

**ÁLCOOIS, ÉSTERES E ALDEÍDOS
PRODUZIDOS POR DIFERENTES ISOLADOS
DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

THAÍS LOUISE SOARES

2006

THAÍS LOUISE SOARES

**ÁLCOOIS, ÉSTERES E ALDEÍDOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES
ISOLADOS DE *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Soares, Thaís Louise.

Alcoóis, ésteres e aldeídos produzidos por diferentes isolados de
Saccharomyces cerevisiae / Thaís Louise Soares. – Lavras: UFLA, 2006.
75 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2006.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Fermentação. 3. Cromatografia líquida
de alta eficiência (CLAE). 4. Caldo de cana. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 663.13

THAIS LOUISE SOARES

**ÁLCOOIS, ÉSTERES E ALDEÍDOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES
ISOLADOS DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de “Mestre”.

Aprovado em 04 de Agosto de 2006

Prof. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada UEM

Prof. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

A Deus, por me ensinar a viver.

Aos meus amados e queridos pais, Orlando e Cleusa, pela vontade em
minha criação e proteção.

À minha irmã, Thalita Maris Soares, pela companhia nesses anos de
estudo e dedicação.

OFEREÇO

“... Os grandes navegadores devem sua reputação
aos temporais e tempestades..”

À memória de meu avô, Sebastião Silvestre, minha doce avó Maria
da Glória Benassi Soares e à minha querida amiga Mariana Baute,
dos quais sinto muita falta.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela formidável experiência e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Aos professores Eustáquio e Romildo.

Ao Flávio pela ajuda nas análises cromatográficas.

À Vany pelo apoio e conhecimento transmitido.

Aos funcionários Ivani, Magda, Rosângela, Erondina, Rafaela e Zélia, pelo apoio.

Ao casal João Borges e Débora, obrigada pelos anos de convivência, pela amizade, carinho e ajuda.

À amiga Cidinha, pelo carinho, atenção e amizade.

Aos estagiários, Elida, Sidney, Whasley, Ana Paula, Karini, Daniela, Caio e Mayara.

Aos amigos de mestrado, pela convivência, Gisele, Mirian, Sandra, Taís, Nina, Félix, Rômulo, Evânia, Disney, Euziclei, Aramália, Fernanda e Márcio.

Aos meus avós, Matilde Santos e Orlando Soares pelo amor e dedicação.

Meninas da república pela amizade e força.

Ao meu amor, pela companhia e carinho.

A todos que deixei de citar, mas que durante toda minha jornada estarão guardados em meu coração, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Histórico	03
2.2 Bebidas Alcóolicas Fermentadas.....	04
2.3 Bebidas alcóolicas fermento-destiladas.....	06
2.3.1 Cachaça	07
2.3.1.1 Matéria-prima: Cana-de-açúcar.....	07
2.3.1.2 Produção.....	08
2.4 Leveduras selecionadas	10
2.5 Metabólitos secundários	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Microrganismos	17
3.2 Cana-de-açúcar	17
3.3 Avaliação do crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	17
3.4 Processo fermentativo	19
3.4.1Preparo do inóculo.....	19
3.5 Análises químicas realizadas.....	20
3.5.1 Avaliação do °Brix e acidez titulável	20
3.5.2 Álcoois superiores, aldeídos e ésteres	20
3.5.3 Etanol.....	22

3.6 Floculação	22
3.7 Análise Estatística	23
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	24
4.1 Crescimento dos isolados <i>S. cerevisiae</i>	24
4.2 Metabólitos produzidos durante o crescimento.....	30
4.3 Fermentação dos isolados <i>S. cerevisiae</i>	38
4.4 Metabólitos produzidos durante a fermentação.....	44
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Cromatograma dos padrões utilizados utilizando tempos de retenção onde: 1,6: Acetaldeído; 2,3: Acetato etila; 2,5: Metanol; 3,1: Etanol; 4,6: 1-Propanol; 6,0: Isobutanol; 6,9: Butirato propila; 7,0: Acetato isoamila; 8,0: 1-Butanol; 11,3: Isoamílico; 14,1: Amílico; 18,3: 1-Hexanol; 22,5: 2,3 Butanediol e 26,2: 1,3-Butanediol.....	21
FIGURA 2	Curva de crescimento de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em caldo de cana a 5°Brix a 28°C. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	25
FIGURA 3	Taxa de floculação dos isolados <i>S. cerevisiae</i> durante crescimento em caldo de cana 5°B. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	26
FIGURA 4	Sólidos solúveis totais (°Brix) em caldo de cana (5°Brix) inoculado com os isolados <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante crescimento. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix	28
FIGURA 5	Acidez titulável em caldo de cana inoculado com os isolados <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante 84 horas de cultivo. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	30
FIGURA 6	Acetaldeído durante crescimento de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . * Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	34
FIGURA 7	2,3-butanediol durante crescimento de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . * Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	36
FIGURA 8	1-Propanol durante crescimento de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	37
FIGURA 9	Etanol durante crescimento dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> em caldo de cana a 5°Brix. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix.....	38
FIGURA 10	Curva de crescimento de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em caldo de cana a 10°Brix durante fermentação..	39
FIGURA 11	Taxa de floculação dos isolados <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante fermentação.....	41
FIGURA 12	Concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) em caldo de cana inoculado com os isolados <i>S. cerevisiae</i> durante fermentação.....	42

FIGURA 13	Acidez titulável em caldo de cana inoculado com os isolados <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante fermentação.....	43
FIGURA 14	Acetaldeído durante fermentação dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em caldo de cana.....	48
FIGURA 15	1,3-Butanediol durante fermentação de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
FIGURA 16	2,3-Butanediol durante fermentação de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
FIGURA 17	1-Propanol durante fermentação dos isolados de <i>S. cerevisiae</i>	52
FIGURA 18	Acetato de etila durante fermentação dos isolados de <i>S. cerevisiae</i>	54
FIGURA 19	Etanol durante fermentação dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55

RESUMO

SOARES, Thaís Louise. **Álcoois, ésteres e aldeídos produzidos por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

No Brasil existem poucos estudos sobre a qualidade da aguardente de cana de açúcar, porém, devido às exigências do mercado externo, a qualidade do produto passou a ser essencial. Geralmente, todas as etapas da cadeia produtiva de bebidas destiladas são determinantes e podem influenciar o desenvolvimento de aromas/sabor de bebidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar por cromatografia gasosa a produção de alguns metabólitos secundários de cada isolado, durante seu crescimento e fermentação, quantificando álcoois superiores, aldeídos e ésteres no caldo de cana. O estudo foi conduzido no laboratório de Microbiologia nas dependências do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados 8 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* inoculados em caldo de cana, de onde foram retiradas amostras, durante o crescimento a 5°B e fermentação 10°B, em sistema de batelada alimentada. Amostras foram analisadas quanto à taxa de floculação, °Brix, acidez titulável, álcoois superiores: metanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, isoamílico, amílico, 1-hexanol, 2-3 butanediol e 1-3 butanediol, e ésteres: acetato de etila, acetato de isoamila e butirato propila; e aldeído: acetaldeído. No final do crescimento, a menor taxa de floculação foi encontrada no isolado CAT-1. A maior de acidez titulável foi encontrada no isolado PE-2. A menor concentração de acetaldeído foi encontrada em VR-1 e 1,3-butanediol foi maior em PE-2, o 1-propanol ocorreu em menor concentração em CAT-1. No final da fermentação, a maior taxa de floculação foi encontrada em UFLA CA1162, a qual, também, apresentou maior porcentagem de acidez titulável. O menor °Brix foi encontrado no isolado VR-1, a menor concentração de acetaldeído ocorreu no isolado UFLA CA1162 e a maior em 1,3-butanediol no isolado UFLA CA116. O 1-Propanol teve sua concentração menor em CAT-1 e o acetato de etila com maior concentração no isolado UFLA CA1183. Com o isolado VR-1 obteve-se a maior concentração de etanol no final da fermentação. 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, presença de 1,3 butanediol e produção média de acetaldeído em relação aos outros isolados.

* Comitê Orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada (UEM) e Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli.

ABSTRACT

SOARES, Thaís Louise. **Alcohols, esters and aldehydes produced by different *Saccharomyces cerevisiae* isolates**. 2006. 75 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

In Brazil, there are few studies on the quality of sugar cane aguardente, but due the demands of the external market, product quality become an important aspect of the production chain. Generally, all stages of the distilled beverage preparation can influence flavor development. The objective of this study was to evaluate by GC the production of some secondary microbial metabolites of each isolate during growth and fermentation. Higher alcohol, aldehydes and esters in the sugar cane broth were quantified. Study was conducted in the Microbiology Laboratory in the Biology Department of the Federal University of Lavras (UFLA), where 8 isolates of *Saccharomyces cerevisiae* were used to inoculate sugar cane broth. From which samples were taken during growth to 5°B and fermentation 10°B, in a fed batch system. The following were analyzed: flocculation, °Brix, pH, tritritable acidity, higher alcohol: methanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, isoamílico, amylic, 1-hexanol, 2-3 butanediol and 1-3 butanediol, and the esters ethyl acetate, isoamyl acetate and propyl butyrate; and aldehyde: acetaldehyde. At the end of growth, the lowest flocculation rate was found in the CAT-1 isolate. The highest percentage of tritritable acidity was found in the PE-2 isolate. The isolated CA116 isolate presented the lowest pH. The lowest acetaldehyde concentration was found in VR-1; 1,3-butanediol was higher in PE-2, 1-propanol occurred in lower concentration in CAT-1. At the end of fermentation the highest flocculation rate was found in CA1162, that also presented greater percentage of tritritable acidity. The lowest °Brix was found in the VR-1 isolate, while the lowest pH was found in CAT-1. The lowest acetaldehyde concentration occurred in the CA1162 isolate. The highest concentration in 1,3-butanediol in the CA116 isolate, The lowest 1-Propanol lesser concentration was detected in CAT-1 and the highest concentration of ethyl acetate in the CA1183 isolate. The highest concentration of ethanol was detected in the VR-1 isolate at the end of fermentation. It was concluded that the UFLA CA116 isolate was best for cachaça manufacture.

* Orienting committee: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Adviser), Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada (UEM) and Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, existem poucos estudos sobre a qualidade da aguardente de cana-de-açúcar, no entanto a demanda pelo produto no mercado internacional é crescente da mesma maneira que se busca aprimorar os atributos relacionados com a qualidade. Geralmente, todas as etapas do preparo de bebidas destiladas e suas particularidades podem influenciar o desenvolvimento de aromas/sabor (Cardello & Faria, 1998).

Esse agronegócio envolve 400.000 trabalhadores e agrega por volta U\$\$ 1 bilhão por safra (Amorim, 2005). É importante salientar que, no Brasil, nos últimos 10 anos a cachaça tem atingido todas as classes sociais e o seu consumo tem sido associado aos hábitos mais refinados o que alavanca a demanda por pesquisa (Vasconcelos, 2003).

A necessidade de um produto competitivo e que atenda às novas exigências do mercado tem atraído investimentos para o setor de cachaça buscando estimular a qualidade e a elitização do consumo. O estado de Minas Gerais tem investido na produção de cachaça artesanal de alambique e vem conseguindo agregar qualidade a esse produto (Carvalho, 2004).

O uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de produção de cachaça tem aumentado a produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente, em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores. Essas linhagens selecionadas são competitivas, tornam possível a fermentação e evitam problemas com contaminações. As leveduras para elaboração de bebidas fermentadas são obtidas de isolamento de cepas que apresentam sucesso em fermentações anteriores, as quais são selecionadas em laboratório (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. A tendência é dirigida mais e mais à seleção e ao uso das leveduras exclusivas para produções específicas, aceleram a multiplicação celular e mantêm a alta qualidade da bebida.

Este estudo teve como objetivo observar o crescimento celular na produção de metabólitos primários (etanol) e secundários (álcoois superiores, aldeídos e ésteres) de oito cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

A destilação foi uma das tecnologias desenvolvidas pelos alquimistas alexandrinos. Tal consideração baseia-se nos estudos realizados sobre os textos produzidos na Antigüidade que chegaram até os dias de hoje. A destilação, também, era utilizada em manufaturas, como, por exemplo, na preparação de perfumes, arte para a qual os árabes muito contribuíram. Havia grandes centros de onde eram extraídos os aromas de rosas, violetas, jasmims e de outros materiais. Para isso, as flores eram maceradas em água e, em seguida, esse material era destilado (Beltran, 1996).

Não se sabe ao certo quando teve início o processo de fabricação de bebidas alcoólicas. Quanto ao álcool, dados relatam que os árabes foram os seus descobridores em meados do século X, supondo que eles criaram os termos álcool e alambique. As primeiras menções sobre álcool na Europa datam do século XII (Pataro et al., 2002).

A destilação iniciou na França e foi para Itália, onde foi realizado esse processo em fermentado de uva, que ficou conhecido como Grappa. O destilado da cevada, em terras escocesas ficou conhecido como o popular Uísque. Nomeiam-se os destilados de acordo com a regionalidade, ex: Rússia (vodka de centeio); China e Japão (sakê do arroz); Portugal (bagaceira do vinho de uva). Do Oriente Médio até o Extremo Oriente, o destilado era importante, pois, não havia fabricação de vinho, o qual aquecia as pessoas do frio (Pataro et al., 2002).

A aguardente de cana surgiu nos primórdios de nossa colonização, logo que os canaviais foram plantados e os engenhos de açúcar passaram a moer cana. Desde então, a importante participação em nossa economia quer como fonte de renda para meeiros e arrendatários ou como moeda para

contrabandistas, que a trocavam por escravos na costa africana no denominado comércio triangular (Bizelli et al., 2000).

A cachaça foi a mais importante bebida alcoólica importada pela costa ocidental da África, sendo largamente utilizada por comerciantes brasileiros para conseguir escravos (Simas, 2003). Com o passar do tempo, as técnicas de produção foram aprimoradas. Dessa forma, a cachaça saiu gradativamente das senzalas dos escravos para a mesa dos senhores do engenho (Amorim, 2005). Hoje, várias marcas de alta qualidade do produto figuram no comércio nacional e internacional e estão presentes nos melhores restaurantes e adegas residenciais pelo Brasil e pelo mundo.

A tradição secular de alguns alambiques contrasta com a evolução tecnológica de outros. Devido a uma série de fatores, pouco se fez nas últimas décadas no sentido do desenvolvimento de novas tecnologias de produção. Em geral, a aguardente artesanal vem sendo produzida, a partir de antigas receitas familiares, passando por várias gerações muitas vezes não garantindo a manutenção das especificações exigidas e por Ministério da Agricultura. Por outro lado, a maioria dos equipamentos utilizados não apresentaram inovações suficientes que viessem garantir as devidas correções do processo, o que seria fundamental para levar a certa padronização da aguardente bem como a maiores ganhos de produtividade e qualidade (Martinelli et al., 2000).

2.2 Bebidas alcoólicas fermentadas

As bebidas alcoólicas são tão antigas quanto a humanidade e numerosas como suas etnias. É interessante lembrar que, apesar do antigo conhecimento sobre as bebidas alcoólicas, há pouco mais de um século ocorreu a descoberta do fundamental papel microbiano em sua obtenção (Aquarone, 2001).

A fermentação é definida como reação espontânea de um corpo orgânico, pela presença de um fermento que o decompõe. É a transformação do

açúcar de certas substâncias em álcool etílico e anídrico carbônico com desprendimento de calor. É um processo gerador de ATP em que compostos orgânicos agem tanto como doadores quanto aceptores de elétrons. A fermentação alcoólica começa com a glicólise em que uma molécula de glicose obtém duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. Na reação seguinte as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas a duas moléculas de acetaldeído as quais são reduzidas a duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol. A fermentação alcoólica é um processo de baixo rendimento energético, porque a maioria da energia contida na molécula de glicose original permanece no etanol, o produto final (Tortora et al., 2000; Stryer, 1996).

Dentre as bebidas fermentadas, podemos citar a cerveja, que é produzida a partir do amido de cereais fermentados por leveduras. Como as leveduras são incapazes de usar o amido diretamente, esse deve ser convertido em glicose e maltose, os quais podem ser fermentados pela levedura com produção de etanol e dióxido de carbono. Nessa conversão, denominada, malteação, os cereais contendo amido, como a cevada, são colocados para germinar, depois são secos e macerados. Esse produto, denominado malte, possui enzimas degradadoras de amido (amilases) que convertem os amidos dos cereais em carboidratos que podem ser fermentados por leveduras (Tortora et al., 2000).

Outra bebida alcoólica fermentada de grande importância econômica é o vinho, que é obtido, genericamente, pela fermentação alcoólica de um suco de uva natural madura (*Vitis vinifera*). Normalmente os vinhos têm uma concentração alcoólica de 10 a 13%, v/v ou gay-Lussac (Aquarone, 2001). Vinhos elaborados com outras frutas devem, obrigatoriamente, pela legislação brasileira, serem rotulados com a denominação vinho acompanhado do nome da fruta que lhe deu origem. Assim vinho de laranja, vinho de pêra e outros (Hashizume, 2001).

2.3 Bebidas alcoólicas fermento-destiladas

Nas bebidas destiladas como uísque, vodka e rum, carboidratos de cereais, batata e melado são fermentados até álcool que, por sua vez, é destilado para produção de bebidas alcoólicas concentradas (Tortora et al., 2000).

No decorrer da destilação de cachaça, efetua-se o fracionamento da bebida em “cabeça”, “coração” e “cauda”. O primeiro destilado, que representa 10% da produção, contém componentes indesejáveis (aldeídos, ésteres e álcoois superiores) que são mais voláteis que o álcool e é recolhido em separado. Em outro recipiente, obtém-se a fração principal: o “coração”, que é controlada pelo teor alcoólico (em torno de 45% em média) o qual resulta na cachaça com teor alcoólico entre 38 e 48°. Os produtos menos voláteis que o álcool etílico são obtidos na última porção de destilação, chamada de cauda ou “água fraca”, como compostos fenólicos e ácidos orgânicos (Amorim, 2005; Yokoya, 1995).

O uísque pode ser de fato considerado como produto de destilação inesperado da cerveja. Uísques diferem basicamente na natureza e proporção de cereais usados como material e no tipo de processo de destilação (Lyons & Rose, 1977).

Geralmente, todas as etapas do preparo de bebidas destiladas são determinantes e podem influenciar o desenvolvimento de aromas/sabor. Um grande número de reações químicas e bioquímicas produz compostos fixos e voláteis, simultaneamente com a degradação de polissacarídeos por meio de enzimas e através da fermentação de hexoses pelas leveduras. Muitos desses compostos agem posteriormente, como produtores de sabor, no produto final, após o envelhecimento (Cardello & Faria, 1998).

2.3.1 Cachaça

A cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, pelo Decreto nº 2314 de 04/09/1997, artigo 91, com

gradação alcoólica de 38% a 48% (v/v). É obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar a 20°C, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose (Brasil, 1997). No Brasil estima-se uma produção de $1,3 \times 10^9$ L por ano (Oliveira et al., 2005a).

A qualidade da cachaça pode ser influenciada por diversos fatores, como matéria prima, fermentação, destilação e envelhecimento. A fermentação é considerada o ponto crítico do processo de fabricação, uma vez que os compostos formadores de aroma que caracterizam a bebida são formados nessa etapa (Carvalho, 2004).

2.3.1.1 Matéria-prima: Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à classe das Monocotiledôneas, família Poaceae (Gramíneas), do gênero *Saccharum ssp* (Oliveira, 2000), e possui a característica de adaptar-se perfeitamente a climas tropicais e subtropicais (Andrade, 2003).

A cana - de - açúcar foi introduzida na China antes do início da era cristã e, na Europa pelos árabes, sendo que no século XIV já era cultivada em toda região mediterrânea. A guerra entre Veneza, que monopolizava o comércio do açúcar, e os turcos levou à procura de outras fontes de abastecimento, e a cana começou a ser cultivada na Ilha da Madeira (Portugal) e nas Canárias pelos espanhóis. O descobrimento da América permitiu extraordinária expansão das áreas de cultura da cana. As primeiras mudas trazidas da Ilha da Madeira chegaram ao Brasil em 1502, e, logo em 1550, numerosos engenhos espalhados pelo litoral produziam açúcar de qualidade equivalente ao produzido pela Índia (Larousse, 1998).

De acordo com Schwan & Castro (2003), o caldo de cana é normalmente constituído de 65-75% de água, 11-18% de açúcares (sacarose,

glicose e frutose), pequenas quantidades de substâncias nitrogenadas, pentosas, ceras, lipídeos, pectinas, matérias corantes (clorofila, antocininas e compostos polifenólicos) e sais minerais. Apresenta pH ácido que pode variar de 4,8 a 6,0, tendo, em média, pH entre 5,0 e 6,0. Essas características fazem do caldo de cana-de-açúcar um meio excelente para o desenvolvimento de microrganismos.

Após a colheita, a cana-de-açúcar deve ser moída o mais rápido possível, preferencialmente no mesmo dia, pois, quanto maior o intervalo entre o corte e a moagem, maiores os riscos de deterioração física, química, enzimática ou microbiana, que prejudicam a fermentação, o rendimento e a qualidade do produto (Lima et al., 2001).

2.3.1.2 Produção

Na manufatura de bebidas alcoólicas fermento-destiladas por destilação de vinhos, a operação de destilação é um dos pontos determinantes da qualidade do produto final (Boza & Horri, 1998).

O processo produtivo industrial é realizado em grandes empresas e as cachaças obtidas apresentam padrão relativamente uniforme de qualidade. No processo artesanal, as cachaças são elaboradas em pequena escala de acordo com as tradições (Lima & Nóbrega, 2004).

O alambique de cobre, as técnicas de envelhecimento na madeira, o uso do fubá para a fermentação e a seleção da cachaça considerada nobre, durante a destilação, são algumas das tradições às quais os produtores fazem questão de se manterem fiéis. A crescente demanda interna e externa, porém, exigiram que o setor se profissionalizasse e o uso de novas tecnologias tornou-se imprescindível. O aprimoramento da produção e comercialização da cachaça, antes feita em pequena escala, nos fundos de quintal, é hoje uma necessidade na corrida pela conquista do mercado, principalmente, no exterior (Nogueira, 2001)

O pé - de - cuba selvagem para a produção do cachaça é preparado com uma mistura do milho, de limões, do arroz e de amido como fontes dos substratos suplementares e a fermentação espontânea na sala de temperatura por 12-24 h. O caldo de cana é adicionado, então, até que esteja submerso e descanse por mais 24 h. Uma quantidade nova de caldo de cana é adicionada quando a liberação do CO₂ indica a atividade fermentativa pelas linhagens de leveduras naturalmente atuais no caldo de cana é observada; a mistura é deixada no descanso por 24 h mais uma vez. Esse procedimento é repetido até que um volume que corresponde a 20% do volume do substrato a ser fermentado nas dornas esteja obtido. Assim, o fermento aumenta bastante para iniciação da fermentação (Vicente et al., 2006).

Uma boa cachaça é definida no processo de fermentação, pois, é nele que são formados todos os compostos. O ciclo fermentativo, após a adição do fermento ao caldo de cana, dura em média 24 horas e, normalmente, o mesmo fermento é utilizado em toda a safra. As linhagens selecionadas têm conseguido dominar a fermentação por um período que varia de 20 a 30 dias, sendo então substituídas pelas leveduras selvagens presentes na destilaria. Isso significa que, utilizando linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* e trocando periodicamente o fermento, pode-se manter o mesmo padrão de qualidade ao longo da safra e entre safras diferentes (Nogueira, 2001).

Em 2001, a equipe coordenada pelo Prof^o Luiz Carlos Basso (ESALQ/USP) voltou a estudar um tema já tratado anteriormente: os efeitos dos níveis de fermento adicionado ao processo para produção de álcool etílico (combustível). Trabalhando com resultados obtidos nos experimentos realizados na unidade piloto da Usina *da Pedra*, estimou-se, em torno de 10% uma quantidade ótima para obtenção de maior rendimento na fermentação (Amorin, 2005).

Embora a definição da alta qualidade seja propensa à preferência pessoal, há determinado requerimento legal para ser cumprido e algumas normas para serem seguidas para assegurar qualidade dos destilados. Não obstante, obedecer a todas essas normas na produção não garante necessariamente a alta qualidade e sucesso comercial do produto.

Atualmente, a cachaça passa por um momento de valorização de milhões de dólares ao ano. Segundo o Instituto Brasileiro de Cachaça de Alambique, de 1,3 bilhões de litros de aguardente produzidos ao ano, um bilhão é cachaça industrial, feitas em destilarias, e 300 milhões são fabricadas por um exército de 30 mil produtores, em pequenos alambiques.

A exportação da cachaça em 2006 registrou um crescimento de 15% em relação a 2005. De acordo com levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), a exportação do produto vem crescendo a cada ano.

2.4 Leveduras selecionadas

A qualidade da bebida é diretamente dependente do atributo levedura que ajuda a estabelecer uma rápida dominância numérica nas primeiras fases da fermentação e determina a habilidade para condução e fermentação eficientes com desejado nível açúcar residual desprezível. Na fermentação espontânea, várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* competem entre si e com linhagens não-*Saccharomyces*. A capacidade de selecionar linhagem da *S. cerevisiae* para dominar fermentação, entretanto, depende de características de não-*Saccharomyces* e leveduras *Saccharomyces* presentes naturalmente na biota (Lopes et al., 2002).

Muitos fatores afetam a ecologia microbiana da produção de vinho, inclusive a composição química do suco de uva e os processos de fermentação são os mais significativos. Em ecossistema microbiano complexo, contendo

misturas das espécies e das linhagens diferentes, há a possibilidade das interações ocorrerem entre microorganismos individuais que determinará, também, a ecologia final (Fleet, 2003).

O comportamento de diferentes leveduras, em função da concentração do açúcar e da diversidade de significância, encontrou, nos parâmetros, níveis considerados vantajosos ao usar as linhagens de leveduras para tequila e outras bebidas, sugerindo que as pesquisas devem ser dirigidas para um programa de seleção das linhagens que possuam características apropriadas e desejáveis. Em particular, a seleção de linhagens específicas para a fermentação deve ser executada em função das características do material bruto, a fim de tomar a vantagem principal da combinação de linhagens da fermentação substrato/levedura (Arrizon et al., 2005).

De acordo com Romano et al. (1998a), durante a avaliação sensorial, as linhagens das leveduras tiveram sutis, porém definitiva influência no sabor e aroma. De fato, diferentes linhagens de *S. cerevisiae* produzem diferentes quantidades de componentes secundários, que podem determinar sabor desejável ou indesejável, afetando a qualidade produto final.

O uso de fermentos secos para inocular está transformando-se em uma prática comum na maioria de regiões produtoras de vinhos. A inoculação de uma população grande de linhagens *S. cerevisiae* podia inibir o crescimento de outras linhagens de *Saccharomyces* e, também, espécie do *non-Saccharomyces*. Essa inoculação limita o crescimento de fermentos selvagens (Santamaría et al., 2005).

De acordo com Pozo-Bayón (2003), os compostos voláteis podem ter maior influência na qualidade final dos vinhos. Com o progresso da tecnologia de bebidas, as linhagens de levedura foram sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo e ao produto.

Vários são os fatores limitantes para as leveduras durante a fermentação, etanol, pH, oxigênio e nutrientes. Na seleção de linhagens, são eliminadas as linhagens de *S. cerevisiae* que são menos eficientes na produção de álcool e outros metabólitos secundários.

De acordo com resultados apresentados por Berthels et al. (2004), o nitrogênio assimilado é um nutriente essencial, sendo crítico na eficiência da fermentação e geralmente torna-se limitante durante a fermentação. A fonte de nitrogênio esgotada, em combinação com o rápido movimento de transporte de açúcar na fase estacionária, são responsáveis pela inativação de sistema de transporte açúcar e redução subsequente na fermentação observada em direção à fase final. Duas principais fontes de compostos de nitrogênio assimilado em leveduras são aminoácidos e íons amônia. Íons de amônia constituem uma larga porcentagem de nitrogênio assimilado total (acima de 40%), enquanto prolina e arginina são mais comuns em compostos nitrogenados em suco de uva (30-65% do total de aminoácidos). *S. cerevisiae* é capaz de usar diferentes fontes de nitrogênio para seu crescimento, porém, nem toda fonte de nitrogênio mantém o crescimento igualmente bom. *Saccharomyces cerevisiae* utiliza uma fonte de nitrogênio melhorando seu crescimento por mecanismo chamado Repressão Catabólica Nitrogênio (NCR). Uma condição reprimida de nitrogênio, através da fermentação, modifica a captação de amônia e aminoácidos, modo esse de captação diferente que pode determinar a produção de importantes metabólitos secundários (Beltran et al., 2004).

Embora o etanol seja o principal produto na fermentação do mosto, essa produção pode ser inibitória para as células e o maior fator de estresse durante a fermentação. O etanol inibe, principalmente, a propriedade de desnaturação protéica da bicamada fosfolipídica da membrana, como também das enzimas intracelulares e estruturais. O alto nível de etanol geralmente inibe a utilização de açúcar, porém, com um efeito diferencial na utilização de glicose e frutose. O

sistema de utilização de glicose parece ser mais tolerante a altas condições de estresse ao etanol (Berthels et al., 2004). A suplementação de nutrientes, no meio fermentativo, não aumenta a tolerância fermentativa das leveduras ao etanol, mas aumenta o nível de síntese de massa celular acima daquela observada em mosto não suplementado (Peisino, 1986).

A utilização de linhagens selecionadas com tais habilidades pode beneficiar a indústria brasileira da cachaça, contribuindo para a redução dos custos de produção por menor tempo de fermentação e de uma separação mais fácil das células de leveduras do mosto fermentado no fim do processo de fermentação e aumentando os níveis dos compostos de sabor desejados na bebida (Vicente et al., 2006).

2.5 Metabólitos secundários

Os microrganismos, na fermentação industrial, produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são formados ao mesmo tempo em que as células e a curva de produção seguem a curva de crescimento celular, quase em paralelo, com um atraso mínimo. Já os metabólitos secundários não são produzidos até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado sua fase estacionária. Esses podem ser uma conversão microbiana de um metabólito primário ou um metabólito do meio original de crescimento que o microrganismo produz somente depois que um número considerável de células e metabólitos primários tenha sido acumulado (Tortora, 2000).

A fermentação alcoólica do caldo de cana de açúcar produz álcool etílico em maior quantidade e muitos outros compostos secundários, tal como aldeído, metanol, álcoois superiores, ácidos e ésteres. A natureza e a qualidade desses componentes dependem do material bruto, fermentação, destilação e envelhecimento (Dato et al., 2005; Estévez et al., 2004).

De acordo com Amorim (2005), estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação, sendo que o restante, 95%, resultam no rendimento em etanol.

O maior desafio para o tecnologista de bebidas é a definição da composição química do produto final. O conhecimento das substâncias responsáveis pelo sabor e por outras características das bebidas, precisa ser elucidado. Tais substâncias encontram-se em quantidades mínimas, dificultando seu isolamento, caracterização e quantificação e sem o conhecimento delas torna-se muito difícil modificar as características e/ou controlar a qualidade do produto (Boza & Horii, 1998).

A qualidade físico-química da aguardente de cana no Brasil é regulamentada pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 1997), que estabelece limites para diversos parâmetros (gradação alcoólica, acidez volátil, ésteres, álcoois superiores, aldeídos, furfural, metanol e cobre).

A análise descritiva quantitativa de metabólitos secundários tem sido bastante empregada para caracterização dos atributos sensoriais de alimentos e bebidas (Jerônimo et al., 2004).

A quantidade de álcoois superiores nos vinhos varia segundo as cepas de leveduras, a temperatura de fermentação, a aeração, a quantidade de nutriente e o pH baixo (3,5 - 4,0) do mosto. A cana armazenada após o corte para depois ser moída também é responsável pelos altos teores de álcoois superiores (Ough, 1996; Cardoso, 2006).

Os álcoois superiores são precursores importantes na formação de ésteres, os quais são associados ao aroma agradável. Isso pode ser produzido durante a fermentação alcoólica com conversão da cadeia de aminoácidos ramificada presente no meio (valina, leucina, isoleucina, tereonina e felanina) ou produção de novo substrato de açúcar (Clement-Jimenez et al., 2005). De acordo

com Oliveira et al. (2005a), há importância do etanol contido no vinho de caldo de cana na concentração de compostos secundários na cachaça.

Outros componentes voláteis, tal como ésteres, aldeídos e álcoois superiores, presentes no mosto, depois da fermentação, são importantes na qualidade final das bebidas destiladas (Schehl et al., 2005). A natureza e composição desses componentes voláteis dependem das características do material bruto, das cepas das leveduras, do processo de fermentação e destilação (Dato et al., 2005).

O metanol é um constituinte naturalmente presente nas bebidas alcoólicas, em quantidades inferiores aos demais componentes. O limite tolerado pela legislação brasileira é de 200mg/100mL de álcool anidro para aguardentes, uísque e outras bebidas destiladas; e de 400mg/100mL de álcool anidro para conhaques e aguardentes de frutas (Brasil, 1997). O metanol pode ser produzido durante algumas etapas da produção de cachaça sendo componente indesejável no produto final, devido a sua toxicidade elevada para seres humanos (Dato et al., 2005).

Os ésteres são normalmente formados durante fermentação pelas leveduras e bactérias lácticas (Hashizume, 2001). A principal origem dos ésteres, nas bebidas alcoólicas, está no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica. Esses ésteres são formados por reações enzimáticas entre ácidos ativados sob a forma de acetil-S CoA e álcoois correspondentes (Angelino, 1991).

A formação de acetato de etila durante fermentação envolve duas etapas. Álcoois esterificados tornados por reação com ácidos graxos os quais se submetem a uma ativação prévia por combinação com coenzima-A. Ácidos graxos com cadeia longa de C8 a C14 atuam como composto antimicrobiano, porém, quando ésteres são formados estes ácidos graxos são eliminados (Clemente-Jimenez et al., 2005).

De acordo com Boscolo et al. (2000), acetato de etila é o principal éster nas bebidas alcoólicas. Em cachaças, contudo, esse éster é encontrado na metade detectado em rum e uísque. O acetato de etila é um composto muito volátil o que aumenta a probabilidade de perda. (Aguiar, 2004). Além do acetato de etila, outros ésteres são importantes na formação de bouquet de bebidas, tais como Laurato de etila, butanoato de etila, acetato de amila, acetato de pentila e acetato de hexila (Hashizume, 2001).

Os aldeídos podem estar presentes no caldo de cana antes da fermentação, quando a colheita da cana de açúcar é precedida da queima de folhagem, que provoca desidratação parcial de uma fração dos açúcares presentes. Aldeídos, também, podem ser resultado da ação das leveduras durante estágios preliminares no processo de fermentação. Grande parte da fração aldeídica presente no mosto é separada durante a destilação como produto da cachaça de cabeça. Se presente no produto final, aldeídos podem levar a sério problemas relacionados com o sistema nervoso central (Cardoso, 2006).

Os compostos voláteis tais como os álcoois superiores, os ésteres, ácidos carboxílicos e compostos de carbonila são importantes para o sabor característico das bebidas. Há poucas publicações, porém, na influência das linhagens de leveduras na formação de compostos voláteis e na qualidade da cachaça, uma bebida alcoólica exclusiva com a característica sensorial peculiar produzida no Brasil pela destilação do mosto fermentado da cana de açúcar (Oliveira et al., 2005b).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados 8 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* sendo eles: UFLA CA 116, UFLA CA 1183, UFLA CA 1162 pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), isoladas no Sul de Minas, e SA-1, PE-2, BG-1, VR-1 e CAT-1, leveduras fermentativas, cedidas pelo prof^o Luiz Carlos Basso da ESALQ - Piracicaba /SP, Brasil, isolados, respectivamente, nas usinas Santa Adélia (Jaboticabal/SP), Usina da Pedra (Serrana/SP), Barra Grande (Lençóis Paulistas/SP), Vale do Rosário (Morro Agudo/SP) e VO Catanduva (Arinanha/SP). Os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram reativados em meio YEPG líquido (extrato de levedura 10g; peptona 20g; glicose 20g; água destilada 1000ml e pH ajustado com NaCl para 3,5) por 48h à 28°C, onde foi verificada sua pureza através de microscopia.

3.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar utilizada neste experimento foi variedade RB 835054 fornecida pelo sítio Manganges, situado no município de Lavras, MG. A cana foi moída no mesmo dia do seu corte. Após a moagem, o caldo foi filtrado para a retirada das impurezas. No laboratório de Microbiologia, o caldo foi novamente filtrado e diluído em água destilada até atingir 5°Brix para o crescimento ou 10°Brix para o processo fermentativo. O caldo utilizado foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e utilizado em seguida.

3.3 Avaliação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Os isolados foram mantidos a -20°C em meio de cultivo e reativados separadamente em tubos de ensaio, onde foram incubados a 28°C por 24 h.

A pureza dos microrganismos utilizados neste trabalho foi verificada pela análise das características morfológicas e microscópicas de colônias isoladas, obtidas em estrias compostas, no meio YW (extrato de levedura, 3,0g.L⁻¹; extrato de malte, 3,0g.L⁻¹; peptona bacteriológica, 5,0g.L⁻¹; glicose, 10,0g.L⁻¹ e ágar, 15,0g.L⁻¹). As culturas estoques foram preparadas em tubos e em frascos para congelar, a partir dessas colônias puras e mantidas sob refrigeração.

Para avaliar o crescimento dos isolados, o caldo de cana (5° Brix), foi colocado em erlenmeyer (1750mL) em triplicata e, após a repicagem dos oitos isolados, esses incubados a 28°C (sem rotação) até atingir 10⁸ cel/mL.

Durante crescimento dos inóculos em caldo de cana a 5° Brix foi utilizado o sistema de batelada alimentada. Iniciou-se o abastecimento com mosto estéril (autoclavado a 121° C por 15 minutos) a 5° Brix. A adição de caldo de cana foi realizada a cada 24 horas. Cada adição foi monitorada por leitura direta em sacarímetro de Brix e foi adicionado o volume de 150 mL de caldo de cana até completar volume final de 1750 mL.

A primeira coleta ocorreu no momento de inoculação do mosto. Novas amostragens aconteceram em intervalos periódicos de 12 horas, até atingir 10⁸ cel/mL. Para a avaliação do crescimento, utilizaram-se os métodos de contagem direta em câmara de Neubauer. Esse método baseia-se em coloração das células não-viáveis com corante azul de metileno (1:1 v/v) e contaram-se as células viáveis presentes em 5 dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara. O número células viáveis foi calculado pela fórmula:

$$\text{Número de células viáveis} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10}{N}$$

N

$\sum nq$: soma algébrica do número de células viáveis contadas nos n quadrículos;

25: número total de quadrículos da câmara;

fd : fator de diluição utilizado;

10: constante padrão da câmara;

N: número de quadrículos contados, dentro dos 25 disponíveis.

3.4 Processo fermentativo

3.4.1 Preparo do inóculo

Após o crescimento dos isolados em caldo de cana, quando a população dos 8 isolados atingiu 10^8 cel/mL, a amostra foi decantada e transferida para frasco estéril 170mL, representando 10% (m/v) do recipiente para iniciar a fermentação.

Inicialmente foi feita inoculação dos isolados separadamente em caldo de cana a 10° Brix (triplicata). Como realizado no crescimento, na fermentação foi utilizado o sistema de batelada alimentada, realizado da seguinte forma: após a inoculação do pé-de-cuba, foi iniciado o abastecimento com mosto estéril (autoclavado) e diluído a 12°, 14° e 16° Brix entre a coleta de amostras.

Após a adição do caldo de cana, foram realizadas as coletas de amostras em 8, 16 e 24 h, respectivamente, coletado o volume total de 10% em relação ao volume total do frasco. As amostras retiradas durante o crescimento foram congeladas para posteriores análises cromatográficas.

Para avaliar o processo fermentativo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (660 nm, e em câmara de Neubauer das amostras coletadas a cada 8 horas de crescimento.

3.5 Análises químicas realizadas

3.5.1 Avaliação do °Brix e acidez titulável

A cada amostra retirada durante o crescimento e fermentação dos 8 isolados, foi realizada a avaliação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e acidez titulável.

A avaliação de °Brix foi determinada por leitura direta em refratômetro digital marca ATAGO PR-32 Pallette.

A acidez titulável foi determinada por titulometria, com solução de NaOH 0,01N, utilizando-se como indicador a fenolftaleína. O resultado foi expresso em porcentagem de composto com caráter ácido, como ácido láctico.

O resultado obtido pelo volume gasto de NaOH na titulação foi utilizado na fórmula a seguir:

$$AT = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{PM} \times 100}{[\text{H}^+] \times \text{T.E.} (\mu\text{g ou } \mu\text{L})}$$

V_{NaOH} = Volume gasto de NaOH

AT = Acidez titulável

N_{NaOH} = Normalidade

PM = Peso molecular

H^+ = nº de hidrogênio ionizável

T.E. = tomada de ensaio.

3.5.2 Álcoois superiores, aldeídos e ésteres.

Todas as amostras coletadas, durante o crescimento e fermentação de cada isolado de *S. cerevisiae* em caldo de cana, foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos, por duas vezes, após a 1ª centrifugação, descartando o precipitado, e o sobrenadante centrifugado novamente. Posteriormente foi filtrado em membrana Millipore (0,45 mm) para retirada de possíveis impurezas. Os extratos foram mantidos a -20°C até a efetivação das amostras.

As identificações dos metabólitos secundários foram realizadas pelo tempo de retenção de um composto como referência escolhido como padrão e a quantificação desses metabólitos foi realizada, a partir da comparação com as diferentes curvas de calibração no cromatógrafo gasoso, obtidas de uma mistura

com os seguintes padrões analisados, para elaboração da metodologia: metanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, isoamílico, amílico, 1-hexanol, 2-3 butanediol e 1-3 butanediol. Os ésteres foram: acetato de etila, acetato de isoamila e butirato propila e o aldeído foi o acetaldeído, mostrados na Figura 1.

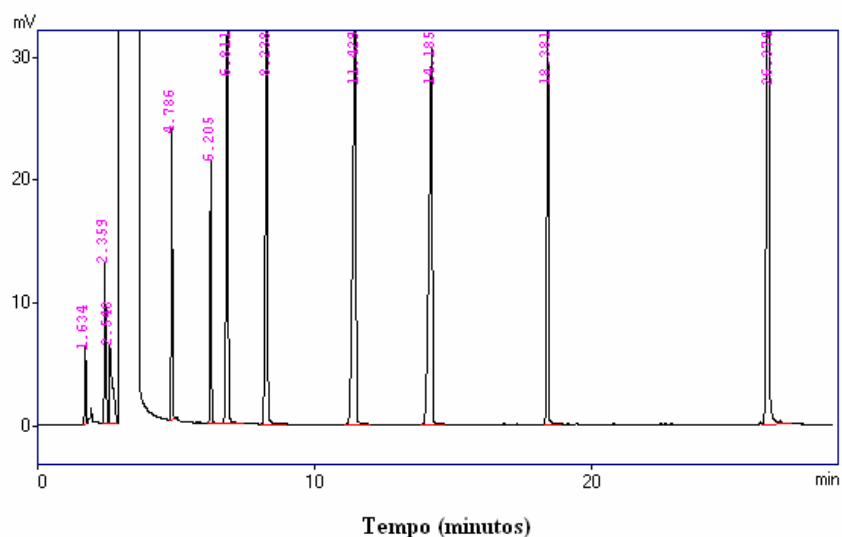


FIGURA 1 Cromatograma dos padrões utilizados com os respectivos tempos de retenção: 1,6: Acetaldeído; 2,3: Acetato etila; 2,5: Metanol; 3,1: Etanol; 4,6: 1-Propanol; 6,0: Isobutanol; 6,9: Butirato propila; 7,0: Acetato isoamila; 8,0: 1-Butanol; 11,3: Isoamílico; 14,1: Amílico; 18,3: 1-Hexanol; 22,5: 2,3 Butanediol e 26,2: 1,3-Butanediol.

O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu, modelo 17 A, equipado com detector de chama ionizada (DIC). Extratos das amostras do crescimento e fermentação foram injetadas (1 μ L) nas seguintes condições de operação: detector e injetor, operando a 250°C e 240°C, respectivamente; coluna capilar (DB-WAX, 30m, 0.25 mm de diâmetro, fase estacionária polietileno

glicol), operando em gradiente de temperatura (50°C por 3 minutos; elevação de 1°C min⁻¹ até chegar a 60°C, 9°C/min até 150°, permanecendo a 150°C por 3 minutos). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 2,1 mL/ min, a pressão foi de 19,0 psi e o split foi de 1:10. A concentração dos álcoois superiores, aldeídos e ésteres nas amostras do crescimento e fermentação foram determinadas pela curva padrão.

3.5.3 Etanol

As amostras retiradas durante o crescimento e fermentação dos isolados inoculados, separadamente, em caldo de cana foram diluídas 20 vezes (v/v) com água milli Q. Foram injetadas 1 µl em cromatógrafo gasoso nas seguintes condições de operação: detector e injetor, operando a 250°C e 240°C, respectivamente; coluna capilar (DB-WAX, 30m, 0.25 mm de diâmetro, fase estacionária polietileno glicol), operando em gradiente de temperatura (50°C por 4 minutos). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 2,0 mL/ min, a pressão foi de 18,9 psi e o split foi de 1:10. A concentração do etanol das amostras de crescimento e fermentação foi determinada pela curva padrão em cromatógrafo gasoso.

3.6 Floculação

Das amostras coletadas, durante crescimento e fermentação dos isolados, foram retiradas duas alíquotas de 4 mL para a avaliação da taxa de floculação. A primeira foi retirada, após agitação manual do frasco, designada como tempo zero. Após 5 minutos de repouso do frasco, retirou-se a segunda alíquota, e a absorbância a 600 nm foi determinada. A diferença entre leituras em 0 e 5 minutos foi tomada para calcular o valor da floculação segundo a metodologia descrita por Calleja & Johnson (1976).

3.7 Análises Estatísticas

As análises foram submetidas ao teste de análise de variância pelo programa SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (Ferreira, 1999) e os desvios padrões (do tempo final de cada análise) foram comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. As tabelas com os desvios padrões estão em anexo (Tabelas 1a a 17 a).

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Crescimento dos isolados *S. cerevisiae*

A velocidade de crescimento observado pelo aumento da absorbância (Log de cel/mL analisadas em câmara de Neubauer) em relação ao tempo de incubação foi diferente para as oito leveduras estudadas.

Com relação à curva de crescimento, alguns isolados iniciaram com população maior devido à metodologia utilizada (Figura 2). Os isolados UFLA CA116, BG-1 e CAT-1 foram os mais lentos para atingir a população de 10^8 cel/ml, em 84 h, enquanto os demais atingiram esse valor com 48 h. Os tempos iniciais dos isolados em caldo de cana a 5° Brix foram diferentes em decorrência da metodologia utilizada.

No instante da inoculação (T0), os isolados UFLA CA1162 e UFLA CA116 apresentaram crescimento populacional cujo log foi de 6,10 e 7,85 cel/mL, sendo o mais baixo e o mais alto entre os isolados analisados, respectivamente. Ao término do crescimento populacional do isolado UFLA CA1162 foi de 8,33 cel/mL e UFLA CA116 foi de 8,38 cel/mL.

Para o isolado VR-1, no final do crescimento, observou-se o maior crescimento populacional (log de 8,93 cel/mL) e o isolado BG-1 apresentou o menor crescimento (8,22 cel/mL). O isolado UFLA CA116 apresentou crescimento elevado em relação aos outros isolados analisados (Figura 2).

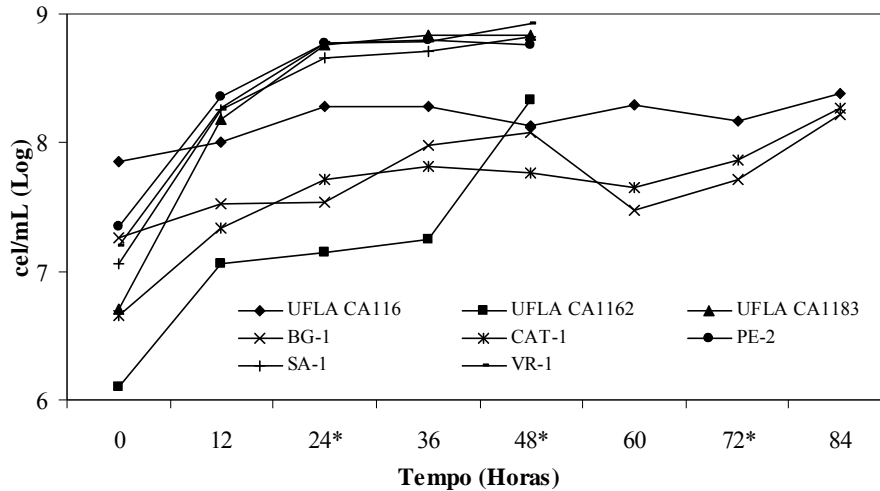


FIGURA 2 Curva de crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana a 5° Brix a 28°C. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

Analisando a taxa de floculação dos isolados, durante o crescimento em caldo de cana, pôde-se observar que o isolado UFLA CA116 (Figura 3), apresentou aumento significativo em 24 h de inoculado em caldo de cana a 5° Brix, atingindo 0,408; após 48 h apresentou uma diminuição na sua taxa de floculação até 72 h, com tendência a um aumento novamente na taxa de floculação em 84 h a 0,392. A menor taxa de floculação foi encontrada em 72 h após a inoculação do isolado UFLA CA116. O comportamento observado para esse isolado, provavelmente, deu-se em função da capacidade de floculação da cepa.

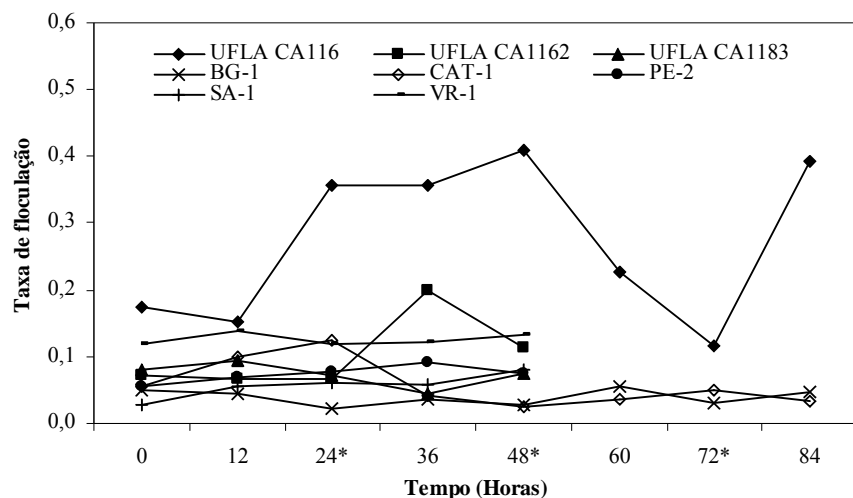


FIGURA 3 Taxa de floculação dos isolados *S. cerevisiae* durante crescimento em caldo de cana 5° Brix. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

A UFLA CA1162 apresentou taxa de floculação constante até 24 h, atingindo um valor máximo de 0,199 em 36 h de crescimento neste isolado. O período de crescimento populacional com esse isolado foi até 48 h (8,33 cel/mL) em que se observou uma taxa de floculação de 0,113. A taxa de floculação para UFLA CA1183 aumentou até 12 h e decresceu nas 12 h seguintes, após a inoculação, 0,075 de floculação no final do crescimento, após 48 h com um crescimento populacional de 8,84 cel/mL. O isolado BG-1 apresentou oscilação na taxa de floculação desde a inoculação em 12, 36, 60, e 84 h após a inoculação sendo, respectivamente, expressos em 0,045; 0,037; 0,054 e 0,046. A menor taxa de floculação foi em 24 h (0,020) com crescimento populacional de 7,54 cel/mL, Que pode ser devido à adição de caldo de cana no frasco de crescimento, entre as amostras, diluindo sua taxa de floculação.

A taxa de floculação do CAT-1 foi de 0,193, sendo a maior taxa encontrada durante todo o período de crescimento. Esta taxa de floculação decresceu no final do crescimento para 0,034 com $1,89 \times 10^8$ cel/mL em 84 h. O isolado PE-2 apresentou aumento linear da taxa de floculação até 36 h de crescimento (0,090), no qual decresceu para 0,076 a taxa de floculação no final (8,76 cel/mL). O isolado SA-1 apresentou taxa de floculação 0,081 no final do crescimento em 48 h (8,82 cel/mL).

O isolado VR-1 apresentou um comportamento semelhante ao isolado UFLA CA1183, aumentando sua taxa de floculação para 0,136 até as 12 h de crescimento sendo a maior taxa de floculação encontrada nesse isolado. A partir deste intervalo, houve queda na taxa de floculação para 0,118, com tendência a um aumento para 0,132, no final do período de crescimento, com 48 h de crescimento populacional com 8,93 cel/mL.

De acordo com Souza & Mutton (2004), o procedimento analítico adaptado para determinar as taxas de floculação mostrou não depender das concentrações de leveduras contidas no meio, uma vez que os flocos são totalmente dispersos. Isso torna os resultados obtidos característicos de uma suspensão mais homogênea contendo poucas células agrupadas e muitas individualizadas.

O isolado UFLA CA116 utilizado nesse experimento foi selecionado em experimentos prévios, para a produção de cachaça, por proporcionar elevado rendimento, persistir durante o processo fermentativo e apresentar capacidade de floculação no final da fermentação (Mendonça, 1999; Fialho, 2000; Campos, 2003) que confirmam os resultados desse experimento em que o isolado UFLA CA116 se mostrou o mais floculante dentre os isolados estudados.

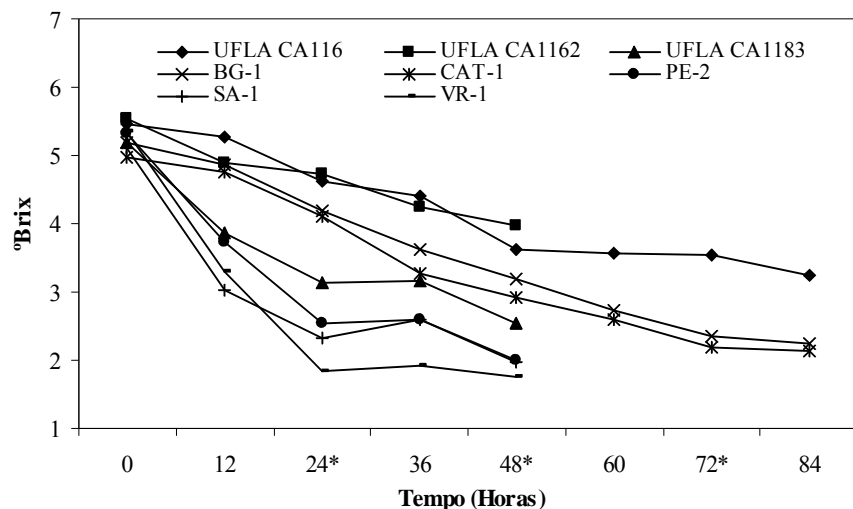


FIGURA 4 Sólidos solúveis totais (°Brix) em caldo de cana (5°Brix) inoculado com os isolados *Saccharomyces cerevisiae* durante crescimento. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

Após a inoculação do isolado UFLA CA116 (Figura 4), houve decréscimo no °Brix até 48 h (3,6 °Brix). No intervalo de 48 até 72 h, após a inoculação, o °Brix manteve-se em torno de 3,5, chegando a 3,23° Brix ao término do crescimento ao atingir a população de 10^8 cel/mL em 84h (Figura 2).

Na avaliação do Brix para o isolado UFLA CA1162, a diferença entre o tempo inicial e final foi de 1,57° Brix. No caso do isolado UFLA CA1183, o Brix inicial foi de 5,2° e 24 h após a inoculação decresceu para 3,13° Brix, mantendo esse Brix até 36 h. Na amostra de 48 h após a inoculação observou-se que o Brix decresceu para 2,53° Brix com 10^8 cel/mL. No isolado BG-1 observou-se, ao final do período de crescimento, um decréscimo de 2,97° Brix. O teor de sólidos solúveis totais, observado no caldo de cana com o isolado CAT-1 decresceu, gradativamente, até 72 h após a inoculação, chegando a 2,2°

Brix, mantendo este valor até 84 h chegando a população em torno de 10^8 cel/mL.

Os isolados SA-1, PE-2 e VR-1 apresentaram comportamento semelhante ao isolado UFLA CA1183, onde o valor de °Brix decresceu nas primeiras 24 h. e os menores °Brix alcançados no final do crescimento (em torno de 1,76° a 2° Brix), com média de crescimento populacional de 8,83 cel/mL.

De acordo com Narendranath et al (1997), o decréscimo da concentração de sólidos solúveis totais no mosto é a medida de conversão de glicose em álcool. Os sólidos dissolvidos contribuem para a gravidade específica, sendo que a gravidade decresce quando o açúcar é convertido em álcool e CO_2 .

Considerando a acidez titulável total durante o crescimento (Figura 5), o isolado VR-1 apresentou maior porcentagem de acidez titulável (0,086%). O isolado UFLA CA116 manteve-se com a menor porcentagem, durante todo crescimento, chegando a 0,079%. Os isolados PE-2 e SA-1 variaram no final do crescimento entre 0,143% e 0,142% de acidez titulável, respectivamente, sendo as maiores porcentagens entre os isolados estudados. Os outros isolados estudados variaram a porcentagem de acidez titulável entre 0,065% e 0,137% no final do crescimento.

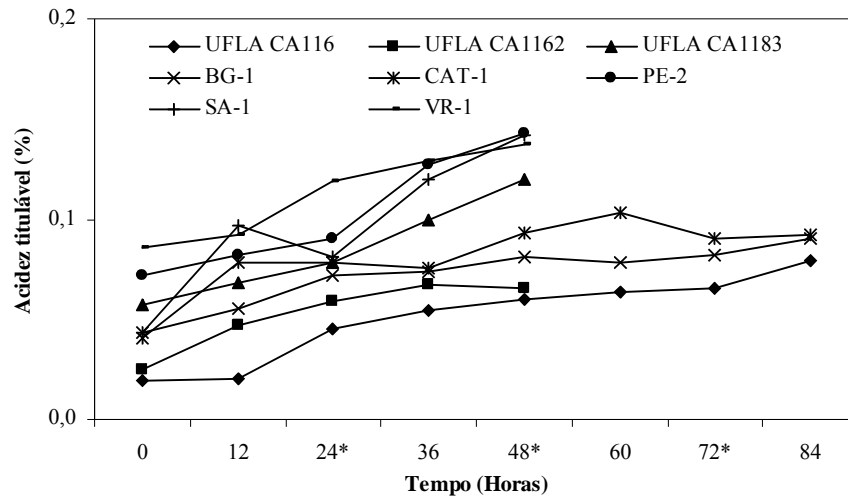


FIGURA 5 Acidez titulável em caldo de cana inoculado com os isolados *Saccharomyces cerevisiae* durante 84 horas de cultivo. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

De acordo com estudo de Lima & Nóbrega (2004), a acidez volátil das aguardentes, no entanto, não pode ser confundida com o caráter excessivamente acético que provoca sensações de ardor na garganta e odor de vinagre. Tal característica pode ser proveniente de fermentações alcoólicas bastante contaminadas com bactérias acéticas. Observa-se, por exemplo, que fermentações alcoólicas conduzidas em boas condições de higiene geram aguardentes com acidez relativamente baixa.

4.2 Metabólitos produzidos durante o crescimento

No sobrenadante das fermentações realizadas não foram encontrados teores de metanol, isobutanol, 1-butanol, isoamílico, amílico, acetato de isoamila e butirato de propila, devido, inclusive, a não destilação do caldo de cana.

Em estudos de Rojas et al. (2003), durante crescimento de *S. cerevisiae* para análise cromatográfica em condições altamente aeróbicas, houve concentração de acetato de isoamila em amostras de 8, 24 e 48 h com 0,017; 0,65 e 0,48 mL/L, respectivamente.

Essa quantificação é importante, pois, os fermentados contêm compostos voláteis em diferentes quantidades, que exibem diferentes contribuições para a proporção do aroma. A concentração de álcoois superiores, aldeídos e ésteres encontrados nas análises cromatográficas das amostras provenientes do crescimento dos isolados de *S. cerevisiae* podem ser observados na Tabela 1.

O acetato de etila (Tabela 1) foi o metabólito secundário encontrado em maior concentração no crescimento dos isolados PE-2 e SA-1, após 48 e 24 h de crescimento, respectivamente. Em estudos de Rojas et al. (2003), foram encontradas concentrações de acetato de etila após a partir de 24 h de crescimento com 5,08 mL/L e em 48 h de crescimento com 19,67 mL/L. O acetaldeído foi encontrado em todos os isolados estudados, mas a concentração variou de acordo com o tempo, sendo que a maior concentração dentre os isolados estudados foi o UFLA CA116 após 84 h de inoculação (193 mL/L). O metabólito secundário 1-Hexanol foi encontrado somente nos isolados UFLA CA1162 e SA-1, com média de 7,4 mL/L. Pode-se observar que sua produção não foi devido a sua origem, pois, os isolados onde ocorreram a concentração de 1-Hexanol possuem origens distintas. O álcool 1,3-butanediol, também, ocorreu em todos os isolados estudados e sua maior concentração com o isolado PE-2, após 48 h de crescimento com concentração de 168,8 mL/L, ocasionado uma média entre os isolados de 98,81 mL/L.

TABELA 1 Concentração de metabólitos secundários produzidos por isolados de *Saccharomyces cerevisiae* após atingir 10^8 cel/mL

Isolados	Concentração (mL/L)					
	Acetato de etila	Acetaldeído	1 - Hexanol	1,3 - Butanediol	1 - Propanol	2,3 - butanediol
UFLA	nd ¹	193,0	nd	47,0	nd	196,6
CA116		(84 h)		(12 h)		(84 h)
UFLA	nd	139,5	10,0	96,3	nd	191,6
CA1162		(48 h)	(48 h)	(24 h)		(36 h)
UFLA	nd	94,7	nd	150,5	8,6	nd
CA1183		(48 h)		(24 h)	(48 h)	
BG-1	nd	122,0	nd	31,7	nd	198,2
		(84 h)		(72 h)		(48 h)
CAT-1	nd	128,7	nd	107,1	5,3	nd
		(60 h)		(24 h)	(84 h)	
PE-2	14,3	132,2	nd	168,8	9,0	nd
	(48 h)	(36 h)		(48 h)	(48 h)	
SA-1	15,0	117,9	4,8	148,2	8,6	nd
	(24 h)	(36 h)	(12 h)	(48 h)	(24 h)	
VR-1	nd	92,7	nd	40,9	10,2	nd
		(24 h)		(24 h)	(36 h)	

¹nd _ não detectado

O 1-propanol foi observado nos isolados UFLA CA1183 (48 h), CAT-1 (84 h), PE-2 (48 h), SA-1 (24 h) e VR-1 (36 h) não sendo encontrado nos demais. As diferenças na origem dos isolados, também, não influenciou na produção de 1-propanol, uma vez que o isolado BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1 e VR-1 são oriundos da fermentação em álcool combustível, e o isolado UFLA CA1183 tem origem em fermentação de vinhos.

Durante o crescimento foi avaliada a produção de 2,3-butanediol. Foi identificada a produção no isolado UFLA CA116 com maior produção em 84 h de crescimento (196,6 mL/L). No isolado UFLA CA1162 foi encontrado somente no tempo 36 h (191,57mL/L). O isolado BG-1 foi identificado em todos os tempos durante o crescimento em caldo de cana a 5°Brix com maior produção em 48 h (198,2 mL/L). O álcool 2,3-butanediol não foi encontrado nos isolados UFLA CA1183, CAT-1, SA-1, PE-2 e VR-1.

De acordo com estudos de Romano et al. (1998b), a capacidade para produzir 2,3-butanediol por 90 linhagens de quatro espécies de leveduras de vinhos (*Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*) foi testada em mosto de uva por cromatografia em camada delgada de alta eficiência. A quantidade total de 2,3 butanediol produzido variou de 22,7 mL/L a 846,5 mL/L dentre as espécies de leveduras.

A produção de acetaldeído pelos isolados de *S. cerevisiae* durante o crescimento, aumentou com o tempo de inoculação (Figura 6) sendo observado em maior aumento com o isolado UFLA CA116 após 48 h (173,9 para 193 mL/L). O isolado UFLA CA1162, após 36 h, aumentou a concentração de 82,6 a 139,5 mL/L. Já o isolado BG-1 apresentou diminuição na concentração até 72 h aumentando novamente no tempo final com 10^8 cel/mL. Os outros isolados aumentaram a concentração de acetaldeído no caldo de cana gradativamente. O isolado que apresentou maior concentração de acetaldeído no final do crescimento foi o UFLA CA116. O isolado VR-1 apresentou, dentre os outros analisados, uma menor concentração de acetaldeído (83 mL/L). Os demais isolados variaram entre 90,2 a 126,3 mL/L.

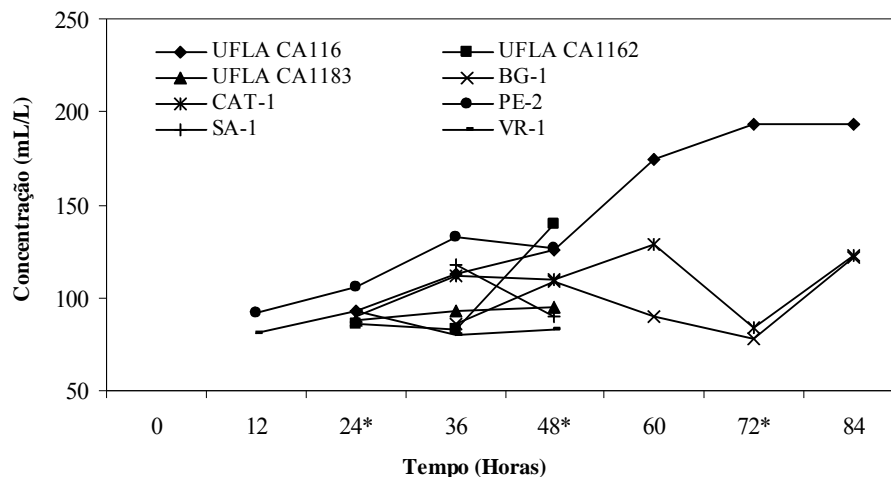


FIGURA 6 Acetaldeído durante crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. * Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

A quantificação de 1,3 butanediol nos 8 isolados foi obtida de modo diferenciado em relação ao período de crescimento. Nos isolados UFLA CA116 e BG-1, foi somente observado no período de 12 e 72 h, respectivamente, sendo quantificado em 47 mL/L no isolado UFLA CA116 e em 31 mL/L no isolado BG-1. O isolado UFLA CA1183 atingiu uma alta concentração de 1,3-butanediol em 24 h (150,5 mL/L) e decresceu nas próximas 12 horas, onde aumentou novamente (82,7 mL/L) até o fim do crescimento. A concentração de 29,9 mL/L com o isolado UFLA CA1162 foi inicialmente baixa em 12 h após o crescimento, aumentando após 24 h do crescimento (96,3 mL/L), não sendo mais encontrada nesse isolado. Com o isolado CAT-1 a produção ocorreu a partir de 24 h (107,1 mL/L) diminuindo, não foi encontrado em 60 h, onde no final do crescimento atingiu 59,5 mL/L. O isolado PE-2 atingiu o valor máximo entre os isolados no final do crescimento 168,8mL/L (84h). O isolado SA-1 variou a concentração de 1,3 butanediol entre 68,6 a 148,2 mL/L. O isolado VR-

1 apresentou somente produção de 1,3 butanediol nos tempos 24 e 36 h com concentrações de 40,9 a 36,3 respectivamente. Não há diferença entre as origens dos isolados quanto a sua produção de 1,3-butanediol durante o crescimento em caldo – de - cana a 5°Brix, podendo ser encontrada alta concentração em ambas as origens, tanto leveduras selvagens como as já selecionadas.

TABELA 2 Concentração de 1,3-Butanediol durante crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Isolados	Concentração ml/L							
	0 h	12 h	24 h*	36 h	48 h*	60 h	72 h*	84 h
UFLA CA116	nd ¹	47,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
UFLA CA1162	nd	29,9	96,3	nd	nd	nd	nd	nd
UFLA CA1183	nd	nd	150,5	50,5	82,7	nd	nd	nd
BG-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,7	nd
CAT-1	nd	nd	107,1	71,5	50,0	0,0	74,6	59,5
PE-2	nd	117,0	121,6	129,8	168,8	nd	nd	nd
SA-1	nd	68,6	56,8	87,1	148,2	nd	nd	nd
VR-1	nd	nd	40,9	36,3	nd	nd	nd	nd

¹nd = não detectado

*Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

Durante o crescimento foi avaliada a produção de 2,3-butanediol. Foi identificada a produção no isolado UFLA CA116 a partir de 48 h (193,3 mL/L) até o final do crescimento (196,6 mL/L). O isolado BG-1 foi identificado em todos os tempos durante o crescimento em caldo de cana a 5°Brix com média de

194,2 mL/L. No isolado UFLA CA1162 foi encontrado somente no tempo 36 h (191,57mL/L) O álcool 2,3-butanediol não foi encontrado nos isolados UFLA CA1183, CAT-1, SA-1, PE-2 e VR-1.

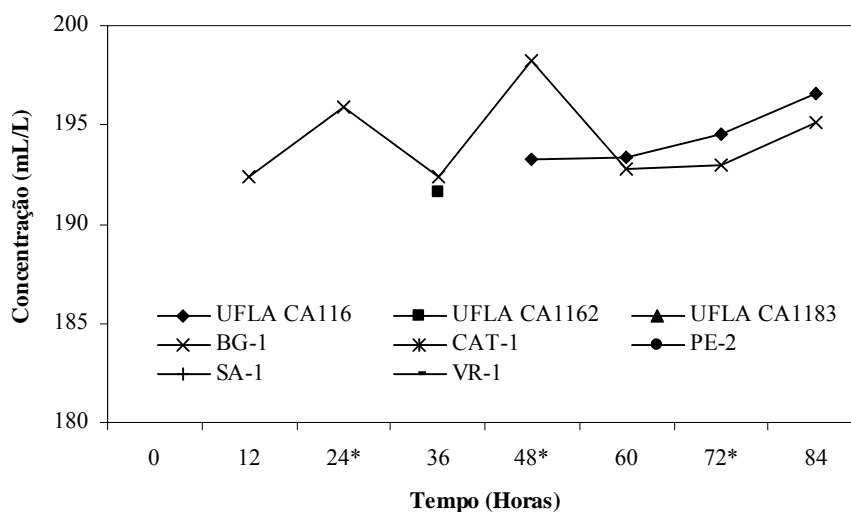


FIGURA 7 2,3-butanediol durante crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. * Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

A concentração de 1-propanol durante o crescimento de isolados de *S. cerevisiae* pode ser observado na Figura 8. O isolado CAT-1 apresentou concentração somente no tempo final de 5,3 mL/L em 84 h de crescimento. Com os outros isolados (UFLA CA1183, PE-2 e VR-1) houve comportamento semelhante. Iniciou-se-se a produção de 1-propanol em 12 h até 48 h de crescimento onde a média variou entre 7,3 (2h) a 8,7 (48 h). Somente o isolado SA-1 decresceu produção de 1-propanol no final do crescimento.

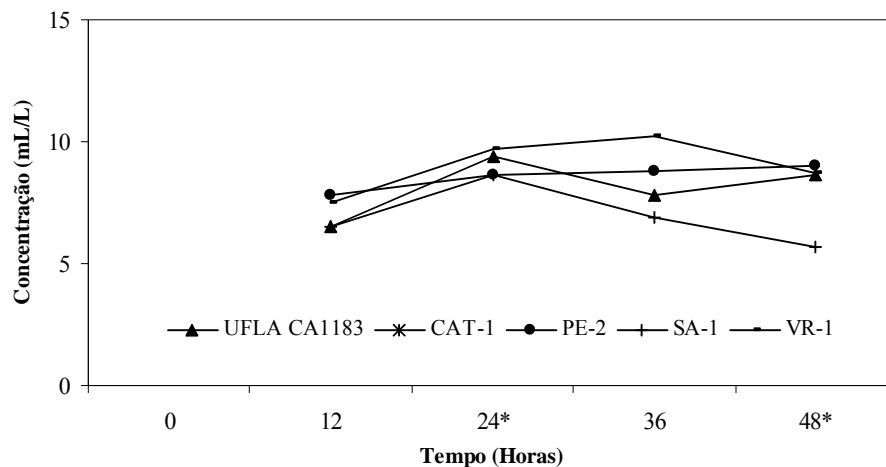


FIGURA 8 1-Propanol durante crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

De acordo com Boza & Horii (1998), a acidez e o teor de propanol influem negativamente no sabor da aguardente. Os estudos de Ribeiro & Horii (1999) mostraram que os resultados médios na formação de álcoois superiores (metanol, n-propílico, n-butílico, i-butílico, n-amílico, e i-amílico e amílico opticamente ativo), no acompanhamento cinético se deu, com a mesma tendência para as três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas. Verificou-se que a produção de metabólitos primários estava associada ao crescimento, à produção de etanol e ao consumo de açúcar.

Mamede & Pastore (2004) verificaram que *Kloeckera apiculata* produziu quantidades significantes de compostos importantes para a qualidade do vinho como o acetato de etila, mas, por outro lado, a produção de etanol foi muito baixa. Neste mesmo trabalho os autores observaram que a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* foi alta, mas também a produção de acetato de etila e acetato de isoamila foram baixos quando comparadas com as amostras de mosto fermentado pela *Kloeckera apiculata*.

Durante o crescimento foi avaliada também a concentração de etanol nos isolados de *S. cerevisiae*, onde o isolado SA-1 apresentou a maior concentração de etanol no final do crescimento (231,97 mL/L) na Figura 9. O isolado UFLA CA1162 obteve a menor concentração dentre os isolados estudados (186,78 ml/L). Observou-se no isolado UFLA CA116 aumento na concentração após a alimentação no frasco com caldo de cana, atingindo 198,23 mL/L no final do crescimento. O isolado UFLA CA1183 obteve concentração linear durante todo o crescimento, variando de 167,82 a 224,13 mL/L.

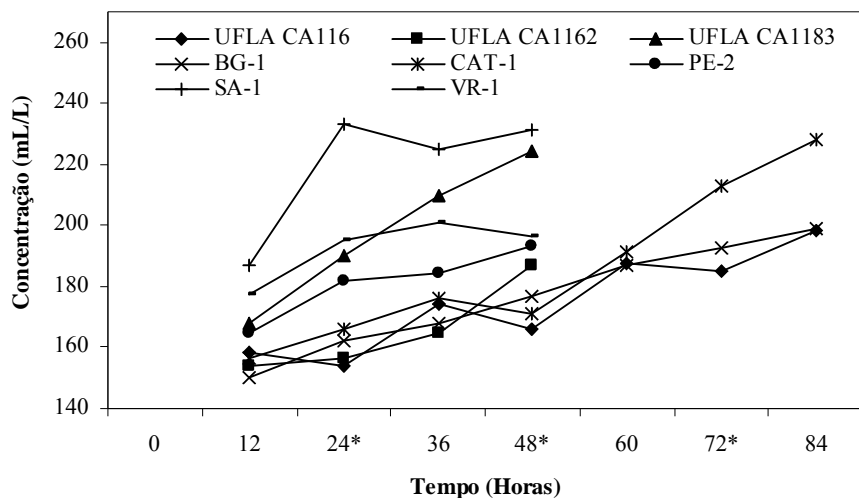


FIGURA 9 Etanol durante crescimento dos isolados de *S. cerevisiae* em caldo de cana a 5°Brix. *Alimentação com caldo de cana a 5° Brix

4.3 Fermentação dos isolados *S. cerevisiae*

As amostras iniciais, no momento de inoculação, resultaram em diferentes concentrações de células, pois, não houve padronização no tempo zero e cada isolado apresentou taxa de crescimento diferente.

De acordo com Figura 10, o isolado UFLA CA116 apresentou um menor crescimento populacional (6,78 cel/mL), aumentando após 8h, terminado com o crescimento populacional mais alto encontrado no final da fermentação (8,8 cel/mL). O isolado CAT-1 manteve seu crescimento entre 7,9 a 8,1 cel/mL durante toda fermentação. Já o isolado BG-1 decresceu até 8h (7,79 cel/mL), aumentando no decorrer da fermentação terminado com crescimento de 8,06 cel/mL, destacando-se entre os outros isolados. Os demais isolados terminaram a fermentação com crescimento populacional que variou entre 7,9 a 8,1 cel/mL.

Os isolados de *S. cerevisiae* durante a fermentação em caldo de cana a 10°Brix tiveram comportamento semelhante entre eles, diferente desses isolados durante o seu crescimento a 5°Brix, onde tiveram comportamento diferente.

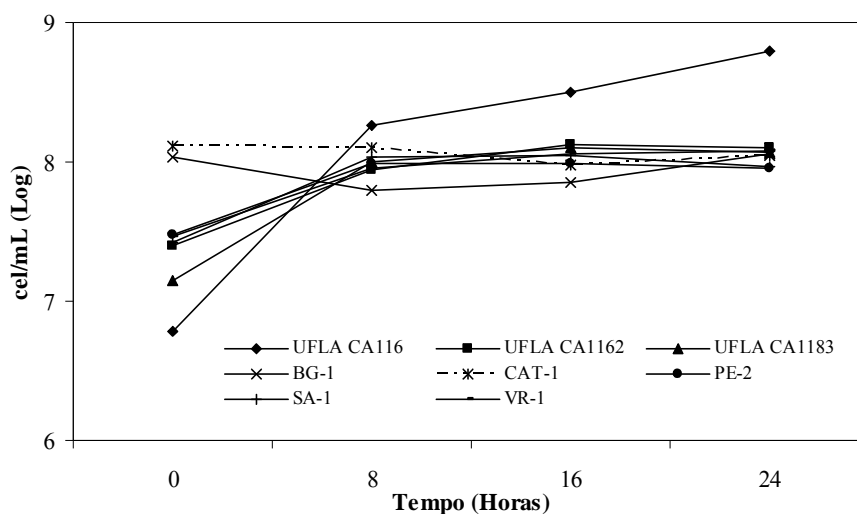


FIGURA 10 Curva de crescimento de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana a 10°Brix durante fermentação.

Na avaliação da taxa de floculação (Figura 11) o isolado UFLA CA116 atingiu em 16h a taxa de floculação de 0,167, onde o decréscimo ao final do

processo de fermentação foi 0,147. O isolado UFLA CA1162 iniciou sua fermentação sem taxa de floculação, atingindo 0,180 no final da fermentação, sendo o isolado com maior taxa de floculação no final do processo fermentativo. Embora o isolado UFLA CA1183 tenha iniciado a fermentação com a maior taxa de floculação (0,191), essa taxa decresceu nos tempos seguintes e atingiu 0,063, aumentando no final da fermentação para 0,120. Após 16 h, o isolado BG-1 apresentou sua maior taxa de floculação (0,215), a qual decresceu para 0,099 no final da fermentação.

Com comportamento linear, a taxa de floculação de CAT-1 foi estável durante fermentação diminuindo após 8 h, atingindo ao final da fermentação 0,075. A taxa de floculação dos isolados PE-2 e SA-1 diminuiu até 8 h, atingindo 0,085 e 0,078, respectivamente. Ao término do processo de fermentação, decresceu para 0,018 e 0,042, respectivamente. No isolado PE-2, após 24 h do processo fermentativo, observou-se menor taxa de floculação entre os isolados analisados. O isolado VR-1 teve queda de sua taxa de floculação até 8 h aumentando no final da fermentação para 0,096.

Comparando a taxa de floculação desses isolados, durante a fermentação com as taxas durante o crescimento, observou-se que o isolado UFLA CA116 teve maior taxa de floculação durante o crescimento comparando com sua fermentação.

A floculação é um fenômeno apresentado por algumas linhagens de leveduras que, em certas circunstâncias, tendem a aglomerar-se e formar flocos, os quais se depositam no fundo da dorna de fermentação (Martins et al., 1998). De acordo com Amorim (2005), a floculação traz grande prejuízo para a fermentação álcool combustível, porque quando ocorre faz com que as leveduras fiquem depositadas no fundo das dornas, diminuindo, assim, sua área de contato com o mosto, reduzindo a velocidade do processo. A floculação é de extrema importância na indústria de cerveja e outros processos biotecnológicos onde é

função separar células suspensas do meio, depois do processo fermentativo (Strauss et al., 2004; Martins et al., 1998).

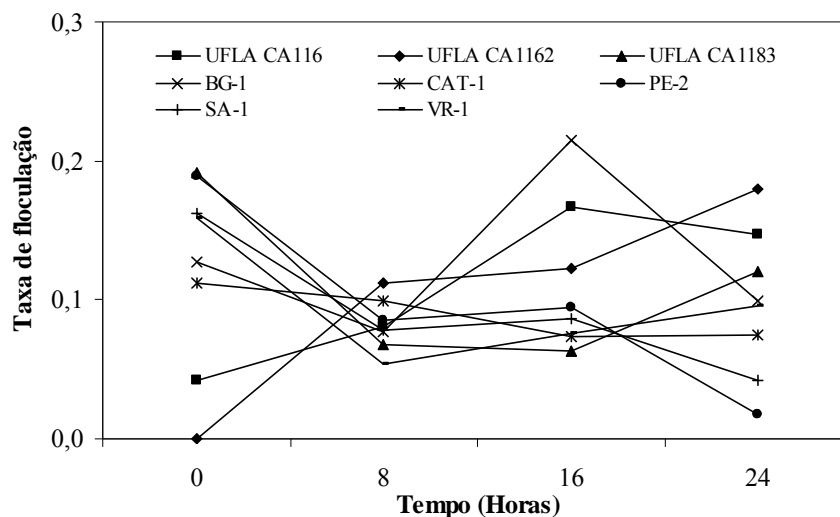


FIGURA 11 Taxa de floculação dos isolados *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação.

No período de 24 h de fermentação (Figura 12) observou-se decréscimo de 2,07 °Brix para isolado UFLA CA116. Resultado diferente do isolado UFLA CA1162 no qual se observou aumento após 8 h chegando a 9,4 °Brix, decrescendo posteriormente chegando a 8,5° Brix e novamente aumentando no final da fermentação. Ao final do processo fermentativo para o isolado UFLA CA1183 o decréscimo do °Brix até 3,6°Brix. O isolado BG-1 se deu até 16h. Após esse período o °Brix manteve-se constante (7,6°B) até o final da fermentação. O isolado CAT-1 mostrou comportamento semelhante ao do isolado BG-1, chegando a 7,53°Brix. Para os isolados PE-2, SA-1 e VR-1

ocorreu decréscimo gradativo do °Brix sendo os valores finais em 3,4°; 3,4° e 3,3° Brix, respectivamente.

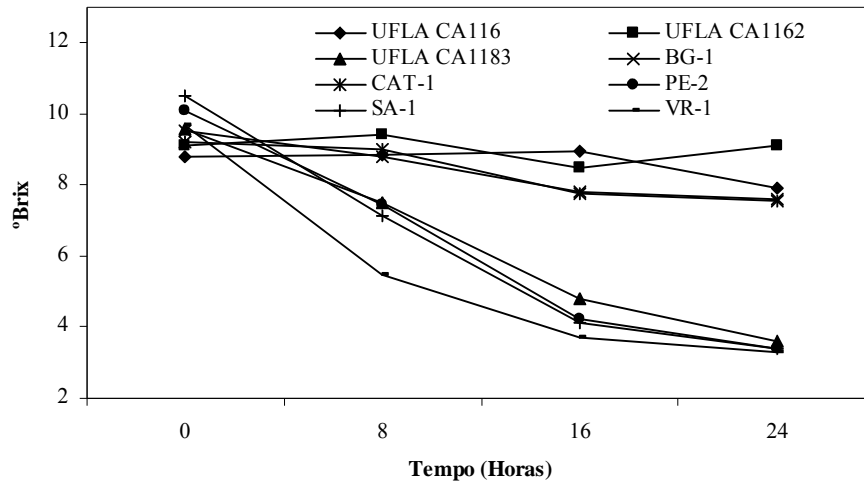


FIGURA 12 Concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) em caldo de cana inoculado com os isolados *S. cerevisiae* durante fermentação.

Assim como no crescimento, os isolados UFLA CA116, UFLA CA1162, BG-1 e CAT-1 tiveram um comportamento semelhante durante a fermentação obtendo os maiores °Brix em relação aos outros isolados. Os isolados UFLA CA1183, SA-1, PE-2 e VR-1 obtiveram °Brix menores entre os isolados, semelhantes ao crescimento.

A diluição do caldo de cana é realizada, uma vez que o teor elevado do °Brix é limitante para a célula, que convertendo muito açúcar em etanol, logo no início da fermentação sofrerá estresse pela grande quantidade final do mesmo (Schwan et al., 2001).

Os isolados tiveram comportamentos diferentes em relação à porcentagem de acidez titulável (Figura 13). O isolado VR-1 iniciou a fermentação com a maior porcentagem de acidez titulável (0,172), verificando um aumento após 8h (0,203) e chegando a 0,173 no final do processo fermentativo. O isolado SA-1 terminou a fermentação com a maior porcentagem de acidez titulável entre os isolados (0,210). Encerrado o processo de fermentação o isolado UFLA CA1162 apresentou a menor porcentagem de acidez titulável chegando a 0,072.

Pode-se observar que os isolados tiveram um comportamento semelhante à fermentação no seu crescimento em caldo de cana a 5°Brix em que os isolados UFLA CA116, UFLA CA1162, BG-1 e CAT-1 atingiram as menores porcentagens de acidez titulável durante o crescimento e fermentação.

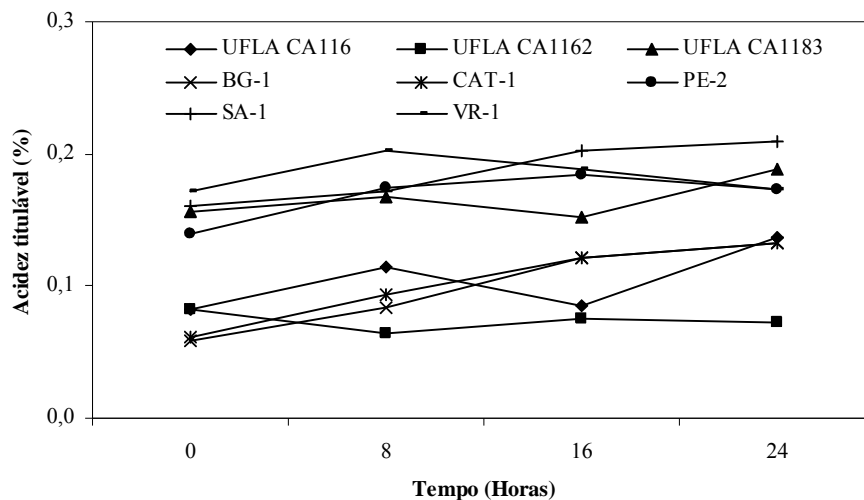


FIGURA 13 Acidez titulável em caldo de cana inoculado com os isolados *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação.

4.4 Metabólitos produzidos durante a fermentação

As amostras coletadas no momento de inoculação dos isolados (Tempo 0), não foram analisadas por cromatografia gasosa, pela sua alta concentração de açúcares.

Considerando os metabólitos secundários dos isolados (Tabela 3), o UFLA CA1183 foi o que produziu maior concentração de acetato de etila em 16 h de fermentação (25,0 mL/L). Nesse tempo observou-se queda na acidez titulável na amostra desse isolado. Pôde-se verificar que essa produção de acetato de etila não foi dependente da origem do isolado, pois, os isolados de diferentes origens produziram acetato de etila, como PE-2, SA-1 e VR-1 que foram isolados de álcool combustível, e UFLA CA1183 que foi isolado de vinho.

A maior concentração de acetaldeído, durante a fermentação, foi de 428,2 mL/L após 8 h para o isolado PE-2. Foi encontrado nesse isolado, durante o crescimento de PE-2 (Tabela 1), a concentração de 132,2 mL/L que pode ter sido devido a maior concentração de açúcares durante a fermentação durante a qual não foi encontrada produção de acetaldeído no cultivo de BG-1, diferenciando do seu crescimento em que foi encontrada concentração após 84hs de 122 mL/L.

Os isolados UFLA CA116, UFLA CA1183 e BG-1 apresentaram média de 9,63 mL/L de álcool 1-Hexanol nos tempos 24, 8 e 24 h, respectivamente, sendo este álcool produzido somente por esses três isolados. As concentrações de 1-Hexanol, durante a fermentação, foram diferentes do que foi encontrado durante o crescimento dos isolados onde não foram encontrados nos mesmos isolados, sendo eles de diferentes origens de isolamento.

O álcool 1,3-butanediol foi encontrado em todos isolados estudados; a maior concentração encontrada foi no isolado UFLA CA116 no final da

fermentação (305,2 mL/L) e quase 7 vezes maior sua concentração comparada a maior concentração obtida por esse isolado durante o crescimento (Tabela 1).

O 1-Propanol foi encontrado após 24 h de fermentação nos isolados CAT-1, PE-2, SA-1 e VR-1. Para o isolado UFLA CA1183 foi encontrado após 16 h com a maior concentração encontrada na fermentação 30,5 mL/L. Esses isolados foram os mesmos onde se encontrou concentração durante o crescimento (Tabela 1), sendo que o isolado com maior variação foi o isolado UFLA CA1183, que aumentou sua concentração de 8,6 para 30,5 mL/L durante a fermentação.

A concentração de metanol ocorreu somente após 16 h de fermentação com o UFLA CA1162 com concentração de 17,6 mL/L, não sendo encontrado em nenhum outro isolado.

De acordo com Dato et al. (2005), provavelmente, a grande parte dos fragmentos que vieram do bagaço no mosto foi eliminada, e assim também a pectina, resultando em uma baixa produção de metanol no destilado.

Não foram encontrados nas amostras dos isolados isobutanol, 1-butanol, isoamílico, amílico, acetato de isoamila e butirato de propila. Em outros trabalhos nos quais foram estudados os destilados, esses compostos foram encontrados, em função da concentração durante o processo de destilação.

TABELA 3 Concentração de metabólitos secundários encontrados com os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana em 10°Brix analisados em cromatografia gasosa

Isolados	Concentração (mL/L)					
	Acetato de etila	Acetaldeído	1-Hexanol	1,3-Butanediol	1-Propanol	2,3-butanediol
UFLA	nd ¹	127,1	4,2	305,2	nd	192,9
CA116		(8 h)	(24 h)	(24 h)		(24 h)
UFLA	nd	125,1	nd	84,9	nd	191,7
CA1162		(8 h)		(24 h)		(8 h)
UFLA	25,0	190,5	4,5	154,9	30,5	192,7
CA1183	(16 h)	(16 h)	(8 h)	(16 h)	(16 h)	(16 h)
BG-1	nd	nd	20,2	58,0	nd	197,9
			(24 h)	(8 h)		(16 h)
CAT-1	nd	112,8	nd	23,5	7,0	nd
		(24 h)		(24 h)	(24 h)	
PE-2	20,6	428,2	nd	77,3	21,4	nd
	(16 h)	(8 h)		(16 h)	(24 h)	
SA-1	21,3	254,6	nd	55,3	23,0	192,4
	(24 h)	(8 h)		(24 h)	(24 h)	(16 h)
VR-1	24,0	312,3	nd	50,7	28,5	192
	(24 h)	(8 h)		(16 h)	(24h)	(24 h)

¹ nd _ não detectado

A identificação do álcool 2,3-butanediol não foi detectada durante toda a fermentação nos isolados CAT-1 e PE-2. A maior concentração de 2,3 butanediol foi encontrada no isolado BG-1 em 16 h. E a menor concentração dentre os isolados foi encontrada em UFLA CA1162 em 8 h.

Em análise de 25 cachaças em diferentes regiões do Brasil, Boscolo et al. (2000) encontraram média de isobutanol 4,9 mL/L, isoamílico 12,4 mL/L e

Butirato de propila 0,002 mL/L. Na comparação de composição de cachaça por *Saccharomyces cerevisiae* e estirpes de leveduras selvagens, Dato et al. (2005), também, encontraram concentrações de isoamílico e isobutanol em destilados.

Em análises de destilados de fermentado de caldo de cana inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*, as concentrações de butanol, hexanol e amílico estavam abaixo dos níveis de detecção. Foram encontradas concentrações de isoamílico 235,3 mL/L e isobutanol 139,33 mL/L. (Carvalho, 2004).

Em estudos de Cleto & Mutton (2004), análise em mosto de cana obtiveram-se concentrações de 3,37 mL/L de acetato de etila; 4,2 mL/L de acetaldeído; 3,03 mL/L de 1-Propanol; 14,07 mL/L de isobutanol e 29,07 de isoamílico, resultados diferentes dos encontrados neste trabalho.

Os isolados iniciaram a concentração de acetaldeído em 8 h de fermentação em pontos diferentes (Figura 14), sendo que PE-2 indicou a maior concentração nesse tempo (428,2 mL/L) e CAT-1 a menor como citadas anteriormente (77,1 mL/L). Após 16 h do início da fermentação, as concentrações se reúnem entre 70,0 a 190,0 mL/L. O isolado UFLA CA1183 apresentou maior concentração entre os isolados estudados no final da fermentação 180,1 mL/L. Os demais isolados variaram entre 82,8 a 154,1 mL/L. Pode-se observar que, durante o crescimento dos isolados, a concentração de acetaldeído aumentou gradativamente, sendo que na fermentação esses isolados diminuíram sua concentração de acetaldeído.

O acetaldeído é altamente volátil e, quando presente em excesso, produz coloração verde não desejável na bebida e aroma de maçã. Esse composto é usualmente mascarado na bebida pela adição de dióxido de enxofre (SO₂) (Osborne et al., 2000).

Em estudos realizados com 10 leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, Oliveira et al. (2005a), mostraram que os baixos níveis de acetaldeído e acetato de etila encontrados nas cachaças podem ser explicados

pela separação da fração cabeça, contendo os compostos mais voláteis, durante a destilação.

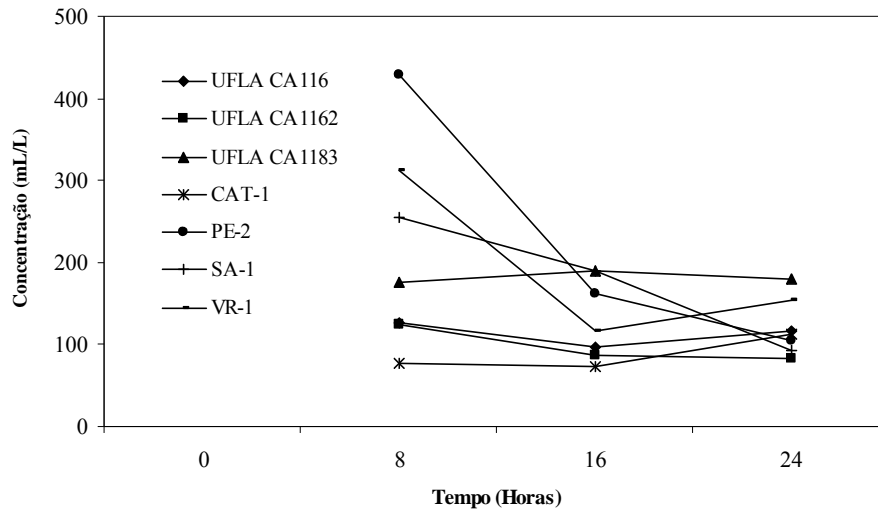


FIGURA 14 Acetaldeído durante fermentação dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana.

Acetaldeído é diretamente correlacionado com o metabolismo de leveduras na fermentação alcoólica, porque esses compostos são produzidos por descarboxilação do piruvato, que é diretamente produzido pela glicólise (Arrizon et al., 2006). O acetaldeído tende a desaparecer durante a fermentação pela oxidação em ácido acético, como citado em Yokoya (1995), os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são co-produtos normais da fermentação alcoólica. A formação desse tipo de composto é resultado da ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendem a desaparecer nas etapas finais, desde que o mosto sofra aeração, confirmando assim a diminuição neste estudo da concentração do acetaldeído no decorrer da fermentação.

Os aldeídos são compostos resultantes da oxidação parcial ou desidrogenação de álcoois primários. Até oito átomos de carbono apresentam aromas penetrantes, geralmente enjoativos, considerados indesejáveis em bebidas destiladas. Acima de 10 átomos de carbono apresentam aroma agradável (Maia, 1994).

Na Figura 15 o isolado UFLA CA1183 apresentou a produção do álcool 1,3-butanediol após 16 h de fermentação e com maior concentração nesse tempo, diminuindo para 62,8 mL/L no final da fermentação após 24 h, durante o crescimento desse isolado apresentou a maior concentração em 24 h (150,5 mL/L). Os isolados PE-2, SA-1 e VR-1 iniciaram a fermentação na mesma concentração de 1,3-Butanediol sendo que PE-2 aumentou em 16 h para 77 mL/L, VR-1 manteve-se em 51 mL/L e SA-1 decresceu para 31 mL/L. Ao chegar em 24 h de fermentação, o isolado PE-2 diminuiu até 39,0 mL/L, assim como VR-1, sendo a menor concentração no tempo final (15 mL/L) e SA-1 aumento para 55 mL/L e durante o crescimento o isolado PE-2 foi o isolado com maior concentração de 1,3-butanediol entre os isolados (168,8 mL/L). O isolado CAT-1 manteve sua concentração desde 8 h da fermentação até o final com 24 h. O isolado com maior concentração de 1-3, butanediol foi UFLA CA116 no final da fermentação, diferente do seu crescimento em caldo de cana a 5°Brix onde essa concentração foi de 47 mL/L somente em 12 h (Tabela 2) O isolado BG-1 apresentou média de 54,9 mL/L durante crescimento e o isolado UFLA CA1162 apresentou somente 84,9 mL/L após 24 h de fermentação.

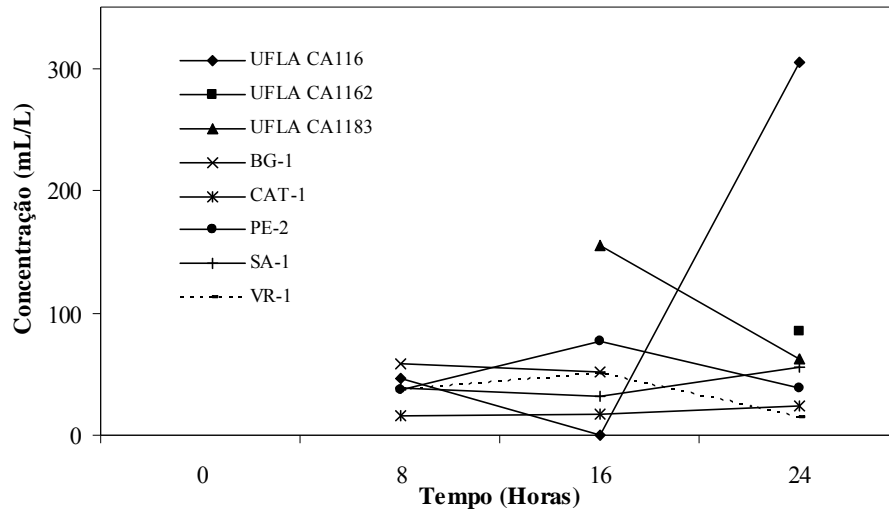


FIGURA 15 1,3-Butanediol durante fermentação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

A concentração do álcool 2,3 butanediol, durante a fermentação dos isolados (Figura 16), não foi encontrada nos isolados CAT-1 e PE-2. E somente nos tempos 8 h no isolado UFLA CA1162 e após 24 h de fermentação no isolado VR-1. A maior concentração de 2,3 butanediol encontrada no final da fermentação foi no isolado UFLA CA116 (192,9 mL/L) e a menor concentração foi no isolado SA-1 (191,6 mL/L).

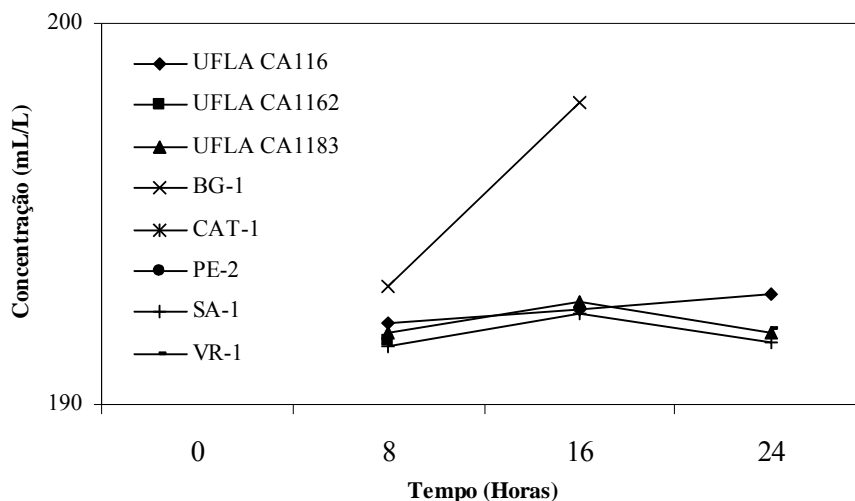


FIGURA 16 2,3-Butanediol durante fermentação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

As concentrações encontradas neste estudo foram menores que as verificadas em outros trabalhos, pelo fato das amostras deste trabalho serem do vinho e não terem sido destiladas. Por esse motivo encontraram-se valores menos concentrados.

Na análise de 1-propanol (Figura 16), os isolados PE-2 e SA-1 apresentaram comportamento semelhante, iniciando a fermentação com concentração de 11,4 e 12,5 mL/L, respectivamente. O isolado UFLA CA1183 iniciou com maior concentração em 8 horas, dentre os isolados, mas também em 16 horas elevou para 30,5, decrescendo até 21,4 mL/L após 24 horas. O isolado VR-1 atingiu 28,5 mL/L no final da fermentação. O isolado CAT-1 manteve a concentração de 1-propanol, sendo encontrado durante o crescimento somente após 84 horas. Não foram encontradas concentrações de 1-propanol nas amostras dos isolados UFLA CA116, UFLA CA1162 e BG-1 durante a fermentação.

De acordo com resultados de Cardoso et al. (2004) em estudo com amostras de 18 cachaças coletadas em diversos locais do Brasil, foram encontradas concentrações representativas de 1-propanol de 98,8 a 282,8 mL/L.

Os valores encontrados neste trabalho foram de amostras de mosto fermentado, onde ocorreu uma concentração 6 vezes inferior destes metabólitos em relação à cachaça. Observou-se que as amostras, quando concentradas, foram semelhantes ao trabalho de Cardoso et al. (2004).

Estudos de Dato et al. (2005), em análises de álcoois superiores, revelaram que *Saccharomyces cerevisiae* produziu menores níveis de propanol comparada às outras leveduras estudadas.

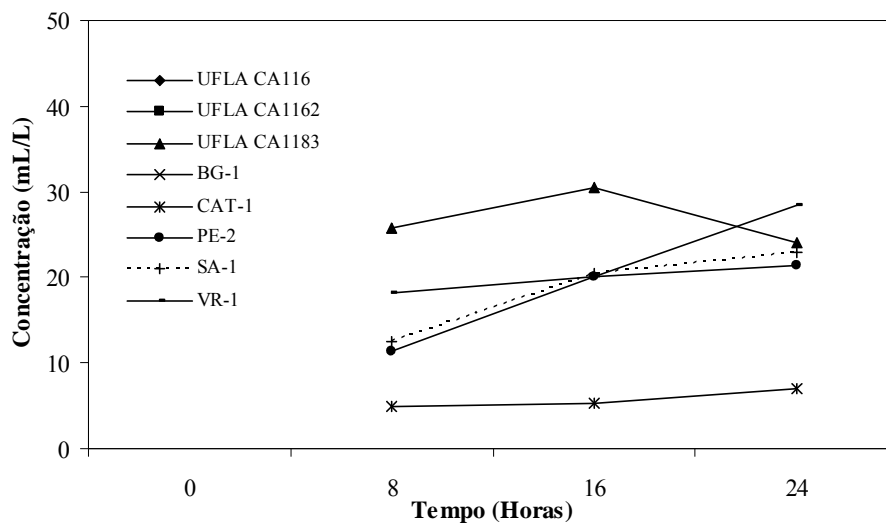


FIGURA 17 1-Propanol durante fermentação dos isolados de *S. cerevisiae*.

Os isolados PE-2 e SA-1 (Figura 18) apresentaram acetato de etila após 16 h começando em 20,6 e 18,6 mL/L, respectivamente, terminando a fermentação com 20,5 e 21,3 mL/L. O isolado UFLA CA1183 apresentou a

maior concentração de acetato de etila entre os isolados estudados (25 mL/L), diminuindo no final da fermentação chegando a 22,8 mL/L. Já o isolado VR-1 começou a menor concentração chegando a 24 mL/L no final sendo a maior concentração de acetato de etila. Não foram detectadas concentrações nas amostras de fermentação dos isolados UFLA CA116, UFLA CA1162, BG-1 e CAT-1. Durante o crescimento foram encontradas concentrações somente nos isolados PE-2 e SA-1, mais baixas que em relação à fermentação (Tabela 1).

Em análises de cachaças de diferentes regiões do Brasil: Caninha da Roça (SP), Caranguejo (CE), Chave de Ouro (CE), Pirassununga 51 (SP), Jamel (SP), Oncinha (SP), Pitu (SP), Velho Barreiro (SP), Ypioca Ouro (CE), Ypioca Prata (CE), Germana (MG), Ganyvit (SP), São Francisco (RJ), Marquesi (SP), Massayo (AL), Azuladinha (AL), Trinca 3 (CE), Vila Velha (SP), Box 32 (SC), Lua Cheia (MG), Cavalinho (SP), Salinas (MG), Baronesa (MG), Bodoco (MG) e Sapupara (CE), foi encontrada concentração média de 2,13 mL/L de acetato de etila (Boscolo et al. 2000). O principal éster da aguardente é o acetato de etila, o qual, em pequenas concentrações, incorpora um aroma de frutas à bebida, que é desejável. Em quantidades excessivas, porém, confere aroma indesejável e enjoativo (Maia, 1994). Neste trabalho foi observado um valor superior ao encontrado em estudo de Boscolo et al. (2000), sendo utilizadas amostras de cachaças de diferentes regiões. Isso pode ter acontecido porque as amostras foram selecionadas somente da parte do coração sendo dispensada a primeira fração do destilado (cabeça), onde se encontra uma grande quantidade de ésteres.

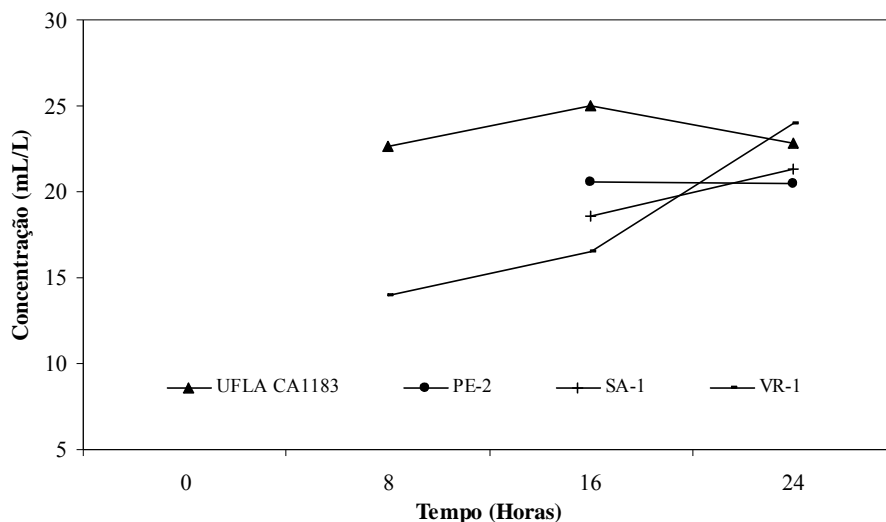


FIGURA 18 Acetato de etila durante fermentação dos isolados de *S. cerevisiae*.

A baixa concentração de acetato de etila é favorável em que a influência da concentração do acetato etila no aroma pode ser negativa em concentrações maiores que $134,5 \text{ mL.L}^{-1}$.

De acordo com estudos de Klosowski & Czuprynski (2006), o nível de concentração dos ésteres em destilados depende principalmente da ocorrência de ésteres etil e metil de ácido acético. Este particular interesse em ésteres de álcoois superiores (ex: acetato isoamílico, acetato isobutil, hexanato etil), que são ausentes durante as primeiras horas de fermentação, confirmando a ocorrência do acetato de etila somente na fermentação Ough (1996), citou que a maioria dos ésteres voláteis se forma durante a fermentação. Os resultados obtidos confirmaram essa quantidade predominante de ésteres produzidos na principal fase da fermentação. Devido à destilação seguir o processo da fermentação, compostos secundários da fermentação produzidos por leveduras podem ser concentrados nas bebidas destiladas (Meinl, 1995 citado por Schehl et al., 2005).

Na fermentação foi avaliada, também, a concentração de etanol. De acordo com a Figura 19, pode-se observar que as concentrações de etanol nos isolados de *S. cerevisiae*, durante a fermentação em caldo de cana, o isolado SA-1 foi o que obteve a maior concentração entre os isolados (254,25 mL/L). O isolado UFLA CA1162 foi o que apresentou menor concentração de etanol entre os isolados estudados variando de 149,8 a 168,43 mL/L. Os isolados PE-2 e SA-1 tiveram comportamento semelhante atingindo 252 e 254 mL/L, respectivamente.

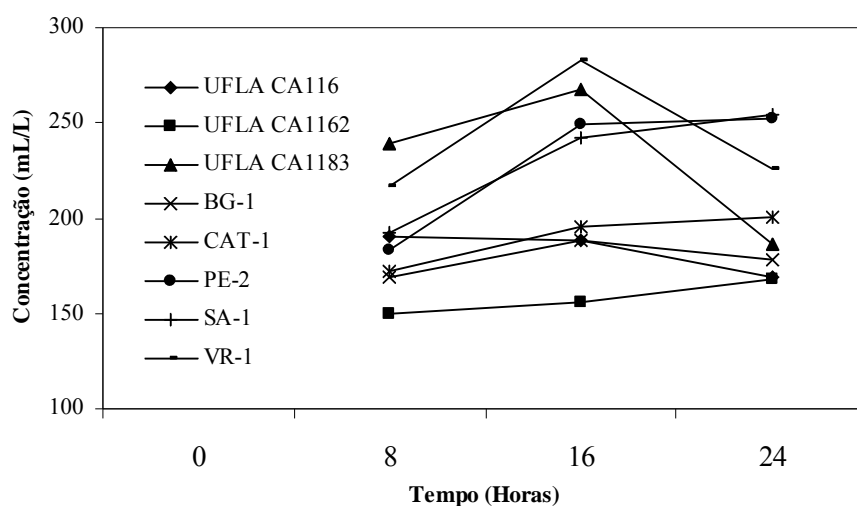


FIGURA 19 Etanol durante fermentação dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados do estudo de Dato et al. (2005) foram similares aos obtidos nesta pesquisa, uma vez que as linhagens de *S. cerevisiae* produziram quantidades diferentes de compostos secundários.

Os álcoois superiores não apresentaram um problema constante na produção de aguardente e sua presença é importante na oleosidade, sabor e

aroma da bebida. Em uma aguardente de boa qualidade, os álcoois superiores e ésteres devem estar presentes em uma proporção bem equilibrada. À medida em que a cadeia carbônica dos álcoois aumenta, esses podem tornar-se oleosos, modificando o aroma da aguardente, lembrando fortemente aroma de flores, desvalorizando a bebida (Cardoso, 2006).

4 CONCLUSÕES

Os isolados de *S. cerevisiae* indicaram diferenças na produção de metabólitos secundários, durante o seu crescimento e fermentação em caldo de cana.

Os isolados UFLA CA116, UFLA CA1162, BG-1 e CAT-1 obtiveram comportamento semelhante na maioria das análises realizadas 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, presença de 1,3 butanediol e produção média de acetaldeído em relação aos outros isolados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P. M. **Aspectos físico-químicos de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho.** 2004. p. 73 Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- AMORIM, H. V. de **Fermentação Alcoólica _ Ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.
- ANDRADE, L. A. de B. Cultura da cana de açúcar **Produção artesanal de cachaça de qualidade. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003.**
- ANGELINO, S. A. G. F. Beer. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverages.** New York: Marcel Dekker, 1991, Cap. 16, p. 518-615.
- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E.; BERZON, W.; SCENEDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção alimentos.** São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 4, 523 p.
- ARRIZON, J.; FIORE, C.; ACOSTA, G.; ROMANO, P.; GSCHAEDLER, A. Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 89, n. 1, p. 181-189, Jan. 2005.
- ARRIZON, J.; CALDERÓN, C. ; SANDOVAL, G. Effect of different fermentation conditions on the kinetic parameters and production of volatile compounds during the elaboration of a prickly pear distilled beverage. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, n. 11, p. 921-928, Nov. 2006.
- BELTRAN, B. H. R. Destilação: a arte de “extrair virtudes”. **Química Nova na Escola, São Paulo**, n. 4, p. 24-27, nov. 1996.
- BELTRAN, G.; NOVO, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 625-632, Mar. 2004

BERTHELIS, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F.F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, n. 7, p. 683-689, May 2004.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 623-627, out./dez. 2000.

BOSCOLO, M.; BEZERRA, C. W. B.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 86-90, Jan./Fev. 2000.

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.

BRASIL. Decreto n. 2314, 4 set. 1997. Regulamenta a lei n. 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 19549, 5 de set. 1997.

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.

CAMPOS, C. R. **Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça**. 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavra.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 169-175, maio/jul. 1998.

CARDOSO, D. R.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LEITE-NETO, A. F.; ISIQUE, W. D.; FERREIRA, M. M.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparison between Cachacüa and Rum Using Pattern Recognition Methods. **Journal Agricultural and Food Chemistry, Washington**, v. 52, n. 11, p. 3429-3433, June 2004.

CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p.

CARVALHO, F. P. **Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação da cachaça artesanal**. 2004. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CLEMENT-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. LASW e RODRÍGUEZ-VICO, F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 301-308, Feb. 2005.

CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Rendimento e composição das aguardentes de Cana, laranja e uva com utilização de Lecitina no processo fermentativo. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 28, n. 3, p. 577-584, maio/jun. 2004

DATO, M. C. F.; PIZAURO JÚNIOR, J. M. E MUTTON, M. J. R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of “Cachaça” **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 70-74, Jan./Mar. 2005.

ESTÉVEZ, P.; GIL, M. L.; FALQUÉ, E. Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 61–69, Jan. 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de Análises Estatísticas de Variância para Dados Balanceados; programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA, 2000.

FIALHO, C. J. **Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana de açúcar**. 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FIORÉ, C.; ARRIZON, J.; GASCHAEDLER, A.; FLORES, J.; ROMANO, P. 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.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology, Oxford**, v. 86, n. 1-2, p. 11 - 22, Sept. 2003.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANE, W.; SCHEMEDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 4, 523 p.

JERONIMO, E. M.; CARDELLO, H. M. A. B.; SERRA, G. E. Perfil sensorial de aguardente de cana em função da diluição e variação da acidez da amostra. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 51-64, jan./jun. 2004.

KLOSOWSKI, G.; CZUPRYNSKI, B. Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 242–246, Feb. 2006.

LAROUSSE **Grande Enciclopédia Larousse Cultural**. São Paulo: Nova Cultural, 1998.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-39. (Série Biotecnologia Industrial).

LIMA, A. K. S.; NÓBREGA, I. C. C. Avaliação de parâmetros de qualidade em aguardentes de cana produzidas no estado da Paraíba. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2004.

LOPES, C. A.; BROOCK, M. VAN; QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 4, p. 608-615, 2002.

LYONS, T. P.; ROSE, A. H. Whisky. In: ROSE, A. H. **Alcoholic Beverages**. London: Academic, 1977. v. 1, chap. 10, p. 635-691.

MAIA, A. B. R. A. Componentes secundários da aguardente **Stab, Açúcar. Álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-33, jul/ago. 1994.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “Serra Gaúcha” (RS)” **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 453-458. jul./set. 2004.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 64-72, jan./abr. 1998.

MARTINELLI, D. P.; SPERS, E. E.; COSTA, A. F. Ypioca: Introduzindo uma bebida genuinamente brasileira no mercado global. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL PENSA DE AGRIBUSINESS, 10., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: PENSA/FIA/UPS, 2000.

MENDONÇA, A. T. **Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentação espontânea de cana-de-açúcar** 1999. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOGUEIRA, L. Cachaça de Minas. **Revista Minas faz Ciência**, Belo Horizonte, n. 7, P. 14-16, jun./ago. 2001.

OLIVEIRA, E. R. de A. **“Marvada Pinga”:** produção de cachaça e desenvolvimento em Salinas, norte de Minas Gerais. 2000. 178 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

OLIVEIRA, E. S.; CARDELLO, H. M. A. B.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G. E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, n. 5, p. 707-715, July 2005a.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, n. 8-9, p. 1569-1576, Dec. 2005b.

OSBORNE, J. P.; ORDUÑA, R. M. de.; PILONE G. J.; LIU, S. Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enologia**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena; Maria Dolorez Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p.

PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ROSA, C. A.; SCWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PEISINO, G. **Avaliação de leveduras industriais em diferentes condições de fermentação alcoólica**. 1986. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Escola Superior de Agricultura “Luis Queiroz”, Piracicaba.

POZO-BAYÓN, M. A.; PUEYO, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, A. J.; POLO, M. C. Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 54, n. 4, Apr. 2003.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidade de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, maio/ago. 1999.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAÑA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 181–188, Sept. 2003.

ROMANO, P.; PARAGGIO, M.; TURBANTI, L. Stability in by-product formation as a strain selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 336-341, Mar. 1998 a.

ROMANO, P.; LINI, V. B.; ANSALONI, C.; MENZIANI, E. The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 14, n. 5, p. 649-653, October 1998b.

SANTAMARÍA, P.; GARIJO, P.; LÓPEZ, R.; TENORIO, C.; GUTIÉRREZ, A. R. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 49– 56, Aug. 2005.

SCHEHL, B.; LACHENMEIER, D.; SENN, T.; HEINISCH, J. J. Effect of the stone content on the quality of plum and cherry spirits produced from mash fermentation with commercial and laboratory yeast strains. **Journal Agricultural and food chemistry**, Washington, v. 53, n. 21, p. 8230-8238, Oct. 2005.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. de. **Fermentação**: produção artesanal de cachaça de qualidade. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003.

SILVA FILHO, E. A.; MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, K. B.; RESENDE, A. do O.; SIMÕES, D. A.; MORAIS JUNIOR, M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 32, n. 10, p. 481-486, Oct. 2005.

SIMAS, L. A. **Revista Estudos Afro-Asiáticos**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, 2003.

SOUZA, M. A. de 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.

STRAUSS, C. J.; KOCK, J. L. F.; VILJOEN, B. C.; BOTES, P. J.; HULSE, G.; LODOLO, E. Lipid turnover during inverse flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* UOFS Y-2330. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 110, n. 3, p. 207-212, 2004.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

VASCONCELOS, Y. Cachaça sem mistério. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 87, p.74-77, maio 2003.

VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. M.; SANTOS, A. N. G.; COUTRIM, M. X.; BRANDÃO, R. L. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 51–59, Apr. 2006.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995. 283 p.

ANEXO

TABELA 1A. Desvio padrão da avaliação do crescimento populacional dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B	67
TABELA 2A. Desvio padrão da avaliação da taxa de floculação dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B.....	67
TABELA 3A. Desvio padrão da avaliação de sólidos solúveis totais (Brix) dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B	68
TABELA 4A. Desvio padrão da avaliação de acidez titulável dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B.....	68
TABELA 5A. Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de acetaldeído dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B	69
TABELA 6A. Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de 1,3 butanediol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B	69
TABELA 7A Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de 1 propanol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B	70
TABELA 8A. Desvio padrão da avaliação do crescimento populacional dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B	70
TABELA 9A. Desvio padrão da avaliação da taxa de floculação dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B.....	71
TABELA 10A. Desvio padrão da avaliação de sólidos solúveis totais (Brix) dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B	71

TABELA 11A. Desvio padrão da avaliação da acidez titulável dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B.....	72
TABELA 12A. Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de acetaldeído dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B..	72
TABELA 13A. Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de 1,3 butanediol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B..	73
TABELA 14A. Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de 1 propanol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B.....	73
TABELA 15A. Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de acetato de etila dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B	74
TABELA 16A. Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de etanol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B	74
TABELA 17A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de etanol dos isolados de <i>S. cerevisiae</i> coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B	75

TABELA 1A Desvio padrão da avaliação do crescimento populacional dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	7,85	8,00	8,28	8,28	8,13	8,30	8,17	8,38	0,177
CA1162	6,10	7,06	7,15	7,25	8,33				0,792
CA1183	6,71	8,18	8,76	8,84	8,84				0,913
BG-1	7,26	7,53	7,54	7,98	8,08	7,47	7,71	8,22	0,336
CAT-1	6,65	7,33	7,72	7,81	7,76	7,65	7,86	8,27	0,474
PE-2	7,35	8,36	8,77	8,80	8,76				0,619
SA-1	7,06	8,26	8,66	8,71	8,82				0,726
VR-1	7,20	8,27	8,77	8,79	8,93				0,712

TABELA 2A Desvio padrão da avaliação da taxa de floculação dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	0,174	0,152	0,357	0,358	0,408	0,226	0,115	0,392	0,119
CA1162	0,072	0,067	0,067	0,199	0,113				0,057
CA1183	0,081	0,094	0,073	0,043	0,075				0,019
BG-1	0,050	0,045	0,021	0,037	0,028	0,054	0,03	0,046	0,012
CAT-1	0,055	0,099	0,124	0,041	0,024	0,036	0,050	0,034	0,035
PE-2	0,055	0,070	0,078	0,090	0,076				0,013
SA-1	0,029	0,056	0,062	0,059	0,081				0,019
VR-1	0,118	0,137	0,118	0,123	0,132				0,009

TABELA 3A Desvio padrão da avaliação de sólidos solúveis totais (Brix) dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	5,46	5,26	4,63	4,4	3,63	3,56	3,53	3,23	0,850
CA1162	5,53	4,9	4,73	4,23	3,96				0,611
CA1183	5,2	3,86	3,13	3,16	2,53				1,023
BG-1	5,2	4,86	4,2	3,63	3,2	2,73	2,36	2,23	1,122
CAT-1	4,96	4,76	4,1	3,26	2,6	2,2	2,13		1,115
PE-2	5,33	3,73	2,53	2,6	2				1,329
SA-1	5,1	3,03	2,33	2,6	1,96				1,235
VR-1	5,36	3,3	1,83	1,93	1,76				1,547

TABELA 4A Desvio padrão da avaliação de acidez titulável dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	0,019	0,02	0,045	0,054	0,06	0,064	0,065	0,079	0,022
CA1162	0,025	0,047	0,059	0,067	0,065				0,017
CA1183	0,057	0,068	0,078	0,10	0,12				0,025
BG-1	0,043	0,055	0,072	0,074	0,081	0,078	0,082	0,09	0,016
CAT-1	0,041	0,078	0,078	0,076	0,093	0,103	0,09	0,092	0,019
PE-2	0,072	0,082	0,09	0,127	0,143				0,031
SA-1	0,043	0,097	0,081	0,12	0,142				0,038
VR-1	0,086	0,092	0,119	0,129	0,137				0,023

TABELA 5A Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de acetaldeído dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116		0,0925	0,1122	0,1255	0,1739	0,1929	0,1930	43,750
CA1162		0,0862	0,0827	0,1395				31,831
CA1183		0,0878	0,0927	0,0947				3,550
BG-1			0,0863	0,1084	0,0899	0,0782	0,1220	17,842
CAT-1		0,0896	0,1115	0,1093	0,1287	0,1239	0,1222	17,756
PE-2	0,0921	0,1060	0,1323	0,1263				18,526
SA-1			0,1179	0,0902				19,587
VR-1	0,0811	0,0927	0,0799	0,0830				5,825

TABELA 6A Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de 1,3 butanediol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	47,0							---
CA1162	29,9	96,3						46,952
CA1183		150,5	50,5	82,7				51,045
BG-1						31,7		---
CAT-1		107,1	71,5	50,0	0,0	74,6	59,5	35,392
PE-2	117,0	121,6	129,8	168,8				23,601
SA-1	68,6	56,8	87,1	148,2				40,644
VR-1		40,9	36,3					3,253

TABELA 7A Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de 1 propanol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	6,5	9,4	7,8	8,6				1,237
CA1162								
CA1183								
BG-1								
CAT-1								
PE-2	7,8	8,6	8,8	9,0				0,526
SA-1	6,5	8,6	6,9	5,7				1,223
VR-1	7,5	9,7	10,2	8,7				1,193

TABELA 8A Desvio padrão da avaliação em cromatografia gasosa de Etanol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante crescimento inoculados em caldo de cana a 5°B

Isolados	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	Desvio padrão
CA116	158,24	154,23	174,48	165,85	187,44	185,33	198,23	16,315
CA1162	153,66	156,51	164,59	186,78				23,419
CA1183	167,82	190,14	209,90	224,13				39,817
BG-1	150,10	162,39	167,81	176,63	187,08	192,64	199,19	17,601
CAT-1	156,57	165,88	175,93	170,80	191,14	212,97	227,83	26,162
PE-2	164,67	182,09	184,70	192,99				11,906
SA-1	187,10	233,15	224,66	231,27				21,606
VR-1	177,16	195,28	201,11	196,28				10,511

TABELA 9A Desvio padrão da avaliação do crescimento populacional dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	0h	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	6,78	8,26	8,50	8,80	0,898
CA1162	7,40	7,94	8,12	8,10	0,336
CA1183	7,15	8,00	8,10	8,07	0,455
BG-1	8,03	7,79	7,85	8,06	0,133
CAT-1	8,11	8,10	7,98	8,04	0,060
PE-2	7,48	7,99	7,99	7,96	0,250
SA-1	7,42	8,03	8,04	7,97	0,298
VR-1	7,47	7,96	8,06	8,08	0,287

TABELA 10A Desvio padrão da avaliação da taxa de floculação dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	0h	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	0,042	0,081	0,167	0,147	0,058
CA1162	0,000	0,112	0,123	0,180	0,075
CA1183	0,191	0,068	0,063	0,120	0,061
BG-1	0,127	0,077	0,215	0,099	0,019
CAT-1	0,112	0,099	0,074	0,075	0,060
PE-2	0,189	0,085	0,095	0,018	0,070
SA-1	0,162	0,078	0,086	0,042	0,050
VR-1	0,159	0,054	0,076	0,096	0,045

TABELA 11A Desvio padrão da avaliação de sólidos solúveis totais (Brix) dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	0h	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	8,8	8,86	8,96	7,93	0,476
CA1162	9,1	9,4	8,5	9,1	0,377
CA1183	9,6	7,5	4,8	3,6	2,699
BG-1	9,5	8,8	7,83	7,6	0,882
CAT-1	9,2	9	7,76	7,53	0,849
PE-2	10,1	7,46	4,23	3,4	3,081
SA-1	10,5	7,13	4,13	3,4	3,238
VR-1	9,7	5,5	3,7	3,3	2,927

TABELA 12A Desvio padrão da avaliação da acidez titulável dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	0h	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	0,083	0,115	0,085	0,137	0,026
CA1162	0,082	0,064	0,075	0,072	0,007
CA1183	0,156	0,167	0,152	0,189	0,017
BG-1	0,058	0,084	0,121	0,133	0,034
CAT-1	0,062	0,093	0,121	0,133	0,032
PE-2	0,14	0,175	0,184	0,173	0,019
SA-1	0,16	0,171	0,203	0,21	0,024
VR-1	0,172	0,203	0,189	0,173	0,015

TABELA 13A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de acetaldeído dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	127,1	97,8	115,9	14,785
CA1162	125,1	86,6	82,8	23,402
CA1183	176,6	190,5	180,1	7,230
BG-1				
CAT-1	77,1	73,4	112,8	21,758
PE-2	428,2	161,4	104,1	172,967
SA-1	254,6	190,3	92,3	81,731
VR-1	312,3	116,2	154,1	104,018

TABELA 14A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de 1,3 butanediol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	45,8	0,0	305,2	164,587
CA1162			84,9	
CA1183		154,9	62,8	65,125
BG-1	58,0	51,9		4,313
CAT-1	15,6	17,0	23,5	4,215
PE-2	37,7	77,3	39,1	22,470
SA-1	39,0	31,4	55,3	12,211
VR-1	37,1	50,7	15,0	18,018

TABELA 15A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de 1 propanol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116				
CA1162				
CA1183	25,8	30,5	24,1	3,315
BG-1				
CAT-1	5,0	5,3	7,0	1,079
PE-2	11,4	20,1	21,4	5,437
SA-1	12,5	20,5	23,0	5,485
VR-1	18,2	20,1	28,5	5,481

TABELA 16A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de acetato de etila dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116				
CA1162				
CA1183	22,6	25,0	22,8	1,332
BG-1				
CAT-1				
PE-2		20,6	20,5	0,071
SA-1		18,6	21,3	1,909
VR-1	14,0	16,5	24,0	5,204

TABELA 17A Desvio padrão da avaliação de análise cromatográfica de etanol dos isolados de *S. cerevisiae* coletados durante fermentação inoculados em caldo de cana a 10°B

Isolados	8h	16h	24h	Desvio padrão
CA116	190,82	188,25	168,57	12,172
CA1162	149,80	156,16	168,43	9,470
CA1183	239,15	267,66	185,93	41,483
BG-1	168,67	188,04	178,45	9,685
CAT-1	171,94	195,60	200,97	15,445
PE-2	182,85	249,47	252,13	39,253
SA-1	192,53	241,79	254,25	32,637
VR-1	216,98	283,07	225,81	35,881