeto, produzido principalmente pela presença de dimetilsulfeto (Oliveira *et al.*, 2004). Entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas, visto que, a maioria dos compostos aromáticos é formada durante a fermentação (Suomalainen e Lehtonen, 1979).

1.4. As leveduras do processo fermentativo

As leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, heterótrofos, caracteristicamente esféricos, ovais ou cilíndricos, com fase somática ou vegetativa, reproduzem-se assexuadamente por processo denominado brotamento multilateral ou fissão e sexuadamente por produção de esporos e conjugação envolvendo mitose e meiose. Na classificação taxonômica, as leveduras podem ser divididas em dois filos Ascomycota e Basidiomycota (Alexopoulos, 1996). São microrganismos tradicionalmente envolvidos em processos fermentativos que trazem como consequência a modificação, o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados.

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Nas fermentações espontâneas, um grande número de espécies pode estar envolvido, com predominância de *S. cerevisiae* (Pataro *et al.*, 2001). O uso de linhagens selecionadas favorece o início mais rápido do processo e os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea podem ser evitados, favorecendo uma menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento e qualidade do produto resultante (Dorneles *et al.*, 2005). As culturas iniciadoras conseguem dominar o processo porque são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota autóctone.

A condição natural das dornas de fermentação é estressante para as leveduras presente no processo, isso pode contribuir para uma forte pressão seletiva sobre as cepas a serem utilizadas na fermentação. Diferentes linhagens de *S. cerevisiae* têm sido detectadas nas cubas de fermentação durante todos os ciclos, como resultado, esta diversidade pode ocasionar variações nas propriedades sensoriais da cachaça (Guerra *et al.*, 2001; Pataro *et al.*, 2001; Vila Nova *et al.*, 2009). Embora bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* apresentem baixa tolerância ao etanol e, ao longo do processo sejam substituídas por linhagens de *S. cerevisiae*, elas desempenham um papel importante nas características sensoriais das bebidas por produzirem compostos que contribuem com a complexidade aromática. Estas características permanecerão no produto final, mesmo após a

remoção do micro-organismo (Ciani e Ferraro, 1999; Bernardi *et al.*, 2008). Entretanto, vale ressaltar que em vários processos essas leveduras não-*Saccharomyces* podem permanecer em alta densidade celular até o final do processo fermentativo, contribuindo de forma direta para a qualidade do produto destilado (Vila Nova *et al.*, 2009).

Para garantir a sobrevivência nas dornas de fermentação e ter potencial para dominar o processo, as cepas selvagens devem ter a habilidade de crescer em altas temperaturas, em altos níveis de concentração de etanol, deve ter osmotolerância, altos níveis de atividade invertase, acúmulo de trealose, e deve produzir baixos níveis de acidez (Pataro *et al.*, 2002). Parâmetros fermentativos como, alto rendimento em etanol, elevada velocidade específica de crescimento e alta produtividade também são características essenciais para um bom desempenho da levedura no processo fermentativo (Oliveira *et al.*, 2004).

Em estudo feito através da comparação do uso de duas linhagens de *S. cerevisiae*, uma comercial e outra indígena, como fermento em uma destilaria de cachaça. Observou-se que as duas linhagens predominaram nas dornas de fermentação por aproximadamente 30 dias e foram promissoras para serem utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo para a produção de cachaça. Leveduras não *Saccharomyces* foram isoladas do processo tais como: *Candida*, *Pichia*, *Kloeckerae*, *Schizosaccharomyces*, além de linhagens *S. cerevisiae* provenientes do substrato, mas todas foram isoladas em menor proporção (Gomes *et al.*, 2009). Além disso, vários estudos tem avaliado a influência de cepas de levedura na formação de compostos aromáticos em diferentes bebidas alcoólicas como vinho, cerveja, uísque e conhaque (Longo *et al.*, 1992; Lurton *et al.*, 1995; Romano *et al.*, 2003). Em trabalho realizado por Vila Nova e colaboradores (2009) foi identificado a produção de metabólitos secundários por diversas leveduras isoladas do processo fermentativo de alambiques artesanais.

A falta de controle microbiológico durante a fermentação pode levar ao aumento na biodiversidade e por consequência produzir variações organolépticas nas bebidas. Essas leveduras podem ser provenientes do mosto de alimentação ou podem ser ainda residentes do processo, localizando-se na tubulação, nos trocadores de calor e na água de lavagem da cana e de diluição do mosto (Silva-Filho, 2003). Episódios de contaminação ao longo da safra podem fazer com que outras espécies de leveduras substituam o inóculo inicial, com especial atenção para levedura *Dekkera bruxellensis* que foi identificada como a principal contaminante nos processos fermentativos de produção de álcool combustível e vinho em todo mundo (Abbott *et al.*, 2005; De Souza Liberal *et al.*, 2007).

1.5. *Dekkera bruxellensis*: aspectos gerais

A levedura da espécie *D. Bruxellensis*, anamorfo *Brettanomyces bruxellensis*, é o objeto do presente estudo e pertence a Família *Saccharomycetacea* (Barnett *et al.*, 1983). O gênero *Brettanomyces* é conhecido desde 1904. Esta levedura foi isolada no final da fermentação de uma cerveja inglesa e sua participação no processo estava relacionada a características aromáticas (Claussen, 1904). Entretanto, a descrição morfológica e fisiológica só foi realizada em 1940 com a identificação da produção de ácido acético como principal metabólito durante o crescimento celular aeróbio e ausência de ascósporos. Mais adiante, em 1964 o gênero *Dekkera* foi introduzido quando a formação de esporos foi observada em isolados de *Brettanomyces* (Van Der Walt, 1964). A morfologia das células da levedura *D. bruxellensis* (Figura 1) é bastante diversificada, apresentando-se principalmente na forma elíptica (Van Der Walt, 1964).

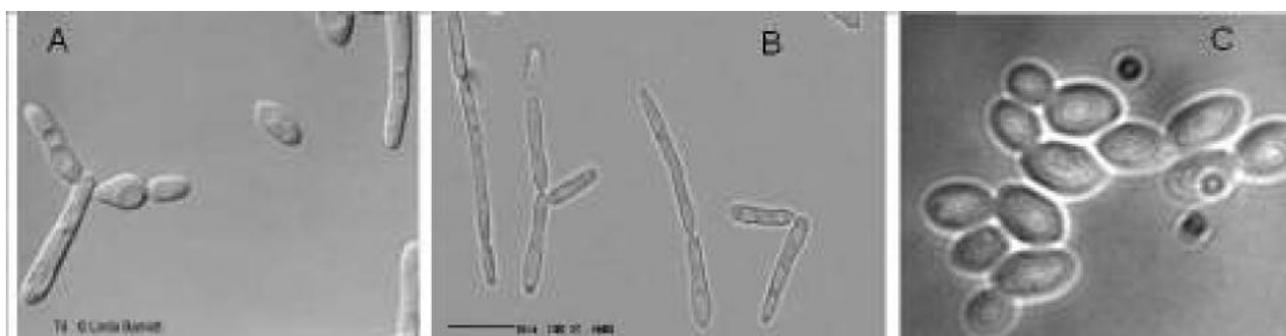


Figura 1. Linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. (A) linhagem CBS 74; (B) linhagem CBS 2499; (C) linhagem GDB 248 (industrial) em meio YPD (Microscopia de contraste de fase). Retirado de Leite (2012).

A espécie *D. bruxellensis* é utilizada na produção de cervejas Belgas do tipo Lambic (Martens *et al.*, 1997), embora sua principal reputação é a de contaminar destilarias de álcool combustível no Nordeste brasileiro (De Souza Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008) nos EUA e Canadá (Abbott *et al.*, 2005) e na indústria de vinho na Europa (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Esses trabalhos relatam a associação desta levedura à queda do rendimento em etanol e a mudanças no aroma e sabor dos vinhos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; De Souza Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008).

Nos vinhos, esse micro-organismo converte ácidos hidroxicinâmicos em compostos fenólicos voláteis, que em determinadas concentrações ocasionam o aparecimento de “*off-flavours*”,

ou seja, substâncias que conferem odores e sabores indesejáveis às bebidas. Entretanto a contaminação nos vinhos geralmente não acontece durante a fermentação, sendo esta levedura frequentemente encontrada durante a conservação nos barris ou após envase, em média de 6 a 10 meses após o armazenamento (Cocolin *et al.*, 2004).

Recentemente foi mostrado que o genoma desta levedura possui dois genes que codificam para a enzima responsável pela produção do fenil-acetaldeído (De Souza Liberal *et al.*, 2012), uma substância que confere o aroma floral aos vinhos (Verstrepen *et al.*, 2003). A presença de dois parálogos para este gene chamado de *ARO10* no genoma de *D. bruxellensis* parece ser uma característica única dentre os ascomicetos, pelo menos daqueles cujo genoma já fora sequenciado (De Souza Liberal *et al.*, 2012). Isto mostra o potencial que esta levedura pode ter na produção de substâncias capazes de conferir sabores desejáveis às bebidas.

1.5.1. Fisiologia de *Dekkera bruxellensis*

A linhagem GDB 248 (figura 1C), isolada de destilaria de álcool combustível na região Nordeste do Brasil (De Souza Liberal *et al.*, 2007), tem se destacado por sua alta adaptabilidade ao processo industrial quando comparada a *S. cerevisiae*. Esse destaque pode estar relacionado com a maior tolerância a pH baixo e a elevada resistência a etanol descritas para a espécie (Rozpedowska *et al.*, 2011). Com isso, episódios de contaminação do processo industrial têm sido relatados, nos quais, a população de *D. bruxellensis* chega a substituir a de *S. cerevisiae*, o que correlaciona com diminuição no rendimento em etanol, gerando significativos prejuízos econômicos (De Souza Liberal *et al.*, 2007). Essa capacidade de substituir a população inicial de *S. cerevisiae* faz da *D. bruxellensis* um contaminante significativo em destilarias que fermentam o caldo da cana. Apesar de ser considerada contaminante, já existem trabalhos mostrando que esta levedura é capaz de produzir etanol em rendimentos muito próximos àqueles apresentados por *S. cerevisiae* (Passoth *et al.*, 2007; Blomqvist *et al.*, 2010). Sendo o maior problema desta levedura a menor produtividade causada pela lenta assimilação dos açúcares do mosto (De Souza Liberal *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). O rendimento em etanol e produtividade, bem como o crescimento dessas células são influenciados pela variação de temperatura, pH e fonte de carbono (Blomqvist *et al.*, 2010).

As espécies *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* compartilham algumas semelhanças fisiológicas, tais como: tolerância a etanol, capacidade de crescer em anaerobiose, capacidade de fermentar mesmo na presença de oxigênio desde que, no meio tenha elevada concentração de glicose (efeito

Crabtree positivo) e capacidade de sobreviver sem DNA mitocondrial (efeito *petite* positivo) (Woolfit *et al.*, 2007). *D. bruxellensis* é capaz de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono que incluem os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e os dissacarídeos maltose, celobiose, trealose e sacarose (Blomqvist *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2012). Entre as fontes de nitrogênio, esta levedura é capaz de assimilar amônia, glutamato, glutamina, prolina, arginina e nitrato (Conterno *et al.*, 2006; De Barros Pita *et al.*, 2013). O fato de *D. Bruxellensis* ter a capacidade de assimilar nitrogênio na forma de nitrato pode conferir uma vantagem adaptativa ao processo de fermentação industrial quando comparada a *S. cerevisiae* (De Barros Pita *et al.*, 2011).

Embora sob condições limitantes de oxigênio se verifica a produção de glicerol pelas células de *D. bruxellensis* a fim de re-oxidar NADH gerado durante os processos oxidativos (Van Dijken e Scheffers, 1986). Dados recentes mostram que esta produção é limitada quando comparado a *S. cerevisiae* (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003; De Souza Liberal *et al.*, 2007; Blomqvist *et al.*, 2010). Esta incapacidade levaria ao chamado efeito Custer, isto é, a inibição temporária de fermentação quando o oxigênio do meio se torna limitante (Wijsman *et al.*, 1984). Este é sem dúvida o fator limitante mais importante na utilização de *D. bruxellensis* em processos fermentativos industriais. Com essa baixa capacidade de produção de glicerol, o acetato se torna o principal metabólito produzido durante o crescimento aeróbio, sendo produzido a partir de diferentes fontes de carbono como glicose ou etanol (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003; Freer *et al.*, 2003; Blomqvist *et al.*, 2010), é influenciado pela concentração de oxigênio no meio (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003), pela temperatura (Castro Martinez *et al.*, 2005) e pH (Freer *et al.*, 2003).

Apesar de diversos estudos abordarem diferentes aspectos da fisiologia de *D. bruxellensis* nos últimos anos, a produção de compostos organolépticos de interesse industrial por esta levedura ainda permanece desconhecido.

1.6. Substâncias organolépticas

Uma multiplicidade de compostos contribui para o sabor das bebidas alcoólicas. O etanol e dióxido de carbono são os produtos majoritários da fermentação, no entanto, o caráter essencial das bebidas é determinado pela a variedade de metabólitos secundários que são produzidos pelas leveduras durante a fermentação (Boulton e Quain, 2001). Os principais compostos secundários que influenciam o aroma e sabor das bebidas fermentadas são: os ácidos orgânicos, os compostos carbonílicos, os alcoóis superiores e os ésteres voláteis. Dentre estes, os alcoóis superiores e os ésteres voláteis representam o maior grupo e mais importante, já que são responsáveis pelo aroma

floral e frutado altamente desejados nas bebidas alcoólicas (Verstrepen *et al.*, 2003), assim como o glicerol (Vila Nova *et al.* 2009). A quantidade desses compostos depende de muitos fatores, mas principalmente das condições de fermentação, a natureza da fonte de nitrogênio e da cepa de levedura utilizada (Pisarnitskii, 2001; Carrau *et al.*, 2008). Alguns desses compostos contribuem positivamente para a qualidade final do produto, enquanto outros dão notas indesejáveis: “*off-flavours*”.

Existe uma grande variedade de ácidos orgânicos, muitos dos quais são derivados do mosto e outros são produzidos pelas leveduras durante a fermentação, que em geral conferem sabores amargos ao produto. Entre os ácidos orgânicos estão o piruvato, citrato, malato, acetato, oxoglutarato e succinato. A maioria dos ácidos orgânicos é derivada do piruvato ou a partir do ciclo do ácido tricarboxílico (Boulton e Quain, 2001). O ácido acético é o ácido orgânico predominantemente excretado no meio, apesar da sua proporção variar nas diferentes bebidas, na maioria dos casos corresponde de 60 a 95% da acidez total da bebida (Nykänen e Suomalainen, 1983).

Dentre os compostos carbonílicos, os aldeídos são os mais importantes componentes do aroma, pois, mesmo em baixas concentrações, interferem nas características sensoriais da bebida e podem ter origem pela ação das leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação (Piggott *et al.*, 1989). Os aldeídos que são formados dentro das células das leveduras e excretados para o meio, podem ser reabsorvidos e reduzidos ao álcool correspondente, durante os últimos estágios da fermentação (Lea e Piggott, 2003). O acetaldeído é o maior componente, geralmente constituindo 90% do conteúdo total de aldeídos em vinhos e bebidas destiladas sendo originado a partir da descarboxilação do piruvato durante a fermentação alcoólica (Longo *et al.*, 1992; Romano *et al.*, 2008). Este é um composto muito importante devido aos seus efeitos negativos em relação ao consumo das bebidas fermentadas, já que está associado a problemas clínicos tais como enxaquecas, ressacas e até problemas neurológicos (Vila Nova *et al.*, 2009). A produção deste composto depende da composição da população de leveduras no processo (Vila Nova *et al.*, 2009). O furfural é também um aldeído importante, produzido pela reação química entre compostos aromáticos e a glicose, influenciando de forma negativa o aroma e o paladar da cachaça, sendo assim, deve ser evitado (Pinheiro, 1999).

O glicerol é um composto produzido em decorrência do crescimento celular e tem importância na composição do “bouquet” e textura das bebidas destiladas, devido a sua viscosidade. Este é produzido pelas células das leveduras como subproduto do crescimento celular e da produção

dos aminoácidos, atuando como via de regeneração do NAD^+ a partir de NADH na manutenção do balanço redox intracelular (Berovic e Herga, 2007).

1.6.1 Alcoóis superiores

São compostos secundários produzidos pelas leveduras durante o metabolismo fermentativo, sendo formados por alcoóis de cadeia simples ou ramificadas, com número de carbono maior que dois e peso molecular e ponto de ebulição superior ao do etanol (Bidan, 1975). Esses compostos, também conhecidos como álcool fúsel, são muito importantes para a qualidade das bebidas fermentadas. O nome “fusel” é derivado da palavra alemã *fusel* (licor ruim), o que corresponde às frações finais pesadas do processo de destilação. Portanto, um produto enriquecido com estes compostos pesados apresenta gosto ruim. Embora altas concentrações de álcool fúsel transmitam sabores indesejados “*off-flavours*”, baixas concentrações contribuem essencialmente para os sabores e aromas das bebidas fermentadas (Hazelwood *et al.*, 2008). Os alcoóis superiores são compostos por alcoóis alifáticos e aromáticos (Nykänen e Nykänen, 1977). Os alcoóis alifáticos incluem propanol, isobutanol, álcool amílico ativo, álcool isoamílico, enquanto o 2-feniletanol é considerado o álcool aromático mais importante no aroma das bebidas. O álcool isoamílico, álcool amílico ativo e o isobutanol são conhecidos como alcoóis de cadeia ramificada porque eles são produtos da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina (Lambrechts e Pretorius, 2000). Esses alcoóis contribuem para intensificar o sabor alcoólico das bebidas e conferir uma característica cálida as mesmas (Boulton e Quain, 2008). Também são conhecidos pelo seu aroma forte e pungente, sendo responsáveis pelas notas florais e frutadas que são esperadas nas bebidas alcoólicas (Torrea *et al.*, 2003) Como exemplos: o álcool isoamílico (notas de banana), o álcool feniletílico (notas de rosas e jasmim), o álcool benzílico (notas de amêndoas e nozes).

A produção desses compostos se dá durante toda a fermentação alcoólica e compõem o maior grupo de compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas. Os níveis de alcoóis superiores formados durante a fermentação dependem da temperatura de fermentação, da cepa de levedura empregada, dos nutrientes nitrogenados e das condições de aeração (Ough e Bell, 1980; Vila Nova *et al.*, 2009). Os alcoóis superiores podem ser formados a partir do metabolismo dos carboidratos através do piruvato ou através do catabolismo dos aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada pela chamada via de Ehrlich (Figura 2; Hazelwood *et al.*, 2008).

Esta última é a mais utilizada pelas leveduras para obter nitrogênio a partir dos aminoácidos ramificados, e será discutida adiante, embora seja mais usada somente quando fontes de nitrogênio preferenciais estão em baixas concentrações. Assim, quando o amônio é usado como fonte de nitrogênio, os alcoóis superiores são formados a partir do esqueleto carbonado proveniente do catabolismo do piruvato (Derrick e Large, 1993; Espinosa Vidal, 2008). Depois de produzidos, esses compostos são excretados para o meio, já que não podem ser utilizados como fonte de carbono auxiliar no metabolismo principal (Espinosa Vidal, 2008).

1.6.2. Via de Ehrlich

O atual interesse científico pela via Ehrlich é suportada pelo aumento da demanda de identificação de compostos aromáticos, bem como pela necessidade de controlar aromas produzidos pelas leveduras em alimentos fermentados (Hazelwood *et al.*, 2008). Em 1907, Ehrlich demonstrou que vários alcoóis superiores procediam da degradação metabólica dos aminoácidos, mediante um mecanismo que engloba reações subseqüentes de transaminação, descarboxilação e redução. Nessa via (Figura 2), os aminoácidos são primeiramente transaminados a α -cetoácido, em seguida são descarboxilados a aldeídos e finalmente reduzido para o correspondente álcool (Hazelwood *et al.*, 2008; Espinosa Vidal *et al.*, 2012).

Após a reação de transaminação inicial, o α -ceto ácido resultante não pode ser redirecionado para o metabolismo central do carbono e é pouco excretado para o meio de crescimento. Portanto, estes compostos são convertidos aos aldeídos correspondentes pela ação de descarboxilases, e estes são posteriormente reduzidos aos álcoois superiores pelas desidrogenases (Hazelwood *et al.*, 2008). Alternativamente, os α -ceto aldeídos são oxidados aos α -cetoácidos quando as células estão sob regime oxidativo, crescendo em altas concentrações de oxigênio dissolvido no meio (Hazelwood *et al.*, 2008). Os aminoácidos que podem ser convertidos por meio da via de Ehrlich são quase inteiramente convertidos em álcool fúsel, tendo a formação do ácido fusel um papel menor no metabolismo celular (Dickinson *et al.*, 2003). O mecanismo de exportação do álcool fúsel da célula para o meio de cultura ainda é desconhecido. Por outro lado, a exportação do ácido fúsel ocorre através de um transportador de membrana (Hazelwood *et al.*, 2008).

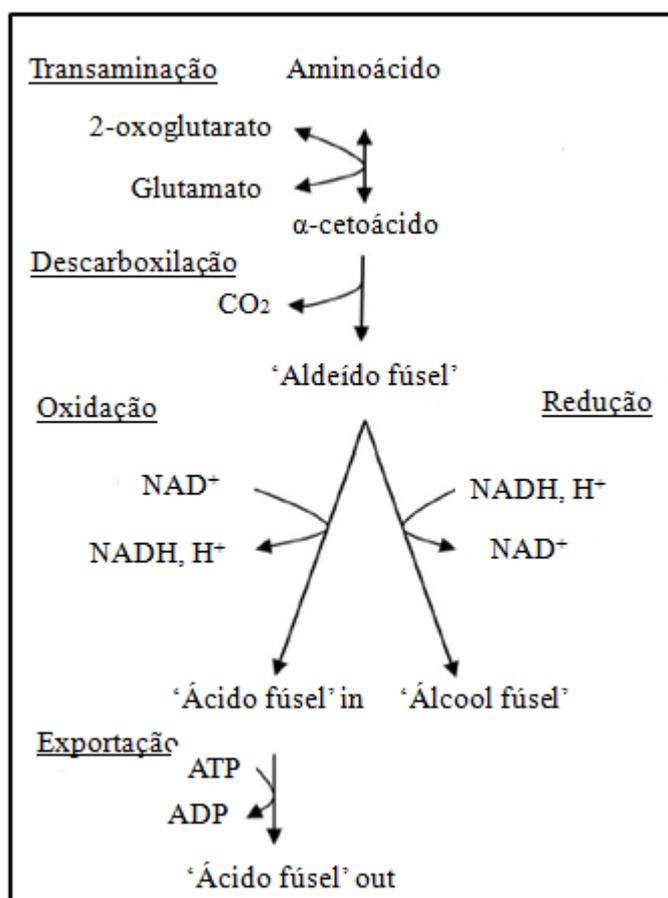


Figura 2. Catabolismo dos aminoácidos. Via de Ehrlich. Adaptado de (Hazelwood *et al.*, 2008).

1.6.3. Relação entre anabolismo e catabolismos dos aminoácidos ramificados

O aminoácido leucina é formado a partir do piruvato em vários passos biossintéticos. No intermediário α -cetoisovalerato ocorre a integração das vias de biossíntese de valina e leucina (Figura 3). Este intermediário pode ser convertido em α -isopropilmalato pela enzima α -isopropilmalato sintáse e em seguida sofrer uma série de reações para produzir leucina e o seu respectivo álcool superior: 3-metil-butanol. O outro composto produzido através do α -cetoisovalerato é a valina, o que acontece quando o intermediário é aminado (Espinosa Vidal, 2008).

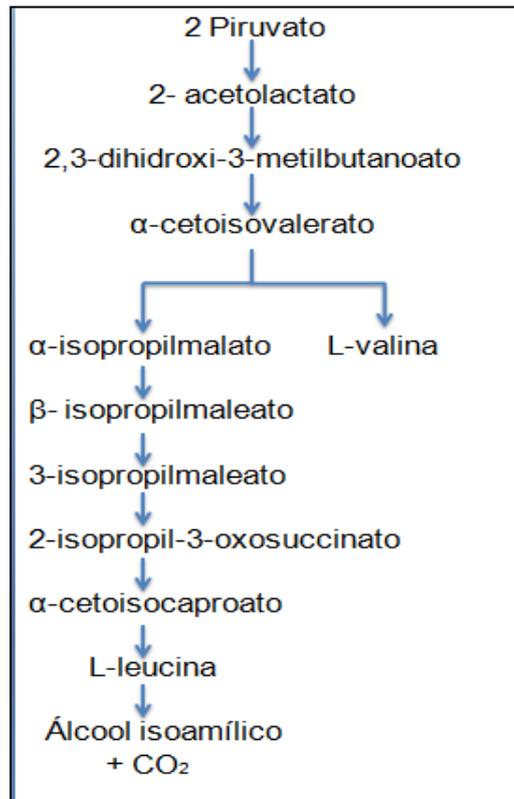


Figura 3. Síntese de leucina e valina em *S. cerevisiae* (modificado de www.biocyc.org)

1.6.4. Ésteres

Os ésteres voláteis são responsáveis pelo caráter frutado de bebidas fermentadas (Verstrepen *et al.*, 2003). São formados em reações de esterificação entre um álcool e um ácido carboxílico durante o processo de oxidação e apresentam aroma agradável e suave. Dois grupos apresentam grande influência nas características organolépticas das bebidas fermentadas: Os ésteres de ácido graxo e os ésteres de acetato. Suas concentrações podem variar bastante em bebidas alcoólicas (Boulton e Quain, 2001). Tem sido relatado que a relação C/N (Palmer e Rennie, 1974) e a síntese de lipídios (Boulton e Quain, 2001), a composição do mosto e a aeração (Verstrepen *et al.*, 2003) influenciam a concentração de éster no meio.

1.6.4.1. Ésteres de acetato

O principal éster da cachaça é o acetato de etila, responsável pela formação de aroma tipo solvente; o acetato de isoamila tem aroma de banana e, em quantidades excessivas, torna a bebida

enjoativa; já o acetato de feniletila confere aromas florais, de rosas e mel à bebida (Pinheiro, 1999). Estes são os principais ésteres presentes em bebidas fermentadas e a qualidade do produto final depende das concentrações de cada um deles no mosto. O acetato de isoamila é sintetizado a partir da condensação do álcool isoamílico e da acetil coenzima A pela enzima álcool acetiltransferase (AATFase), mas também é hidrolisado pelas esterases (Fujii *et al.*, 1996). Fukuda e colaboradores (1998) sugeriram a hipótese de que o equilíbrio de ambas as atividades enzimáticas é importante para a concentração final deste éster durante a fabricação de cerveja. Portanto, baixos níveis de álcool isoamílico, de acetil-CoA, e baixos níveis da enzima AATFase podem resultar na produção deficiente do éster (Verstrepen *et al.*, 2003). O acetato de etila é formado pela condensação do etanol com acetil-CoA também pela AATFase e na cachaça se encontra na metade da concentração que existe normalmente em rum e uísque. O fato de que o total de ésteres presente na cachaça é menor do que os encontrados em outras bebidas deve provavelmente ser reflexo do fato de que a cachaça é em geral uma bebida jovem (Boscolo *et al.*, 2000).

1.6.4.2. Ésteres de ácido graxo

Os ésteres de ácidos graxos são os que mais contribuem para o sabor das bebidas em geral (Boscolo *et al.*, 2000). São ésteres de cadeia média (C6-C10), produzidos pela condensação do acil-CoA e de um álcool (geralmente etanol). Dentre os mais importantes se encontram o caproato de etila (hexanoato de etila) e caprilato de etila (octanoato de etila), os quais apresentam aroma de maçã e mamão, respectivamente (Meilgaard, 2001). Com relação aos níveis de ésteres de ácidos graxo em células de leveduras, tanto a síntese como o acúmulo são dependentes da presença dos precursores (etanol e ácido graxo) assim como pelo controle das enzimas AATases (Verstrepen *et al.*, 2003).

1.7 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

1.7.1. Aspectos gerais

O nitrogênio é um nutriente essencial para os seres vivos. As leveduras podem usar quase 30 fontes de nitrogênio distintas, como: aminoácidos, uréia, amônia, bases nitrogenadas e derivados de purina (Cooper, 1982). Essas moléculas entram na célula por meio de permeases e são imediatamente usadas como blocos de construção em reações de biossíntese ou catalisadas para

liberar nitrogênio na forma de amônia (via desaminação), glutamato (via transaminação) ou ambas (Cooper, 1982; Magasanik, 1992). As leveduras respondem metabolicamente a diferenças na disponibilidade de nitrogênio, afetando o crescimento celular, além de alterar a eficiência da fermentação e redistribuição das vias biosintéticas. Sendo assim, a falta de controle do nitrogênio no meio gera diferenças na composição das bebidas (Beltran *et al.*, 2005).

1.7.2. Assimilação da fonte de nitrogênio

Para o adequado desenvolvimento das células de levedura, é necessário monitorar a disponibilidade dos compostos alimentares, ajustar a maquinaria enzimática e o sistema de absorção para uma melhor eficiência da utilização das fontes alimentares (Boer *et al.*, 2007). A membrana plasmática das leveduras não é livremente permeável para muitos compostos, sendo assim leveduras como a *S. cerevisiae*, desenvolveram um sistema de transporte para absorver várias substâncias do meio externo, como por exemplo, os aminoácidos, sendo estes acumulados dentro da célula contra o gradiente de concentração.

Apesar de assimilarem uma ampla variedade de fontes de nitrogênio, as leveduras apresentam preferência na utilização de determinados compostos nitrogenados (Magasanik e Kaiser, 2002a). Foi observado que amônia, glutamato, glutamina e asparagina, são preferencialmente utilizadas pelas leveduras e induzem altas taxas de crescimento. Quando uma dessas fontes está em grande quantidade, ocorre a repressão das vias catabólicas de degradação de outros compostos nitrogenados como arginina, prolina e uréia. Esse mecanismo é chamado Repressão Catabólica do Nitrogênio (NCR) (Cooper e Sumrada, 1983).

Todas as vias para a utilização de fontes de nitrogênio, preferenciais e não-preferenciais, se convergem para uma via em comum, a produção de glutamato e glutamina. Estes dois aminoácidos servem como doadores de nitrogênio para todos os outros compostos nitrogenados da célula e, juntamente com a amônia, formam a via do Metabolismo Central do Nitrogênio (Magasanik, 2003). Independente da fonte de nitrogênio, o primeiro passo é a liberação da amônia. Dentro da célula, a amônia pode servir para aaminação do α -cetoglutarato, sintetizado a partir do ácido tricarbóxico para produzir glutamato ou pode aminar diretamente o glutamato para produzir glutamina. Usando diferentes enzimas, e a glutamina como única fonte de nitrogênio, pode ser convertida em glutamato, e o glutamato como única fonte de nitrogênio pode ser convertido em glutamina (Magasanik e Kaiser, 2002).

Os aminoácidos são absorvidos pela levedura em uma sequência que levou a categorização dos aminoácidos em grupos ordenados. No grupo A estão os aminoácidos que são absorvidos rapidamente do meio de cultura e desaparecem no início da fermentação, tais como glutamina, ácido glutâmico, arginina e serina. No grupo B estão os aminoácidos que são assimilados de forma mais lenta, tais como a valina, leucina e isoleucina. No grupo C, estão os aminoácidos absorvidos apenas após a completa assimilação dos aminoácidos do grupo A, tais como fenilalanina, tirosina e triptofano. O grupo D é formado apenas pela prolina, um aminoácido de baixa absorção (O'connor-Cox e Ingledew, 1989).

Com relação à produção de cachaça, a adição de sulfato de amônio ao caldo de cana é amplamente aceita por produtores artesanais e industriais, para ajudar a manter uma alta taxa de fermentação e elevada população de leveduras durante o processo de fermentação (Angelis e Mutton, 1992).

1.7.3. Influência do nitrogênio na formação dos compostos organolépticos

A natureza e disponibilidade da fonte de nitrogênio no meio de fermentação contribuem fortemente na qualidade sensorial do fermentado (O'connor-Cox e Ingledew, 1989; Lambrechts e Pretorius, 2000; Hazelwood *et al.*, 2008). A deficiência de nitrogênio aumenta o tempo de fermentação, aumenta a concentração de açúcar residual, diminui o rendimento de biomassa e gera sub-produtos indesejáveis “*off-flavours*” (Mendes Ferreira *et al.*, 2004).

No contexto da produção de aguardente, é difícil descobrir que concentração de nitrogênio no meio é necessária para a população de leveduras presente na dorna de fermentação. A concentração de nitrogênio irá depender de vários parâmetros, como por exemplo, o tipo de células, que depende da cepa de levedura utilizada, o tamanho do inoculo e as condições de fermentação, tais como aeração e a concentração de açúcar (Espinosa Vidal *et al.*, 2012). A adição de sais de amônio ao caldo de cana como suplemento, pode exercer uma forte influência nos parâmetros fermentativos e no perfil aromático do fermentado, já que esse suplemento influencia no metabolismo da levedura com relação a produção de compostos aromáticos, e na expressão dos genes relacionados a via de Erlich (Espinosa Vidal *et al.*, 2012).

Em estudos feitos por Mendes Ferreira e colaboradores (2004), a suplementação de nitrogênio favoreceu o processo aumentando a biomassa, a taxa de fermentação e o rendimento em etanol, podendo gerar um efeito positivo na qualidade sensorial que é esperada no vinho.

Entretanto, o excesso de compostos nitrogenados, adicionados na suplementação do mosto, pode resultar no incremento anormal de aminoácidos e conseqüente aumento dos teores de alcoóis superiores, podendo assim a aguardente ultrapassar o limite legal para esta classe de compostos. Um aminoácido em excesso, gera elevadas concentrações de álcool por estimular o crescimento celular. Entretanto, quando a concentração de nitrogênio é muito baixa, também produz uma alta concentração de álcool superior (Szlavko, 1974). Nesse exemplo, o teor de nitrogênio limitado irá promover a síntese endógena aumentada de aminoácidos, estimulando a rota anabólica sintética dos alcoóis superiores (Boulton e Quain, 2001). No entanto, no vinho, a produção de alcoóis superior tende a diminuir com o aumento da suplementação de nitrogênio (Carrau *et al.*, 2008). Segundo Espinosa Vidal e colaboradores (2012) a suplementação do caldo de cana com altas concentrações de sais de amônio, também vai diminuir a produção de alcoóis superiores e isso é explicado pela repressão dos genes da via de Erlich. Por outro lado, isto leva ao aumento da produção de ésteres de acetato.

Dessa forma, determinar o perfil metabólico da levedura *D. bruxellensis* durante a fermentação alcoólica poderá abrir perspectivas para utilização industrial dessa levedura na produção de bebidas diferenciadas. O presente trabalho apresenta dados metabólicos que avaliam a influência das diferentes fontes de nitrogênio na produção de metabólitos que qualificam o produto, tais como: alcoóis superiores, ésteres voláteis e ácidos orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D.; HYNES, S.; INGLEDEW, W. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 641-647, 2005. ISSN 0175-7598.

AGUILAR USCANGA, M.; DELIA, M.-L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003. ISSN 0175-7598.

ALEXOPOULOS, C. J. M., C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ANGELIS, D.; MUTTON, M. Agentes Físicos, Químicos e Microbiológicos que Afetam a Fermentação Etanólica. **Aguardente de Cana-Produção e Qualidade. Jaboticabal: FUNEP**, p. 49-66, 1992.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge University Press, 1983. ISBN 0521252962.

BASÍLIO, A. C. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008. ISSN 0343-8651.

BELTRAN, G. et al. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 996-1002, 2005. ISSN 0021-8561.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2705-2712, 2008. ISSN 0959-3993.

BEROVIC, M.; HERGA, M. Heat shock on *Saccharomyces cerevisiae* inoculum increases glycerol production in wine fermentation. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 6, p. 891-894, 2007. ISSN 0141-5492.

BIDAN, P. Relation entre la teneur des vins en alcools superieurs et la teneur des mouts en substances azotees en particulier en acides amines. **Bulletin de l'OIV**, v. 48, 1975.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010. ISSN 0175-7598.

BOER, V. M. et al. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 4, p. 604-620, 2007. ISSN 1567-1364.

BOSCOLO, M. et al. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 86-90, 2000. ISSN 0103-5053.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Wiley Online Library, 2001.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 391-396, 1998.

BRASIL. Decreto nº 2314 de 4 set.1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Regulamenta a Lei nº 8918 de 14 de julho de 1994. **Diário Oficial**. Brasília. 5 set. 1997.

BRASIL. Instrução Normativa n 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Publicado no **Diário Oficial** da União de 30/06/2005, Seção 1, Página 3. disponível em www.agricultura.gov.br.

CARRAU, F. M. et al. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1196-1207, 2008. ISSN 1567-1364.

CASTRO MARTINEZ, C. et al. Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. **Journal of food process engineering**, v. 28, n. 2, p. 133-143, 2005. ISSN 1745-4530.

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, n. 4, p. 489-495, 1999. ISSN 1097-0010.

CLAUSSEN, N. H. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 10, p. 308-331, 1904.

COCOLIN, L. et al. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1347-1355, 2004. ISSN 0099-2240.

CONTERNO, L. et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006. ISSN 0002-9254.

COOPER, T.; SUMRADA, R. What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*? **Journal of Bacteriology**, v. 155, n. 2, p. 623-627, 1983. ISSN 0021-9193.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, v. 11, n. 0, p. 39-99, 1982.

DE BARROS PITA, W. et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-9, 2011. ISSN 0003-6072.

DE BARROS PITA, W. et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, 2013. ISSN 1097-0061.

DE SOUZA LIBERAL, A. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007. ISSN 1365-2672.

DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-6, 2012. ISSN 0959-3993.

DERRICK, S.; LARGE, P. J. Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. **journal of General Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2783-2792, 1993. ISSN 1350-0872.

DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E. J.; HEWLINS, M. J. E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8028, 2003. ISSN 0021-9258.

DORNELES, D. et al. Influence of the use of selected and non-selected yeasts in red wine production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 747-751, 2005. ISSN 1516-8913.

ESPINOSA VIDAL, E. Análise transcricional em *Saccharomyces cerevisiae* associado ao metabolismo de substâncias organolépticas no âmbito da cachaça artesanal. 2008. p.77 Dissertação de mestrado. Recife, UFPE.

ESPINOSA VIDAL, E. Influência da fonte de nitrogênio no perfil fermentativo, transcriptômico e na produção de álcoois Superiores em *Saccharomyces cerevisiae*. 2012. p.87 (Doutorado). Genética, UFPE, Recife.

ESPINOSA VIDAL, E. et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, 2012. ISSN 0308-8146.

FREER, S.; DIEN, B.; MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 101-105, 2003. ISSN 0959-3993.

FUJII, T.; YOSHIMOTO, H.; TAMAI, Y. Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 538-542, 1996. ISSN 0922-338X.

GOMES, F. D. C. O. et al. Comparison between two selected *Saccharomyces cerevisiae* strains as fermentation starters in the production of traditional cachaça. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 449-455, 2009. ISSN 1516-8913.

GUERRA, J. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in applied microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001. ISSN 1472-765X.

HAZELWOOD, L. A. et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2259, 2008. ISSN 0099-2240.

IBRAC, Instituto Brasileiro da Cachaça. Informações setoriais: mercado interno Disponível em http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=47>. Acesso em: 20 de dezembro de 2012.

LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I. Yeast and its importance to wine aroma-a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, 2000.

LEA, A. G.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. Springer, 2003. ISBN 0306477068.

LEITE, F. C. B. **Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis***. 2012. 105 (DOUTORADO). UFPE, Recife, PE.

LEITE, F. C. B. et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS yeast research**, 2012. ISSN 1567-1364.

LONGO, E. et al. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, NW Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 539-541, 1992. ISSN 0959-3993.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1, p. 23-50, 2003. ISSN 0168-1605.

LURTON, L. et al. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, n. 4, p. 485-491, 1995. ISSN 1097-0010.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**, v. 2, p. 283-317, 1992.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002. ISSN 0378-1119.

MAGASANIK, B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 827-829, 2003. ISSN 1535-9778.

MARTENS,H.; ISERENTANT, D.; VERACHTERT, H. Microbiological aspects of a mixed yeast - Bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. **Journal of the Institute of Brewing**,v. 103, n. 2, p. 85-91, 1997.

MEILGAARD, M. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, n. 5, 2001.

MENDES FERREIRA, A.; MENDES FAIA, A.; LEO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 3, p. 540-545, 2004. ISSN 1365-2672.

MORAIS, P. et al. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 241-243, 1997. ISSN 0959-3993.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing** , v. 83, p. 30-31, 1977.

NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Springer, 1983. ISBN 902771553X.

O'CONNOR-COX, E.; INGLEDEW, W. Their Use by Brewing: A Review. **ASBC J**, v. 4, p. 102-108, 1989.

OLIVEIRA, E. S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004. ISSN 0959-3993.

OUGH, C.; BELL, A. Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, n. 2, p. 122-123, 1980. ISSN 0002-9254.

PALMER, A.; RENNIE, H. Ester control in high gravity brewing. **J. Inst. Brew**, v. 80, p. 447-454, 1974.

PASSOTH, V.; BLOMQUIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007. ISSN 0099-2240.

PATARO, C. et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de microbiologia**, v. 29, n. 2, p. 104-108, 1998. ISSN 0001-3714

PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 1, p. 24-31, 2001. ISSN 1365-2672.

- PATARO, C. et al. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 202-208, 2002. ISSN 1517-8382.
- PEREIRA, L. F. et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-11, 2012. ISSN 0003-6072.
- PIGGOTT, J. R.; SHARP, R.; DUNCAN, R. E. B. **The science and technology of whiskies**. Longman Scientific & Technical, 1989. ISBN 0582044286.
- PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; DE ARAUJO, D. A. **Origem, produção e composição química da cachaça**. *Redes*. v 1: 3-8 p. 2011.
- PINHEIRO, S. H. M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará**. Fortaleza UFCE, p.133. 1999. (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO)
- PISARNITSKII, A. Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 552-560, 2001. ISSN 0003-6838.
- ROMANO, P. et al. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 169-180, 2003. ISSN 0168-1605.
- ROMANO, A. et al. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1577-1585, 2008. ISSN 1365-2672.
- ROZPEĐOWSKA, E. et al. Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature communications**, v. 2, p. 302, 2011.
- SILVA-FILHO, E. A. Caracterização genética de populações de leveduras de destilaria de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. tese apresentada ao departamento de Micologia. Doutorado Em Biologia De Fungos. UFPE-RECIFE. 2003
- SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing. Institute of Brewing (Great Britain)**, v. 85, n. 3, p. 149, 1979. ISSN 0046-9750.
- SZLAVKO, C. The influence of wort glucose levels on the formation of aromatic higher alcohols. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 80, p. 534-539, 1974.
- TORREA, D. et al. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. **Food Control**, v. 14, n. 8, p. 565-571, 2003. ISSN 0956-7135.
- VAN DER WALT, J. *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964. ISSN 0003-6072.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3, p. 199-224, 1986. ISSN 0378-1097.

VERSTREPEN, K. J. et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003. ISSN 1389-1723.

VILA NOVA, M. X. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009. ISSN 0740-0020.

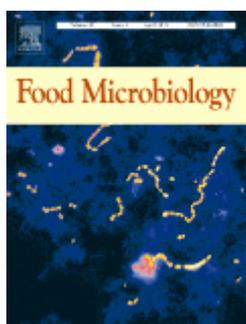
WIJSMAN, M. R. et al. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984. ISSN 0003-6072.

WOOLFIT, M. et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007. ISSN 1535-9778.

2. CAPÍTULO II: Manuscrito

Análise do perfil metabólico e organoléptico da levedura *Dekkera bruxellensis* visando à elaboração de cachaças diferenciadas

Artigo a ser submetido à revista *Food Microbiology*



Fator de Impacto: 3,283

Análise do perfil metabólico e organoléptico da levedura *Dekkera bruxellensis* visando à elaboração de cachaças diferenciadas

Denise Castro Silva ¹, Esteban Espinosa Vidal ³, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,2}.

¹Núcleo Interdepartamental de Engenharia Metabólica, ²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brasil. ³Laboratório de Bioprocessos, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife PE 50740-540, Brasil

Correspondência:

Marcos A. Moraes Jr

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária 50.670-901 Recife PE Brasil

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Web site: www.ufpe.br/nem

Resumo

A cachaça é uma bebida genuinamente brasileira que vem ganhando espaço no mercado internacional de bebidas destiladas. Os compostos voláteis produzidos pelas leveduras durante o processo fermentativo são responsáveis pelo sabor e aroma característico dessa bebida. A relevância da levedura *Dekkera bruxellensis* no contexto fermentativo tem despertado o interesse em analisar a viabilidade de utilização desta levedura para a produção de cachaça. Neste trabalho foi analisado o perfil metabólico e a produção de compostos aromáticos pela levedura *D. bruxellensis* em ensaios fermentativos simulando condições industriais, utilizando o caldo de cana-de-açúcar e meios sintéticos com altas concentrações de nitrogênio na forma de sulfato de amônia ou aminoácidos ramificados. Os resultados mostraram que, a suplementação do meio com aminoácidos ramificados exerce uma forte influência no metabolismo e na produção de aromas da levedura *D. bruxellensis*. Foi confirmado que essa levedura é capaz de assimilar fontes de nitrogênio alternativas como os aminoácidos ramificados, porém com rendimentos fermentativos menores aos observados em meios com fontes de nitrogênio preferenciais, como sulfato de amônio. Sendo assim, esses resultados confirmam a influência da fonte de nitrogênio no metabolismo de alcoóis superiores e ésteres, e ratificam a relevância de estudar mais a fundo as necessidades de nitrogênio para um melhor controle dos aromas que são formados no processo fermentativo, bem como poderá abrir perspectivas reais para a utilização industrial desta levedura na elaboração da cachaça.

Palavra-chave: *cachaça*, fermentação alcoólica, alcoóis superiores, ésteres voláteis, via de Ehrlich, nitrogênio

Introdução

A cachaça é a mais tradicional bebida alcoólica produzida no Brasil. Esta bebida espirituosa é produzida a partir da destilação do mosto fermentado da cana-de-açúcar. A fermentação ocorre com a presença de alta concentração de leveduras (10^9 células /mL, aprox. 10-12% cel. w/v), alta pressão de dióxido de carbono, temperatura elevada (entre 30 e 33 °C) e ausência de agitação do meio (Espinosa Vidal *et al.*, 2012). Durante o processo de fermentação alcoólica são produzidos majoritariamente etanol e dióxido de carbono, e em menor quantidade outros metabólitos que são responsáveis pelo sabor particular e característico desta bebida (Nykänen e Suomalainen, 1983; Lambrechts e Pretorius, 2000). Dentre esses, os alcoóis superiores e os ésteres voláteis representam o maior e mais importante grupo das substâncias responsáveis pelo sabor e aroma floral e frutado altamente desejados nas bebidas alcoólicas (Verstrepen *et al.*, 2003).

Os alcoóis superiores podem ser formados a partir do anabolismo dos carboidratos através do piruvato ou a partir do catabolismo dos aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada pela chamada via de Ehrlich (Hazelwood *et al.*, 2008). Entre os alcoóis superiores com propriedades organolépticas os mais importantes são: álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) derivado da leucina; álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol) derivado da isoleucina; isobutanol (2-metil-1-propanol) derivado da valina; triptofol (3-indole etil álcool) derivado do triptofano; tirosol derivado da tirosina; feniletanol (2-feniletanol) derivado da fenilalanina (Boulton e Quain, 2001). Já os ésteres de acetato são formados em reações de trans-esterificação entre um álcool e um ácido carboxílico (Meilgaard, 2001). O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila, responsável pela formação de aroma tipo solvente (Pinheiro, 1999). A quantidade desses compostos depende de múltiplos fatores, dos quais se destacam as condições de fermentação, a natureza da fonte de nitrogênio e a cepa de levedura empregada (Pisarnitskii, 2001; Carrau *et al.*, 2008; Hazelwood *et al.*, 2008).

Durante a elaboração da cachaça artesanal utilizando fermentos caipiras ou naturais no processo fermentativo, ocorre uma sucessão de espécies de leveduras, fungos e bactérias que em conjunto podem definir a qualidade do produto final a partir dos metabólitos produzidos, que podem ser desejáveis ou indesejáveis ao processo (Pataro *et al.*, 1998; Vila Nova *et al.*, 2009). Muitas leveduras têm sido testadas para a produção de bebidas fermentadas pela capacidade de produção de etanol e de substâncias sensoriais. Por exemplo, a levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* é utilizada na produção de cervejas Belgas do tipo Lambic (Martens *et al.*, 1997),

embora sua principal reputação é a de contaminar destilarias de álcool combustível e vinícolas em todo o mundo, estando associada à queda do rendimento em etanol e a mudanças no aroma e sabor dos vinhos. (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; De Souza Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008).

Entretanto, esse conceito tem mudado, pois já existem trabalhos mostrando que isolados industriais dessa levedura produzem maiores rendimentos de etanol, apesar de ter uma menor produtividade, quando comparada a *S. cerevisiae*, que é a levedura normalmente usada em processos fermentativos (De Souza Liberal *et al.*, 2007; Passoth *et al.*, 2007; Blomqvist *et al.*, 2010).

Com relação as propriedades fermentativas, a espécie *D. bruxellensis* é capaz de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Dentre as fontes de carbono, estão os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e dissacarídeos, como sacarose, maltose, celobiose e trealose. As fontes de nitrogênio assimiláveis por esta levedura são: amônia, nitrato, arginina e prolina (Conterno *et al.*, 2006). O fato de *D. Bruxellensis* ter a capacidade de assimilar nitrogênio na forma de nitrato pode conferir a esta levedura uma vantagem adaptativa no processo de fermentação industrial de caldo de cana quando comparada a *S. cerevisiae* (De Barros Pita *et al.*, 2011).

Considerando a importância da cepa de levedura empregada na produção da cachaça e a relevância da levedura *D. bruxellensis* no contexto fermentativo, foi despertado o interesse em analisar a viabilidade de utilização desta levedura como fermento para a produção de cachaça com qualidades sensoriais diferenciadas. Deste modo, neste trabalho foi determinado o perfil metabólico da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 em meios naturais e sintéticos com diferentes fontes de nitrogênio e em condições similares a industriais, verificando a influência das diferentes fontes de nitrogênio na produção de compostos importantes para a produção de aroma e sabor nas bebidas alcoólicas. Sendo assim, este estudo ampliou o conhecimento sobre o comportamento fisiológico da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 em função das diferentes fontes de nitrogênio, bem como poderá abrir perspectivas para a utilização industrial desta levedura na elaboração da cachaça.

Materiais e métodos

Linhagem da levedura e condições de pré-cultura

A cepa industrial da *D. bruxellensis* GDB 248 (De Barros Pita *et al.*, 2011) foi utilizada neste estudo. A linhagem foi mantida em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica e 2% de agar) com repique constante para novas placas para manter as

colônias de células frescas. As células foram inoculadas em frascos de agitação de 500 ml contendo 150 ml de YPS (1% de extrato de levedura, 2% de sacarose e 2% de peptona bacteriológica) para pré-cultura. O meio foi suplementado com ácido nalidíxico (50 mg/mL) e ampicilina (50 ug/ml) para evitar a contaminação bacteriana. As pré-culturas foram incubadas a 30 ° C e 160 rpm por 72 h.

Meios de cultura

Os ensaios de fermentação foram realizados em meios com diferentes fontes de nitrogênio. O meio industrial utilizado foi o caldo de cana-de-açúcar (SCJ) adquirido de produtores locais. Depois da cana-de-açúcar ser esmagada, o mosto extraído foi mantido em gelo e transportado para o laboratório onde foi clarificado, esterilizados e armazenados, conforme descrito por Espinosa Vidal *et al.* (2012). O meio YPS para fermentação apresenta a mesma composição descrita acima, com o conteúdo de sacarose aumentado para 12% (m/v). O meio mineral MMS foi composto de YNB a 6,7 g/L com sulfato de amônio 5 g/l e sacarose a 120 g/L de sacarose. O meio sintético MMS+AA foi composto de YNB a 1,7 g/L sem aminoácidos e sulfato de amônio, suplementado com sacarose a 120g/L e uma mistura de leucina, isoleucina e valina a 0,40 g/L de nitrogênio cada como fontes de nitrogênio. A ausência do íon sulfato foi compensada pela adição de uma quantidade equimolar de sulfato de potássio (Tabela1). Todos os meios de fermentação foram suplementados com ácido nalidíxico (50 mg / mL) e ampicilina (50 ug / ml) para evitar a contaminação bacteriana.

Ensaio de fermentação

Para cada ensaio de fermentação as células do pré-cultivo foram centrifugadas em falcons de 50 mL até se obter a biomassa de 6 g de células em peso úmido, em seguida foi complementado com o meio de fermentação até 50 mL. Estas culturas foram transferidas para erlenmeyer de 125 ml mL, resultando na concentração final de 120 g de células/L (10^9 cels/ml). Os ensaios de fermentação foram realizados em replicatas biológicas independentes a 32 ° C, semi-anaerobióse, sob suave agitação (o suficiente para prevenir a sedimentação de células). A densidade de células foi medida por contagem de células utilizando um hemocítmetro e o nível de açúcar foi monitorizado a cada 2 h por meio de um refractômetro manual e expresso como ° Brix. Amostras de 1,5 mL foram retiradas no início, durante a fermentação (2,4,6,8,10,12) horas e no tempo de 24 h (tempo final) como replicatas técnicas, e centrifugadas a 11000 rpm durante 1 min. a 4 ° C em eppendorf. O

sobrenadante foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise de metabolitos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gasosa (GC).

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por inspeção das células coradas com azul de metileno no microscópio óptico utilizando Câmara de Neubauer (Pereira *et al.*, 2012)

Análise química

Determinação de sacarose, glicose, frutose, glicerol, acetato e etanol

A quantificação dos açúcares (glucose, frutose e sacarose), acetato, etanol e glicerol foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizando uma coluna de permuta iônica, HPX-87H (BioRad, EUA) com temperatura do forno de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 5 mM de H_2SO_4 como fase móvel e fluxo a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. O volume de amostra injetado foi 20 μL . Os compostos foram identificados considerando os tempos de retenção relativos e quantificados com base na comparação direta utilizando uma curva padrão. Os valores representam a média de duas repetições biológicas independente com, pelo menos, duas repetições técnicas. A análise dos dados determinou que o erro na medição foi inferior a 10% em todos os casos.

Determinação de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol, butanol, álcool amílico e isoamílico

A concentração dos compostos no meio foi determinada por cromatografia gasosa (GC), utilizando uma coluna Restek (60 mx 0,32 mm x 1,0 mm) com hidrogênio como gás de transporte. A temperatura de injeção foi de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, a temperatura inicial do forno de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6,5 min) a temperatura final de $103\text{ }^{\circ}\text{C}$. O fluxo de gás de transporte de 7 mL/min e a temperatura do detector de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume de amostra injetada foi de 10 μL . Todos os compostos foram normalizados com o padrão interno (2-pentanol), identificadas pelos seus tempos relativos de retenção e quantificados por meio de uma curva padrão feita com cada composto individual. Os valores representam a média de duas repetições biológicas independente com duas repetições técnicas. A análise dos dados determinou que o erro na medição foi inferior a 10%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos parâmetros fermentativos

A viabilidade de utilização da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 para a produção de cachaça foi avaliada a partir do perfil metabólico e organoléptico dessa levedura a partir de fermentações em meios com diferentes fontes de nitrogênio em condições similares às industriais. Quando se avalia a evolução do crescimento celular, em todos os meios é perceptível o aumento da biomassa (Figura 1) e manutenção da viabilidade celular, com exceção do meio MMS + AA (Tabela 1). O maior aumento da biomassa observado foi no meio MMS (98,5%), seguido pelo meio SCJ, que teve um crescimento de 88,5% quando comparara a biomassa inicial (Figura 1). Vale ressaltar que os dois meios continham amônio como fonte de nitrogênio.

Tabela 1. Viabilidade, composição dos meios de cultura e parâmetros fermentativos em ensaios utilizando a linhagem GDB 248. (N = nitrogênio, FAN = *free amino nitrogen*)

MEIOS	VIABILIDADE		SACAROSE		NITROGÊNIO			ETANOL			ACETATO	GLICEROL	
	[Inicial]	[Final]	[Inicial]	[consumida]	Fonte	FAN	[Final]	<i>Y etanol/sacarose</i>	<i>P max</i>	[Final]	[Final]	<i>Y glicerol/sacarose</i>	
	%	%	g/L	g/L		g/L	mg N/L	g/L	g/g	g/h.L	g/L	g/L	g/g
SCJ	98	95	118,54	118,54	Amônia	0,57 ^a	171,09	34,02	0,28	1,42	3,06	1,94	0,02
					Nitrato	0,24 ^b							
YPS	97	92	121,16	104,59	Ext. levedura	10	5500 ^c	39,27	0,38	1,63	1,23	3,01	0,03
					Peptona	20							
MMS	95	90	112,68	70,22	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	1059	30,16	0,43	1,25	1,14	3,06	0,04
MMS + AA	93	67	108,04	50,38	L-isoleucina	3,84	1229	7,59	0,15	0,31	0,00	0,60	0,01
					L-leucina	3,84							
					L-valina	3,43							

^adeterminação com niydrina neste trabalho.

^bde Barros Pita *et al*, 2012.

^cAnnua, *et al*, 2007.

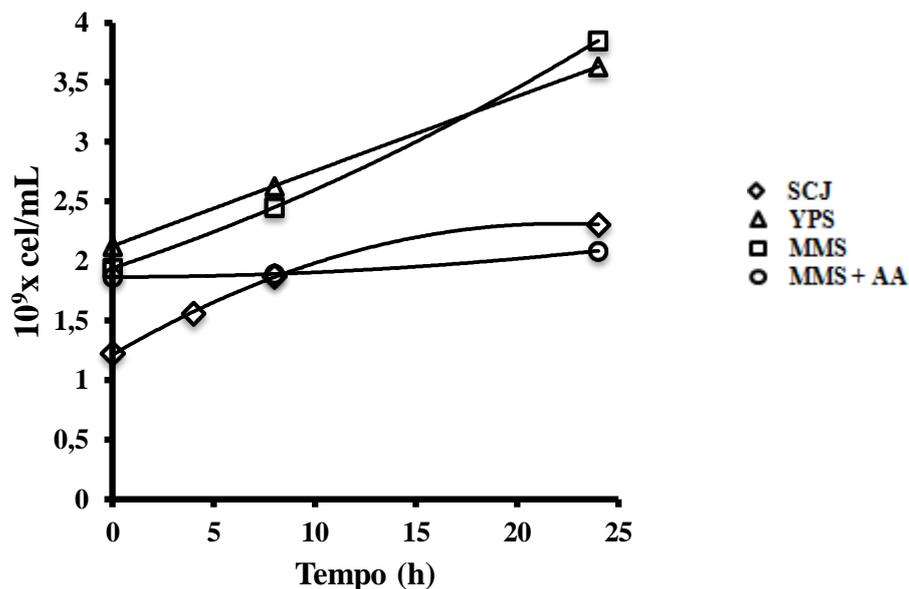


Figura 1. Variação da biomassa de *Dekkera bruxellensis* durante os experimentos de fermentação em meio natural de caldo de cana (SCJ), no meio completo (YPS) e nos meios minerais com suplemento de sulfato de amônio (MMS) e com suplemento de aminoácidos ramificados (MMS+AA). Os valores representam as médias de dois ensaios biológicos, com replicatas técnicas para cada ponto.

A elevada produção de biomassa por *D.bruxellensis* no meio com sacarose correspondem com os dados relatados anteriormente pelo nosso grupo em cultivos aeróbicos (Leite *et al.*, 2012) e em experimentos de fermentação com caldo de cana (De Souza *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). Isto reforça o fato de que a levedura *D. bruxellensis* apresenta maior tendência para produção de biomassa quando comparado a *S. cerevisiae* (De Souza *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012).

Apesar do maior crescimento celular, verificou-se alta concentração de açúcar residual no meio MMS em relação aos outros meios (Tabela 1). O consumo da sacarose foi maior no meio SCJ (Figura 2A), sendo toda a sacarose consumida em menos de 24 h de fermentação, fato não observado para os meios de laboratório. Isso pode ter sido influenciado pela presença do nitrato no caldo de cana (Tabela 1). O nitrato é uma fonte de nitrogênio assimilável por *D. bruxellensis* e atua aumentando a velocidade de crescimento celular, o consumo de sacarose e revertendo o efeito “Custer” (De Barros Pita *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Galafassi *et al.*, 2013). O imediato consumo de sacarose no meio SCJ pela levedura *D. bruxellensis* GDB 248 (Figura 2A) reafirma a habilidade dessa levedura de se adaptar ao processo industrial, como previamente reportado (De Souza Liberal *et al.*, 2007), embora o consumo de sacarose nos meios sintéticos tenha sido consideravelmente mais lento quando comparado ao meio natural SCJ. A maior concentração de açúcar residual foi verificada no meio MMS+AA, 53% em relação à sacarose inicial, e teve como

resultado o baixo crescimento celular, apenas 12 % em relação à biomassa inicial, além de uma significativa perda da viabilidade celular em relação aos outros meios (Figura 1 e Tabela 1). Como consequência, neste meio foi observada a menor produção de etanol, menor rendimento e menor produtividade quando comparada aos outros meios com diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 1). Desta maneira podemos concluir que a linhagem de levedura GDB 248 apresenta um menor desempenho fermentativo quando cresce com aminoácidos ramificados como fonte de nitrogênio (Tabela 1). Segundo O'connor-Cox e Ingledew (1989), a baixa assimilação do nitrogênio é um dos principais fatores responsáveis pelo declínio da atividade fermentativa pelas células de leveduras.

O rápido consumo de sacarose no meio SCJ favoreceu a maior produtividade de etanol nessa condição (Figura 2A e Tabela 1). Entretanto o rendimento final em etanol foi 34% menor em relação ao meio MMS, que apresentou o maior rendimento (0,43 g/g) dentre todos os meios analisados (Tabela 1). Por outro lado, no meio SCJ observa-se a maior produção de acetato quando comparado com os outros meios (Figura 2C). Isto pode explicar o baixo rendimento em etanol das células no meio SCJ pelo desvio de carbono no ponto de ramificação do acetaldeído. Mostrando uma tendência ao metabolismo oxidativo no meio SCJ. Neste caso, a presença de nitrato no caldo de cana aumentaria a demanda por NADH, o qual seria formado a partir da oxidação do acetaldeído a acetato. A hipótese do metabolismo oxidativo induzido pelo nitrato tem sido comprovada recentemente (De Barros Pita *et al.*, 2013; Galafassi *et al.*, 2013). Nos meios de laboratório MMS e YPS não haveria esta demanda resultando, portanto a produção de acetato, não ultrapassou 1,23 g/L (Figura 2C e Tabela 1).

A produção de acetato esta principalmente restrita aos estágios finais da fermentação em todos os meios com diferentes fontes de nitrogênio (Figura 2C). A formação de acetato está associada ao crescimento aeróbio de *D. bruxellensis*, sendo a cadeia respiratória ativada para a re-oxidação dos co-fatores formados durante a produção deste metabólito (Blomqvist *et al.*, 2010). Resultados anteriores do nosso grupo em cultivos aeróbios mostraram a alta eficiência da via de biossíntese de acetato em *D. bruxellensis*, tornando-se o principal produto do metabolismo da sacarose glicose e frutose (Leite *et al.*, 2012). Entretanto, quando as células são cultivada com nitrato como única fonte de nitrogênio não há produção de metabólitos de fermentação (etanol, acetato e glicerol). Portanto, a maior produção de acetato no meio SCJ corrobora o metabolismo de co-assimilação de amônio e de nitrato presente neste substrato (De Barros Pita *et al.*, 2011) bem como o efeito supressor metabólico que a amônia tem sobre os efeitos negativos do nitrato do meio (De Barros Pita *et al.*, 2013). Devido a essa preferência pela via de acetato, uma pequena quantidade de oxigênio no meio pode ser suficiente para disparar o metabolismo oxidativo nesta

levedura. Não foi detectado acetato na fermentação com o meio mineral MMS+AA possivelmente devido ao declínio da atividade fermentativa (Figura 2C e Tabela 1).

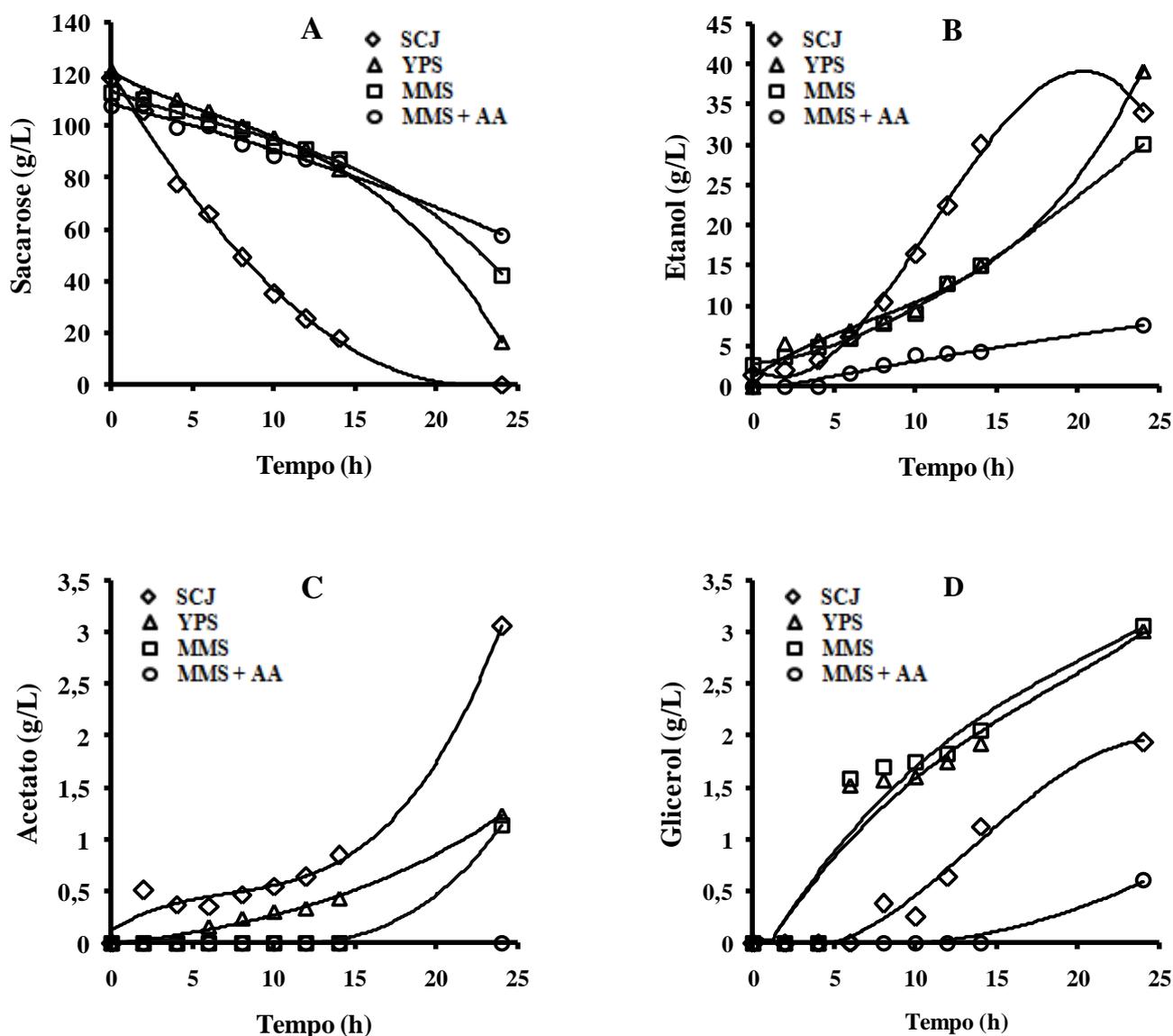


Figura 2. Perfil fermentativo da linhagem industrial GDB 248 de *D. bruxellensis* nos meios SCJ, YPS, MMS e MMS + AA. O perfil metabólico de consumo de sacarose (painel A), produção de etanol (painel B), acetato (painel C) e glicerol (painel D) são apresentados.

A produção de glicerol esta associada à produção de biomassa e é um subproduto da fermentação (Blonquevist *et al.*, 2010). As leveduras produzem glicerol sob limitação de oxigênio, a fim de re-oxidar o NADH produzido durante os processos de oxidação (Van Dijken e Scheffers, 1986). O NADH é gerado não apenas pela via glicolítica, mas também pela biossíntese de

aminoácidos. Em condições aeróbicas, a reação mais importante para a re-oxidação deste NADH em excesso é a produção de glicerol. Alguns autores afirmam que leveduras do grupo *Dekkera/Brettanomyces* não tem capacidade de produzir glicerol, e esta incapacidade levaria ao efeito Custer, isto é, a inibição temporária de fermentação em condições de anaerobiose (Wijsman *et al.*, 1984). No entanto, alguns trabalhos tem relatado a produção de glicerol por células de *D. bruxellensis*, mesmo que em menor proporção do que aquelas encontradas em cultivos de *S. cerevisiae* (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003; De Souza Liberal *et al.*, 2007; Blomqvist *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). Este fato foi evidenciado no presente trabalho (Figura 2D). O rendimento de glicerol pela linhagem GDB 248 nos meios de laboratório (YPS e MMS) foi superior a linhagem CBS 11269 (Tabela 1; Blomqvist *et al.*, 2010). Pode-se inferir que a linhagem utilizada no presente trabalho possui maior capacidade de re-estabelecer o equilíbrio redox das células. O baixo rendimento do glicerol no meio natural SCJ em relação aos meios MMS e YPS (Tabela 1 e Figura 2D) pode ser explicado também pela presença do nitrato neste meio natural, já que o NADH proveniente da oxidação do acetaldeído a acetato será reoxidado durante a redução do nitrato a nitrito.

Análise dos compostos sensoriais

A Figura 3 e Tabela 2 mostram o resultado da concentração de alguns dos metabolitos de maior importância sensorial produzidos pela levedura *D. bruxellensis* em diferentes fontes de nitrogênio. Em geral, o perfil de concentração dos compostos voláteis mostrou-se diferencialmente distintos entre meios analisados com cinéticas de produção exponencial em função do tempo (Fig. 3).

Tabela 2. Concentração final e produtividade máxima (*P_{max}*) dos compostos voláteis produzidos por *Dekkera bruxellensis* durante a fermentação de meio natural SCJ, do meio completo YPS e nos meios minerais MMS e MMS+AA.

MEIOS	ACETATO DE ETILA		PROPANOL		ISOBUTANOL		FRAÇÃO AI	
	[final]	<i>P_{max}</i>	[final]	<i>P_{max}</i>	[final]	<i>P_{max}</i>	[final]	<i>P_{max}</i>
	µg/L	µg/H.L	µg/L	µg/H.L	µg/L	µg/H.L	µg/L	µg/H.L
SCJ	111,83	4,66	11,23	0,47	19,15	0,80	18,21	0,76
YPS	55,89	2,33	4,84	0,20	20,33	0,85	17,32	0,72
MMS	77,69	3,24	8,48	0,35	17,87	0,74	21,11	0,88
MMS + AA	18,02	0,75	0	0	35,67	1,49	248,53	10,36

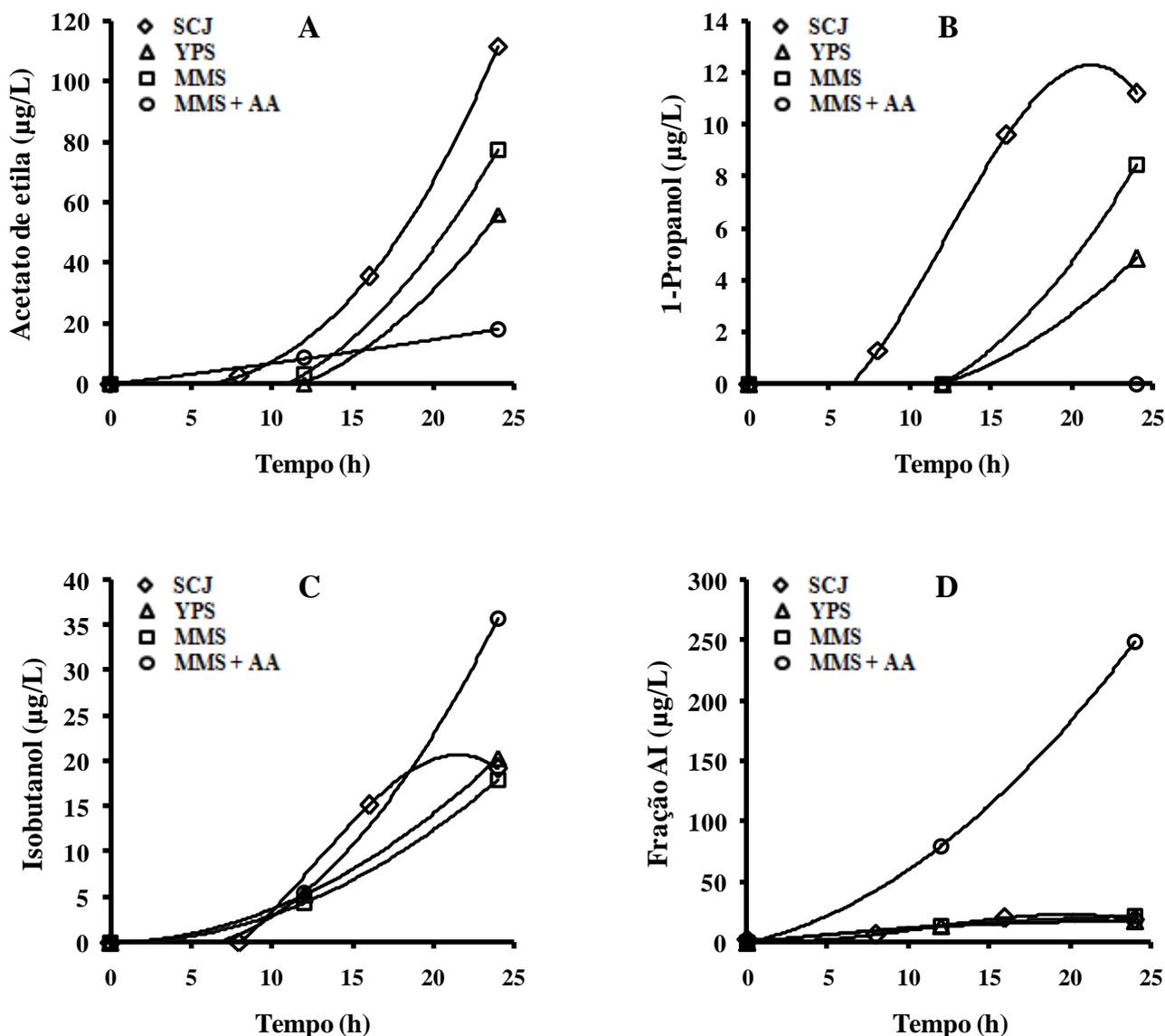


Figura 3. Cinética de produção de acetato de etila (painel A), propanol (painel B), isobutanol (painel C) e da soma de álcool amílico e isoamílico - fração AI (Painel D) pela linhagem GDB 248 durante a fermentação dos meios SCJ, YPS, MMS e MMS+AA

Especificamente em relação às alcoóis superiores derivados do catabolismo da leucina, isoleucina e valina, como era previsto, observou-se uma maior produção no meio suplementado com os aminoácidos ramificados como única fonte de nitrogênio (MMS+AA). Neste meio, o álcool superior produzido majoritariamente foi a soma de álcool amílico activo e isoamílico (fração AI) (248 µg/L). A produção de AI foi similar nos meios YPS, MMS e SCJ, resultando em uma média de 18,6 µg/L, 11 vezes menor quando comparado ao meio MMS+AA (Tabela 2 e Figura 3D). O perfil de produção do álcool amílico e isoamílico foi apresentado como a soma dos dois compostos (AI),

já que não foi possível identificar estes isômeros estruturais separadamente nas condições de GC empregadas. Interessantemente, empregando como referência o meio natural SCJ, pode-se observar que a produção de AI foi 12 vezes menor em relação ao produzido pela levedura *S.cerevisiae* ao final da fermentação nas mesmas condições de cultura (Espinosa Vidal, *et al.* 2012).

Ao mesmo tempo, o isobutanol derivado do metabolismo de valina, foi o terceiro composto majoritariamente produzido no meio MMS+AA (36 ug/L) (Figura 3C), em média 2 vezes mais que nos outros meios analisados. Entretanto, de maneira similar a AI, a produção de Isobutanol pela *D. bruxellesnsis* foi quase 17 vezes menor, quando comparada a produção desse álcool por *S. cerevisiae* ao final da fermentação e nas mesmas condições de cultivo (Espinosa Vidal *et al.*, 2012).

Pode-se observar que, apesar das concentrações iniciais de nitrogênio serem iguais para cada aminoácido (0,40 g/L de N), no meio MMS+AA, a produção final de AI, provenientes do catabolismo da leucina e da isoleucina, foi quase sete vezes maior do que a produção final de isobutanol, proveniente do metabolismo da valina (Tabela 2). Pode-se perceber também que a produção do álcool isoamílico no meio MMS+AA começou no início da fermentação, enquanto a produção de isobutanol, só iniciou-se a partir de 8 horas da fermentação (Figura 3C e D). Todos estes dados em conjunto mostram que a levedura *D. bruxellensis* é capaz de incorporar aminoácidos ramificados como fonte de nitrogênio, porem com diferentes taxas assimilativas. Isto poderia ser explicado pelos diferentes graus de afinidade das enzimas ceto-acidos decarboxilases. No contexto da levedura *S. cerevisiae*, isso é explicado pelo fato de que as descarboxilases apresentam maior afinidade pelo α -cetoisocaproato proveniente do catabolismo da leucina, enquanto menor afinidade pelo α -cetoisovalerato proveniente da valina, e muito baixa afinidade pelo α -ceto- β -metilvalerato proveniente da isoleucina (Vuralhan *et al.*, 2003). Como isso, é possível supor que as propriedades enzimáticas das descarboxilases de *D. bruxellensis* sejam semelhantes às de *S. cerevisiae*. Podendo também explicar a menor produção do isobutanol no meio MMS+AA. Em *S. cerevisiae* a piruvato descarboxilase codificada pelo gene *PDC1* parece ser a principal enzima na descarboxilação dos α -cetoácidos provenientes do catabolismo dos aminoácidos ramificados (Ter Schure *et al.*, 1998), embora a enzima codificada pelo gene *ARO10* (fenilpiruvato descarboxilase) apresente grande atividade para esses substratos (Vuralhan *et al.*, 2005). Surpreendentemente foi detectada a presença de dois genes *ARO10* no genoma de *D. bruxellensis*, fato que não ocorre em outros hemiascomicetos (De Souza Liberal *et al.*, 2012). Entretanto, esses dois genes apresentam-se reprimidos ou com expressão reduzida quando as células de *D. bruxellensis* são cultivadas na presença de leucina ou valina como fonte de nitrogênio (De Souza Liberal *et al.*, 2012). Isto explica

o fato de que a produção desses compostos é menor em *D. bruxellensis* (Figura 3D) do que em *S. cerevisiae* (Espinosa Vidal *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante que não se pode descartar na formação de alcoóis superiores é a sua possível contribuição na manutenção do equilíbrio redox das células juntamente com o glicerol. Na formação de glicerol, assim como na redução do aldeído de cadeia ramificada para o álcool fúsel na via de Erlich, envolve a oxidação do NADH a NAD⁺ (Van Dijken e Scheffers, 1986; Lilly *et al.*, 2006). Desta forma, a produção de alcoóis superiores seria um nível a mais de ajuste fino para regular o estado redox das células (Boulton e Quain, 2001).

Em relação ao escasso crescimento e à perda da viabilidade celular apresentado no meio MMS+AA, poderia ser resultado da menor eficiência na assimilação de aminoácidos ramificados em relação ao amônio, possivelmente devido a uma menor quantidade de transportadores específicos ou a uma menor velocidade de assimilação devido ao maior tamanho estrutural dos aminoácidos ramificados, somado a um gasto energético maior do transporte. Estudos similares com aminoácidos aromáticos apresentam linhagem GDB 248 com capacidade diferencial de crescimento em meio mineral suplementado com esses aminoácidos (dados não apresentados), entretanto esse meio gera escasso crescimento em *S. cerevisiae* possivelmente devido aos mesmos fatores citados acima (Espinosa Vidal, 2012). No mesmo sentido, este menor crescimento celular poderia associar-se à sensibilidade de *D. bruxellensis* aos efeitos tóxicos produzidos pelos alcoóis superiores (Tabela 2 e Figura 1). Alguns estudos já mostram que em células de *S. cerevisiae* o álcool isoamílico induz a formação de pseudohifas e reduz o crescimento celular (Martínez-Anaya *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2004). Um maior número de análises necessita ser realizada para elucidar estes diferentes comportamentos fermentativos.

Em relação aos ésteres de acetato, foi observada uma alta taxa de produção do acetato de etila as primeiras 7 h da fermentação no meio SCJ (112 ug/L), bem como a maior produtividade em relação aos outros meios (Tabela 2). Neste meio, novamente observa-se maior produção de acetato de etila por células de *S. cerevisiae* (Espinosa Vidal *et al.*, 2012), embora a produção desse composto em *D. bruxellensis* seja metade do que é produzido por *S. cerevisiae*, nas mesmas condições. Por outro lado a menor produção desse éster foi no meio MMS+AA, que também apresentou a menor produtividade (0,75 µg/H.L), cerca de seis vezes menor quando comparada com a produtividade do meio SCJ (Tabela 2 e Figura 3 B). Os ésteres são formados pela condensação entre um álcool, nesse caso o etanol, e o acetil-CoA e a concentração final deste éster durante a fabricação de cerveja por células de *S. cerevisiae* está relacionada ao equilíbrio das atividades enzimáticas de acil-transferases e esterases (Fukuda *et al.*, 1998). Essa menor produção pelas células de *D. bruxellensis* precisa ser

estudada, mas provavelmente sua tendência fisiológica para o metabolismo oxidativo deva induzir a maior produção de esterases, deslocando esse equilíbrio para as reações de quebra dos ésteres nos seus componentes. Entretanto, a menor disponibilidade de acetil-CoA citosólico, como sugerido pela grande produção de acetato pelas células de *D. bruxellensis* (Figura 2C), para as reações de transacetilação seja uma hipótese mais direta.

A cinética de produção do 1-propanol foi similar á produção de acetato de etila, porem em concentrações 10 vezes menores (Figura 3 B). A produção acetato de etila e propanol foi escassa o nula no meio MMS+AA. Também, não foi detectada a produção de álcool n-butílico em nenhum dos ensaios fermentativos. Diferente dos alcoóis superiores derivados do catabolismo dos aminoácidos, o 1-propanol é formado pela condensação do ácido pirúvico e do Acetil-CoA no metabolismo principal (Nykänen e Suomalainen, 1983). A linhagem GDB 248 produziu maiores concentrações de 1-propanol nos meios com baixas concentração de nitrogênio (como no meio SCJ com 171 mg N/L), e concentrações menores quando tinha maior nitrogênio presente no meio (como no meio YPS com 5500 mg N/L). Esse mecanismo inverso na produção do 1-propanol em relação à disponibilidade de nitrogênio já também foi observado anteriormente em linhagens de leveduras *S. cerevisiae* no contexto industrial da produção do vinho (Carrau *et al.*, 2008).

Como mostra a Tabela 2, a produção de compostos voláteis entre os meios com amônia como fonte de nitrogênio foi, em geral, maior no meio SCJ, embora a concentração de amônia no meio MMS tenha sido seis vezes maior. Esse resultado é similar ao encontrado na produção de vinho e no mosto fermentado de caldo de cana, onde a produção de alcoóis superiores diminuiu com o aumento da concentração total de nitrogênio (Carrau *et al.*, 2008; Espinosa Vidal *et al.*, 2012).

Conclusão

No presente trabalho, procurou-se analisar o comportamento fisiológico da levedura *D. bruxellensis*, bem como identificar a produção dos compostos voláteis com características organolépticas em função das diferentes fontes de nitrogênio. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, que simula as condições industriais, a suplementação do meio com aminoácidos ramificados exerce uma forte influência no metabolismo e na produção de aromas da levedura *D. bruxellensis*. Como era previsível por estudos anteriores, foi comprovado que *D. bruxellensis* é capaz de assimilar fontes de nitrogênio alternativas como os aminoácidos ramificados, porém com rendimentos fermentativos menores aos observados em meios com fontes de nitrogênio

preferenciais, como sulfato de amônio. Provavelmente isto se deva a uma menor eficiência de assimilação dos aminoácidos ramificados ou a um efeito inibidor do crescimento por parte dos alcoóis superiores. Baseado na capacidade das células de *D. bruxellensis* em produzir compostos sensoriais e na alta adaptabilidade dessa levedura as condições industriais, o presente estudo abre portas para uma futura aplicação industrial dessa levedura como fermento para a produção de cachaça.

Agradecimentos

O presente estudo foi parcialmente financiado com recursos dos programas CAPES-COFECB (nº99/2008) e PRONEM/CNPq-FACEPE e se insere no contexto das atividades da Rede de Pesquisa, desenvolvimento e inovação na produção de etanol do estado de Pernambuco e do programa BIOFLAVOR (ação COST-EU/2008).

Referências

AGUILAR USCANGA, M.; DELIA, M.-L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003. ISSN 0175-7598.

BASÍLIO, A. C. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008. ISSN 0343-8651.

BLOMQUIST, J. et al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010. ISSN 0175-7598.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Wiley Online Library, 2001.

CARRAU, F. M. et al. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1196-1207, 2008. ISSN 1567-1364.

CONTERNO, L. et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006. ISSN 0002-9254.

DE BARROS PITA, W. et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-9, 2011. ISSN 0003-6072.

DE BARROS PITA, W. et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, 2013. ISSN 1097-0061.

DE SOUZA LIBERAL, A. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007. ISSN 1365-2672.

DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-6, 2012. ISSN 0959-3993.

DE SOUZA, R. B. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, p. 1-6, 2012. ISSN 1367-5435.

ESPINOSA VIDAL, E. Análise transcricional em *Saccharomyces cerevisiae* associado ao metabolismo de substâncias organolépticas no âmbito da cachaça artesanal. 2008. 77 Dissertação de mestrado. Recife, UFPE.

ESPINOSA VIDAL, E. et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, 2012. ISSN 0308-8146.

FUKUDA, K. et al. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4076, 1998. ISSN 0099-2240.

GALAFASSI, S. et al. Utilization of nitrate abolishes the "Custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2013. ISSN 1476-5535.

HAZELWOOD, L. A. et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2259, 2008. ISSN 0099-2240.

KERN, K. et al. Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2004. ISSN 1567-1364.

LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I. Yeast and its importance to wine aroma-a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, 2000.

LEITE, F. C. B. et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS yeast research**, 2012. ISSN 1567-1364.

LILLY, M. et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. **Yeast**, v. 23, n. 9, p. 641-659, 2006. ISSN 0749-503X.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1, p. 23-50, 2003. ISSN 0168-1605.

MARTÍNEZ-ANAYA, C.; DICKINSON, J. R.; SUDBERY, P. E. In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. **Journal of cell science**, v. 116, n. 16, p. 3423-3431, 2003. ISSN 0021-9533.

MARTENS, H.; ISERENTANT, D.; VERACHTERT, H. Microbiological aspects of a mixed yeast - Bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103, n. 2, p. 85-91, 1997.

MEILGAARD, M. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review. **J. Inst. Brew**, v. 107, n. 5, 2001.

NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Springer, 1983. ISBN 902771553X.

O'CONNOR-COX, E.; INGLEDEW, W. Their Use by Brewing: A Review. **ASBC J**, v. 4, p. 102-108, 1989.

PASSOTH, V.; BLOMQUIST, J.; SCHNÜRER, J. Dekkera bruxellensis and Lactobacillus vini form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007. ISSN 0099-2240.

PATARO, C. et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de microbiologia**, v. 29, n. 2, p. 104-108, 1998. ISSN 0001-3714.

PEREIRA, L. F. et al. The physiological characteristics of the yeast Dekkera bruxellensis in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with Saccharomyces cerevisiae. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-11, 2012. ISSN 0003-6072.

PINHEIRO, S. H. M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará**. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Fortaleza UFCE, p.133. 1999. (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO)

PISARNITSKII, A. Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 552-560, 2001. ISSN 0003-6838.

TER SCHURE, E. G. et al. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by Saccharomyces cerevisiae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1303-1307, 1998. ISSN 0099-2240.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3, p. 199-224, 1986. ISSN 0378-1097.

VERSTREPEN, K. J. et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003. ISSN 1389-1723.

VILA NOVA, M. X. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009. ISSN 0740-0020.

VURALHAN, Z. et al. Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3276-3284, 2005. ISSN 0099-2240.

VURALHAN, Z. et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4534-4541, 2003. ISSN 0099-2240.

WIJSMAN, M. R. et al. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984. ISSN 0003-6072.

CONCLUSÃO

- A levedura *D. bruxellensis* apresenta maior produção de biomassa quando comparado a *S. cerevisiae*;
- A rápida assimilação da sacarose no meio SCJ, ratifica a vantagem do nitrato nesse meio e a capacidade dessa levedura em se adaptar as condições industriais;
- Nossa linhagem possui maior capacidade de re-estabelecer o equilíbrio redox quando comparada a outra linhagem industrial de *D. bruxellensis*;
- *D. bruxellensis* é capaz de assimilar aminoácidos ramificados com única fonte de nitrogênio, porém com rendimentos fermentativos menores aos observados em meios com fontes de nitrogênio preferenciais, como sulfato de amônio.
- *D. bruxellensis* é capaz de produzir compostos organolépticos de interesse industrial;
- Não foi detectado álcool n-butílico em nenhuma das fermentações com diferentes fontes de nitrogênio;
- As maiores concentração de álcool superiores produzidos na presença de aminoácidos ramificados sugerem o catabolismo destes na via de Ehrlich;
- Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para um melhor entendimento da fisiologia de *D. bruxellensis* em função das diferentes fontes de nitrogênio, bem como poderá abrir perspectivas para a utilização industrial desta levedura na elaboração da cachaça.



PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Appropriate indications of replication and variability should be included.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Resultados complementares

Fermentação com aminoácidos aromáticos por *Dekkera bruxelensis*

Dentre os vários fatores que influenciam na produção de cachaça artesanal, a presença de diferentes fontes de nitrogênio leva a diferentes perfis fermentativos, gerando diversos aromas e

sabores. Para o melhor entendimento de como as diferenças na fonte de nitrogênio influenciam no perfil fermentativo da levedura *Dekkera bruxellensis* GDB 248, foi feita uma cinética durante a fermentação dessa levedura no meio sintético MMS+ARO. Esse meio foi composto de YNB a 1,7 g/L sem aminoácidos e sulfato de amônio, suplementado com sacarose a 120g/L e uma mistura de fenilalanina (0,40 g/L de N), triptofano (0,40 g/L de N) e tirosina (0,03 g/L de N) como fontes de nitrogênio. A ausência do íon sulfato foi compensada pela adição de uma quantidade equimolar de sulfato de potássio. A menor concentração de tirosina no meio é devido a sua baixa solubilidade. As condições de fermentação foram realizadas segundo os experimentos descritos no manuscrito acima. Foi observado o rápido consumo de sacarose nesse meio (Figura 1) quando comparado ao consumo de sacarose no meio MMS + AA. O rendimento nesse meio com aminoácidos aromáticos foi de 0,45 g/g, sendo 3 vezes maior do que no meio MMS+AA. Entretanto esse meio gera lento consumo de açúcar em *S. cerevisiae* (Espinosa Vidal, 2012)

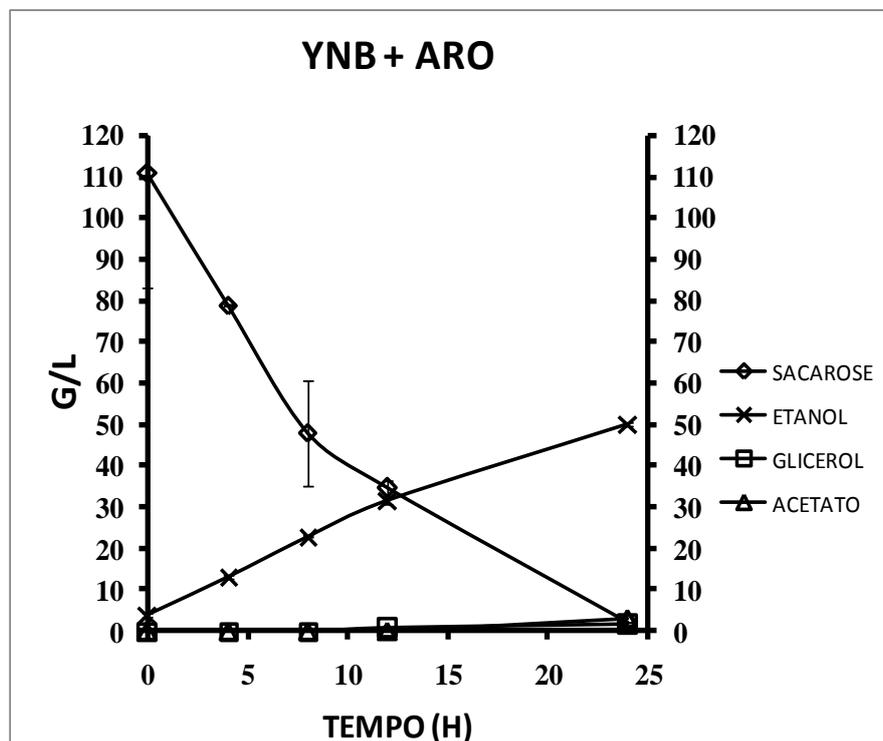


Figura 1. Parametros fisiologicos do cultivo em frasco de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio mineral contendo fenilalanina, triptofano e tirosina.

Um estudo de expressão gênica envolvendo *D. bruxellensis* mostrou a presença de dois genes *ARO10*, codificantes da enzima fenilpiruvato descarboxilase no genoma dessa levedura, uma característica única entre os hemiascomicetos (LIBERAL et al., 2012). Em células de *S. cerevisiae* esse gene (Fenilpiruvato descarboxilase) cataliza a descarboxilação do fenilpiruvato para o fenilacetaldéido, que é o segundo passo da via de Ehrlich, sendo assim, é possível que a levedura *D.*

bruxellensis produz níveis maiores do álcool 2-feniletanol, conhecido por ter uma aroma de rosas, sendo este altamente desejados nas bebidas alcoólicas. Entretanto a determinação desse álcool nesses ensaios fermentativos com a suplementação de aminoácidos aromáticos ainda será realizada.