

Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

*Monitoring the fermentation process for cachaça production using microbiological and physico-chemical methods with different *Saccharomyces cerevisiae* isolates*

Thaís Louise SOARES^{1*}, Cristina Ferreira SILVA¹, Rosane Freitas SCHWAN¹

Resumo

Com a crescente exigência do mercado consumidor por produtos de melhor qualidade, busca-se o constante aprimoramento da produção de cachaça, uma vez que todas as etapas da cadeia produtiva de bebidas fermento-destiladas são importantes. O objetivo deste trabalho foi acompanhar o processo de fermentação para produção de cachaça, utilizando diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* a partir da quantificação de metabólitos secundários por Cromatografia Gasosa. O acompanhamento do processo deu-se desde o preparo do inóculo até o final do processo fermentativo. O estudo foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados 8 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* inoculados em caldo de cana, dos quais foram retiradas amostras durante a fase de crescimento em sistema de batelada alimentada e fermentação. As amostras foram analisadas quanto à taxa de floculação, °Brix e álcoois superiores. Os parâmetros avaliados apresentaram diferenças para cada isolado. O melhor isolado para a produção de cachaça foi o isolado UFLA CA116 por apresentar alto número de células viáveis, maior taxa de floculação, ausência 1-propanol, presença de 1,3 butanediol.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; cromatografia gasosa; floculação.

Abstract

With the increasing demand from the consumer market for better quality products, constant improvement has been sought in cachaça production since all stages of the fermented-distilled beverage production chain are important. The objective of this study was to follow the fermentation process for cachaça production using different *Saccharomyces cerevisiae* isolates from the quantification of secondary metabolites by Gaseous Chromatography. The process was followed from the inoculate preparation to the end of the fermentation process. The study was carried out at the Federal University of Lavras (UFLA). Eight *Saccharomyces cerevisiae* isolates were used inoculated in sugar cane syrup, from which the samples were removed during the growth phase of the fed-batch and fermentation system. The samples were analyzed for flocculation rate, °Brix, and superior alcohols. The evaluated parameters presented differences for each isolate. The best isolate for the cachaça production was the isolate UFLA CA116 since it presented a high number of live cells, greater flocculation rate, no 1-propanol, and 1.3 butanediol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; gaseous chromatography; flocculation.

1 Introdução

O uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de produção de cachaça tem aumentado à produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores (PATARO et al., 2002). Essas linhagens selecionadas são competitivas e apresentam características mais desejáveis para a produção de cachaça. As leveduras para elaboração de bebidas fermentadas são selecionadas em laboratório a partir do isolamento de cepas que apresentaram sucesso em fermentações anteriores (PATARO et al., 2002).

A biodiversidade encontrada nas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, segundo Fiore et al. (2005), confirma a importância de verificar o potencial das leveduras selvagens na produção de bebidas. Tende-se a uma seleção e uso de cepas de leveduras

desejáveis para produções específicas acelerando a multiplicação celular e mantendo uma alta qualidade da bebida. Este estudo teve como objetivo observar o crescimento celular e a produção de metabólitos primários (etanol) e secundários (álcoois superiores, aldeídos e ésteres) de oito cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas e inoculadas para produção de cachaça.

2 Material e métodos

Foram utilizados 8 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de mosto para produção de cachaça sendo eles: UFLA CA116, UFLA CA1183, UFLA CA1162 pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), isolados de alambiques do sul de Minas Gerais, SA-1 (Usina 1 - Jaboticabal/SP), PE-2 (Usina 2 - Serrana/SP), BG-1 (Usina 3 - Lençóis Paulistas/SP), VR-1

Recebido para publicação em 19/3/2009

Aceito para publicação em 31/10/2009 (004115)

¹ Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, CP 37, CEP 37.200-000, Lavras - MG, Brasil, E-mail: thaistufla@yahoo.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

(Usina 4 - Morro Agudo/SP) e CAT-1 (Usina 5 - Ariranha/SP), pertencentes à Escola Superior de Agronomia Luiz Queiroz (ESALQ) Piracicaba/SP, Brasil. Os isolados foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de cultivo YW acrescidos de glicerol 20% e reativados separadamente em tubos de ensaio, onde foram incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

A avaliação do crescimento dos 8 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada em sistema de batelada alimentada com acréscimo sucessivo do °Brix do caldo (estéril) a cada alimentação. Iniciou-se utilizando caldo a $5\text{ }^{\circ}\text{Brix}$ e na última alimentação o caldo adicionado era de $10\text{ }^{\circ}\text{Brix}$.

Cada isolado foi cultivado em triplicata e utilizando a mesma variedade de cana para obtenção do caldo. A cada 12 horas amostras eram coletadas para avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos até que o número de células atingisse 10^8 cel.mL^{-1} , quando realizado método de Câmara de Neubauer (LEE; ROBINSON; WANG, 1981)

No processo fermentativo, o mosto previamente esterilizado foi ajustado para $16\text{ }^{\circ}\text{Brix}$ e 10% do volume de fermentação constituiu-se do inóculo previamente crescido como descrito anteriormente. Amostras para análises de compostos voláteis e não voláteis foram realizadas em 8, 16 e 24 horas. A avaliação do °Brix foi realizada utilizando um sacarímetro. Para as análises de álcoois superiores, aldeídos e ésteres, as amostras foram inicialmente centrifugadas ($10000\text{ g}/10\text{ minutos}$), filtradas e os extratos (mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analisados por cromatografia de fase gasosa de acordo com a metodologia de SOARES (2006). Para cálculo da taxa de floculação, foi utilizada a metodologia descrita por Calleja e Johnson (1976).

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Durante a avaliação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, os isolados UFLA CA116, UFLA CA1183, PE-2, SA-1 e VR-1 atingiram 10^8 cel.mL^{-1} em 24 horas, permanecendo com população constante até 84 horas. Opostamente, os isolados CA1162, BG-1 e CAT-1 atingiram 10^8 cel.mL^{-1} somente após 84 horas de cultivo.

O isolado UFLA CA116 apresentou $3,23\text{ }^{\circ}\text{Brix}$ ao término do crescimento, atingindo uma população de 10^8 cel.mL^{-1} em 84 horas. Os isolados UFLA CA1183, SA-1, PE-2 e VR-1 apresentaram comportamento semelhante, apresentando os menores valores de °Brix alcançados no final do crescimento (em torno de $1,76$ a $2\text{ }^{\circ}\text{Brix}$), com média de crescimento populacional de $8,83\text{ cel.mL}^{-1}$.

A partir das análises da taxa de floculação, foi observado que o isolado UFLA CA116 apresentou a maior taxa de floculação, atingindo valores de $0,408$ em 24 horas e $0,392$ em 84 horas de cultivo. De acordo com Souza e Mutton (2004), o procedimento analítico adaptado para determinar as taxas de floculação mostrou não depender das concentrações de leveduras contidas no meio fermentado, uma vez que os flocos são totalmente dispersos. As demais cepas testadas não ultrapassaram $0,2$ em 84 horas de cultivo.

Os resultados das análises dos compostos voláteis por cromatografia do período de crescimento celular encontram-se na Tabela 1.

A produção de acetato de etila foi observada somente nos isolados PE-2 e SA-1, sendo a maior concentração encontrada no último isolado.

Observou-se que a produção de acetaldeído apresentou a maior concentração (193 mL.L^{-1}) quando cultivado o isolado UFLA CA116. Este composto, embora normalmente encontrado em vinhos e destilados, pode produzir efeitos indesejáveis no aroma das bebidas (CURVELO-GARCIA, 1988). Aldeídos com até oito átomos de carbono têm aromas penetrantes e enjoativos, sendo, portanto, indesejáveis em bebidas. Quando presentes em excesso no produto final, podem provocar náuseas, vômitos, cefaleia, decréscimo da pressão cardíaca e taquicardia (LABIANCA, 1974).

O metabólito secundário 1-Hexanol foi encontrado em maior quantidade no isolado UFLA CA1162. Observou-se a presença de 1,3-Butanediol em todos os isolados analisados, porém em maior concentração no isolado PE-2 ($168,8\text{ mL.L}^{-1}$). A presença de 1-Propanol foi maior no isolado VR-1, e a maior quantidade de 2,3-Butanediol foi encontrada no isolado em BG-1. De acordo com BOZA e HORII (1998), a acidez e o teor de propanol influem negativamente no sabor da aguardente. A maior produção de etanol foi encontrada no isolado UFLA CA116 ($198,23\text{ mL.L}^{-1}$), isolado que se destacou também pela sua alta concentração de metabólitos importantes para o sabor da cachaça.

3.2 Avaliação da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação foi realizada durante 24 horas com cada isolado previamente multiplicado em caldo de cana. Após o período de fermentação, fez-se a contagem de células em Câmara de Neubauer e observou-se que a população de todos os isolados permaneceu em 10^8 cel.mL^{-1} e somente o isolado UFLA CA116 teve aumento da população de 1 log. Este isolado, como no período de crescimento, foi o que apresentou a maior taxa de floculação, atingindo valores de $0,167$. A floculação é uma característica importante para a produção da cachaça por que, ao terminar a fermentação, a sedimentação das leveduras facilita o processo de retirar o mosto para destilação e o reaproveitamento das células para a fermentação subsequente.

Os isolados UFLA CA116, UFLA CA1162, BG-1 e CAT-1 apresentaram, no final da fermentação, valores de °Brix maiores em relação aos outros isolados (em média $8,0\text{ }^{\circ}\text{Brix}$). A diluição do caldo de cana é realizada, uma vez que o teor elevado de açúcar no início da fermentação provocará estresse das células pela maior quantidade de etanol ao final da fermentação (SCHWAN et al., 2001).

De acordo com a Tabela 2 o isolado UFLA CA1183 foi o que produziu maior concentração de acetato de etila ($25,0\text{ mL.L}^{-1}$) composto presente quando utilizado o isolado UFLA CA116. A maior concentração de acetaldeído, durante a fermentação, foi de $428,2\text{ mL.L}^{-1}$ para o isolado PE-2. O metabólito secundário

Tabela 1. Concentração de metabólitos secundários produzidos por isolados de *Saccharomyces cerevisiae* após o crescimento em caldo de cana.

Isolados	Concentração (mL.L ⁻¹)					
	Acetato de etila	Acetaldeído	1 - Hexanol	1,3 - Butanediol	1 - Propanol	2,3 - butanediol
UFLA CA116	nd ¹	193,0	nd	47,0	nd	196,6
UFLA CA1162	nd	139,5	10,0	96,3	nd	191,6
UFLA CA1183	nd	94,7	nd	150,5	8,6	nd
BG-1	nd	122,0	nd	31,7	nd	198,2
CAT-1	nd	128,7	nd	107,1	5,3	nd
PE-2	14,3	132,2	nd	168,8	9,0	nd
SA-1	15,0	117,9	4,8	148,2	8,6	nd
VR-1	nd	92,7	nd	40,9	10,2	nd

nd: não detectado.

Tabela 2. Concentração de metabólitos secundários encontrados com os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação em caldo de cana.

Isolados	Concentração (mL.L ⁻¹)					
	Acetato de etila	Acetaldeído	1-Hexanol	1,3-Butanediol	1 - Propanol	2,3-butanediol
UFLA CA116	nd ¹	127,1	4,2	305,2	nd	192,9
UFLA CA1162	nd	125,1	nd	84,9	nd	191,7
UFLA CA1183	25,0	190,5	4,5	154,9	30,5	192,7
BG-1	nd	nd	20,2	58,0	nd	197,9
CAT-1	nd	112,8	nd	23,5	7,0	nd
PE-2	20,6	428,2	nd	77,3	21,4	nd
SA-1	21,3	254,6	nd	55,3	23,0	192,4
VR-1	24,0	312,3	nd	50,7	28,5	192,0

nd: não detectado.

1-Hexanol foi encontrado somente nos isolados UFLA CA116, UFLA CA1183 e BG-1, que apresentou a maior concentração. As concentrações de 1-Hexanol, durante a fermentação, foram diferentes do valor encontrado durante o crescimento dos isolados de diferentes origens de isolamento. A produção de álcoois superiores parece ser uma característica das leveduras em geral, e as quantidades produzidas variam com as condições de fermentação do gênero, espécie e, provavelmente, com a cepa utilizada (GIUDICI; ROMANO; ZAMBONELLI, 1990).

O álcool 1,3-butanediol, presente em todos os isolados estudados, apresentou a maior concentração no mosto fermentado com o isolado UFLA (305,2 mL.L⁻¹), quase 7 vezes a concentração obtida por esse isolado durante o crescimento. A produção de 1-propanol foi maior em relação aos outros isolados no UFLA CA1183 e a produção do álcool 2,3 butanediol no isolado BG-1.

Segundo Yokoya (1995), a formação de álcoois superiores é maior quando o fermento apresenta atividade biológica fraca, ocasionando demora no processo fermentativo. Teores elevados de álcoois superiores totais têm origem nas condições em que se realizou o processo fermentativo, pois a presença em excesso de borras ao longo da fermentação alcoólica provoca um aumento de até 50% no teor de álcoois superiores, com exceção do álcool n-propílico, que depende de outros fatores (DALLA COSTA, 2002).

A produção de etanol do isolado UFLA CA116 foi constante, atingindo 168,57 mL.L⁻¹, enquanto os outros isolados apresentaram uma produção variável de etanol.

Estudos prévios foram realizados onde se utilizam técnicas moleculares (ARAUJO et al., 2007): uma delas de análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA-RFLP) para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* encontradas no início e no final da fermentação, verificando a persistência das linhagens selecionadas. Outros resultados obtidos pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) mostraram resistência à competição dessas leveduras em relação a outros micro-organismos e aumento da produtividade do alambique, que melhorou consideravelmente a qualidade do produto final (GOMES et al. 2009). Serão realizados também outros estudos complementares a este.

4 Conclusões

Concluiu-se que os diferentes isolados de *S. cerevisiae* apresentaram diferenças na produção de metabólitos secundários, durante o crescimento e fermentação em caldo de cana. O melhor isolado para a produção de cachaça foi o isolado UFLA CA116 por apresentar alto número de células viáveis, maior taxa de floculação, não produzir 1-propanol, maior presença de 1,3 butanediol e menor produção de acetaldeído na fermentação.

Referências bibliográficas

ARAUJO, R.C.A. et al. Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 217-223, apr./jun. 2007.

- BOZA, Y.; HORRI, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 391-396, out./dez. 1998.
- CALLEJA, G. B.; JOHNSON, B. F. A comparison of quantitative for measuring yeast flocculation **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 23, n. 1, p. 68-74, jan./feb. 1976.
- CURVELO-GARCIA, A. S. **Controle de qualidade dos vinhos**. Lisboa: Instituto da Vinha e do Vinho, 1988. Química Enológica. 245 p.
- DALLA COSTA, E. R. **Perfil analítico das aguardentes produzidas na região central do Rio Grande do Sul, Santa Maria**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- FIORE, C. et al. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, n. 6/7, p. 1141-1147, oct. 2005.
- GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 61-64, jan. 1990.
- GOMES, F. C. O. et al. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. **Informe Agropecuário - Agronegócio da cachaça**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 25-31, jan./fev. 2009.
- LABIANCA, D. C. Acetaldehyde Syndrome and Alcoholism. **Analyst**, v. 47, p. 21, 1974.
- LEE, S.; ROBINSON, F.; WANG, H. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, n. 11, p. 641-649, 1981.
- PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.
- SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, jan. 2001.
- SOARES, T. L. **Álcoois, ésteres e aldeídos produzidos por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- SOUZA, M. A. C. E.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 893-898, jul./ago. 2004.
- YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995. 87 p.