

**INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E
Lactobacillus fermentum NA PRODUÇÃO DE
CACHAÇA ARTESANAL**

MÁRCIO VINÍCIUS FERREIRA DE SOUSA

2005

MÁRCIO VINÍCIUS FERREIRA DE SOUSA

**INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Lactobacillus fermentum* NA
PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Sousa, Márcio Vinícius Ferreira de

Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na
produção de cachaça artesanal / Márcio Vinícius Ferreira de Sousa - Lavras :
UFLA, 2005.

69 p.: il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Fermentação alcoólica. 3. Microrganismo. 4. Interação. 5.
Bebida. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.53

MÁRCIO VINÍCIUS FERREIRA DE SOUSA

**INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Lactobacillus fermentum* NA
PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de maio de 2005.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

UFLA

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

ESALQ/USP

Prof^ª. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

*À minha esposa Andréssa,
a nossos filhos João Lucas e
Pedro Vinícius, pela paciência,
amor e incentivo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Matias, Marlene e irmãos (Marcos, Mônica, Marta e Marcelo), por reconhecerem meu esforço.

À minha esposa, Andrêssa e nossos filhos, João Lucas e Pedro Vinícius, pela compreensão durante minha ausência.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação e oportunidade dada na realização deste trabalho.

Aos professores: Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, Dr. Henrique César Pereira Figueiredo e Dr. Luiz Carlos Basso, pelas sugestões na melhoria deste trabalho.

À Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa, ES, minha instituição de ensino, por oportunizar a seus servidores qualificação.

A todos da Agrotécnica de “Barracão”, que acreditaram e torceram pelo meu sucesso, muito obrigado.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização deste curso de mestrado.

A todo o corpo docente e administrativo dos Departamentos de Biologia e Ciência dos Alimentos, pelos materiais concedidos para a realização deste experimento.

À CAPES, por meio do PICDTec., pela concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela gentileza em permitir a realização das análises físico-químicas e cromatográficas no laboratório de cachaça.

Ao Fernando, Flávio e Masson, pela ajuda importante nas análises físico-químicas e cromatográficas.

Ao Sr. Antônio Claret Sales e funcionários, pelo fornecimento do caldo de cana.

Ao Tenente Fonseca, Cleivan e Ildo, pela grande ajuda na finalização deste experimento.

Aos meus ex-alunos e agora amigos Eliton e Viviane (Cantina Matiello/ Santa Teresa, ES), obrigado pelo carinho e amizade.

A meu compadre e educador da Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa, “Chico Daleprane”, pelo estímulo e amizade.

À minha sogra, Maria Elena e meus cunhados, Ângelo e Maris, obrigado pelo incentivo.

A meu amigo Whasley, pela amizade e presença em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu grande amigo e companheiro de UFRRJ e UFLA, João Vicente Neto “Penra”, pela ajuda e amizade.

Às funcionárias e amigas Ivani, Maria Aparecida (Cidinha) e Magda, muito obrigado pela ajuda, amizade e paciência.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ailton, Celeide, Fabiano, Jupyracyara, Luizinho, Mariá, Nélio, Rita, Simone, Sueli e Vanderlei.

Aos colegas de Agrotécnica, João Borges, Débora, Laureano e Marcelo, pela amizade e convivência em Lavras.

Aos colegas de laboratório: Aramália, Fernanda, Evânia, Luana, Sheila, Euziclei, “Val”, Miriam, Ana Paula, Márcia, “Graça”, Plínio, Carla, Ana Lúcia, Luziane, Patrícia, Danielle, Caio, Leandro, Gabriela, Claudinha, Félix, Sandra, Thaís, Nina e Rômulo, pela amizade e companhia.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para essa vitória.

Muito obrigado.

BIOGRAFIA

MÁRCIO VINÍCIUS FERREIRA DE SOUSA, filho de Matias Evangelista de Sousa e Marlene Ferreira de Sousa, nascido na cidade do Rio de Janeiro, RJ, em 8 de agosto de 1963, casado com Andrêssa Paula Fadini de Sousa e pai de João Lucas Fadini de Sousa e Pedro Vinícius Fadini de Sousa.

Engenheiro Agrônomo e Licenciado em Ciências Agrícolas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (1995 e 1996), com especialização em Tecnologia e Processamento de Sucos e Polpas Tropicais pela Universidade Federal do Ceará (1999) e Plantas Ornamentais e Paisagismo pela Universidade Federal de Lavras (2001).

Funcionário técnico administrativo (Porteiro) da UFRRJ de 1992 a 1997 e professor efetivo, por concurso público, da Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa, ES, desde abril de 1997. Fez o Mestrado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Lavras defendendo a dissertação em maio de 2005.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Bebidas alcoólicas.....	3
2.2 Cachaça.....	4
2.3 Cana-de-açúcar	5
2.4 Fermentação alcoólica	6
2.5 Microrganismos envolvidos na fermentação	9
2.5.1 Leveduras selecionadas.....	11
2.5.2 Bactérias lácticas	13
2.5.3 Processo fermentativo.....	19
2.6 Destilação	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Microrganismos	25
3.2 Reativação dos inóculos.....	25
3.2.1 Levedura.....	25
3.2.2 Bactéria.....	25
3.3 Preparo dos inóculos e adaptação dos microrganismos	26
3.4 Cana-de-açúcar e preparo do mosto.....	26
3.5 Avaliação da eficiência de dois meios na multiplicação de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1407.....	27
3.5.1 Inoculação	27
3.5.2 Análises realizadas	27
3.5.2.1 Análise microbiológica.....	27
3.5.2.2 Análise química.....	28
3.6 Avaliação da interação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> na fermentação da cachaça artesanal.....	28
3.6.1 Cana-de-açúcar e preparo do mosto	28
3.6.2 Preparo dos inóculos	28
3.6.3 Fermentação em frascos	29
3.6.4 Fermentação em dornas.....	29
3.6.5 Processo fermentativo	29
3.6.6 Destilação	30
3.6.7 Amostragem	30
3.6.7.1 Análise microbiológica.....	31

3.6.7.2 Análises químicas.....	31
3.6.7.3 Análise sensorial.....	32
3.6.7.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de Lactobacillus fermentum CCT 1407.....	35
4.2 Avaliação da interação de S. cerevisiae CA 116 e L. fermentum CCT 1407 na fermentação da cachaça artesanal.....	38
4.2.1 Avaliação do crescimento.....	38
4.2.2 Avaliação do teor de açúcares redutores.....	44
4.2.3 Avaliação do pH.....	46
4.2.4 Análise físico-química e cromatográfica da cachaça artesanal.....	48
4.2.5 Análise sensorial da cachaça artesanal.....	53
5 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	67

RESUMO

SOUSA, Márcio Vinícius Ferreira de. **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal.** 2005. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG¹.

A produção nacional de aguardente é estimada em 1,5 bilhão de litros por ano, dos quais 90% são de origem industrial e 10% artesanal. Esta é uma bebida destilada oriunda da fermentação natural do caldo de cana-de-açúcar, com graduação alcoólica variando entre 38 a 48% de etanol (v/v). A população microbiana existente no mosto compreende leveduras e bactérias, as quais interagem durante o processo de fermentação. Trabalhos realizados no isolamento da microbiota do mosto em dornas de fermentação alcoólica demonstram que o gênero de bactérias predominante é o *Lactobacillus*, sendo o *Lactobacillus fermentum* uma das espécies mais freqüente. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência de meios de cultivo na multiplicação de *Lactobacillus fermentum* 1407 e a interação de *Saccharomyces cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* durante a fermentação na qualidade do destilado final. A fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyers de 2.000 mL inoculados com CA116 e CCT 1407 isoladamente e co-incubados, e em dornas CA116 isoladamente e co-incubadas com CCT 1407. Observou-se que o meio com caldo de cana 5 °Brix + 1% de extrato de levedura teve eficiência semelhante no crescimento da cepa de *L. fermentum*, quando comparado com o meio MRS. Em geral, a co-incubação com *L. fermentum* não influenciou o crescimento de *S. cerevisiae*. O microrganismo *L. fermentum* não competiu com *S. cerevisiae* pelo consumo de açúcares redutores. A co-incubação de *L. fermentum* com *S. cerevisiae* não contribuiu para o abaixamento do pH. *S. cerevisiae* reprimiu o crescimento de *L. fermentum* durante a co-incubação, ocasionando morte celular desta bactéria após 12 horas. As concentrações de álcoois superiores foram abaixo de 300mg/mL de álcool anidro. A presença de *L. fermentum* durante a fermentação alcoólica interferiu negativamente na qualidade sensorial da cachaça artesanal.

Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA.

ABSTRACT

SOUSA, Márcio Vinícius Ferreira de. **Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* in the production of artisanal cachaça.** 2005. 69 p. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras - Lavras - MG ².

The production of Brazilian sugar-cane spirit (cachaça) is estimated at 1,5 billion liters a year being 90% industrial and 10% artisanal. The artisanal cachaça is a distilled beverage originating from natural fermentation of sugar-cane juice, with ethanol content varying from 38 to 48% (v/v). The microbial population in the must comprises yeasts and bacteria which interact during the fermentation process. Research done on microbiota of the must of alcoholic fermentation demonstrated that the genus of bacteria which predominates is *Lactobacillus*, being the *Lactobacillus fermentum* one of the most frequent species. The objectives of this work were to evaluate the efficiency of cultivation media in the multiplication of *Lactobacillus fermentum* 1407 and the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* CA 116 and *L. fermentum* CCT 1407 during the fermentation and evaluate the quality of the final beverage. The alcoholic fermentation was accomplished in erlenmeyers of 2.000mL inoculated separately with CA116 and CCT 1407 and co-incubated, and in vats CA116 separately and co-incubated with CCT 1407. The cane juice broth 5°Brix + 1% of yeast extract had the same efficiency for the growth of the *L. fermentum* when compared with MRS. The co-incubation with *L. fermentum* did not influence the growth of *S. cerevisiae*. The bacteria *L. fermentum* did not compete with the *S. cerevisiae* for the consumption of reducing sugars. The co-incubation of *L. fermentum* with *S. cerevisiae* did not contribute to reduce the pH value. *Saccharomyces cerevisiae* repressed growth of *L. fermentum* during the co-incubation causing cellular death of this bacteria after 12 hours. The concentration of higher alcohols in the beverage were below 300mg/mL of alcohol. The presence of *L. fermentum* during the alcoholic fermentation interfered negatively in the sensorial quality of the artisanal cachaça.

Committee Advisory: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Adviser), Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Co-Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A aguardente de cana, caninha ou cachaça, é uma bebida tipicamente brasileira e vem aos poucos conquistando o paladar internacional de bebidas destiladas pelo seu sabor especial e exótico. A produção de aguardente de cana no Brasil teve início no período colonial, logo após a introdução da cana-de-açúcar na capitania de São Vicente, por Martim Afonso de Souza e a montagem do primeiro engenho de açúcar.

Até a 2ª Guerra Mundial, a produção de aguardente foi conduzida por grande número de pequenos engenhos. Os processos usados até este momento foram artesanais, rústicos, rudimentares, sem características regionais ou padrões de qualidade.

A produção nacional de aguardente é estimada em 1,5 bilhão de litros por ano, sendo 90% de origem industrial e 10% de artesanal (Pereira, 2003). No estado de Minas Gerais, a produção de cachaça de alambique desempenha importante papel no agronegócio. Cerca de 8.500 destilarias artesanais empregam direta e indiretamente cerca de 240.000 pessoas, gerando renda anual estimada em R\$ 1,5 bilhão. A produção mineira de 230 milhões de litros/ano, funcionando no período de maio a novembro, representa 18% da produção nacional de aguardente (SEBRAE-MG, 2001).

O processo de fermentação consiste na transformação dos açúcares fermentáveis no mosto, constituídos de caldo-de-cana e nutrientes, em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários. Em geral, o processo de fermentação consiste em colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado na dorna de fermentação (Pataro et al., 2002). A população responsável pela fermentação do caldo é constituída normalmente por leveduras e bactérias.

Diferentes cepas de leveduras presentes nessas fermentações estão constantemente em sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana e também devido às condições de processo (Morais et al., 1997; Pataro et al., 1998; Schwan et al., 2001).

Bactérias presentes em fermentações contaminadas pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, e *Streptococcus*. Essas ao final do processo fermentativo podem produzir compostos secundários, principalmente ácidos, que irão aumentar a acidez do destilado (Gomes et al., 2002).

A contaminação bacteriana é uma das principais causas da redução na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, porém, há poucos dados referentes à caracterização das populações bacterianas presentes nas dornas de fermentação, e à relação destes microrganismos com a produção de compostos secundários, responsáveis pelo “flavour” da cachaça artesanal.

Os objetivos deste trabalho foram: i) avaliar a eficiência de meios de cultivo na multiplicação de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407; ii) avaliar a interação de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 durante a fermentação alcoólica e iii) verificar a existência de interferência desta bactéria na qualidade do destilado final.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bebidas alcoólicas

As bebidas alcoólicas são tão antigas quanto a humanidade e tão numerosas como suas etnias. Fenícios, assírios, babilônios, hebreus, egípcios, chineses, gregos, romanos e germanos mencionaram-nas e cada povo praticamente tem as suas, a partir das fontes naturais próprias de açúcares e amiláceos, como frutas, cana, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada e mesmo raízes e folhas (Aquarone et al., 2001).

De acordo com Pataro et al. (2002), a produção de aguardente comercial deve ter começado em regiões vinícolas e produtoras de bebidas fermentadas de produtos amiláceos. Coincidentemente, o destilado é denominado de “água da vida”, *acquavite* em italiano, *eau-de-vie* em francês e *uisgebeatha* em gaélico. Na Itália, o destilado de uva fica conhecido como *grappa*. Em terras germânicas, se destila, a partir da cerveja, o *kirsch*. Na Escócia, o *whisky* é destilado da cevada sacarificada. Na Rússia, a *vodka*, de centeio. Em Portugal, destilado do bagaço de uva, a *bagaceira* (Lima, 2001).

A partir da construção dos primeiros engenhos no século XVI, foi possível a obtenção de um fermentado a partir da borra do caldo de cana, que foi consumido inicialmente pelos escravos. Segundo Carvalho & Silva (1998), as técnicas de destilação foram aperfeiçoadas, ocorrendo então a popularização da cachaça e outras bebidas destiladas no velho continente.

Brasil (1997) define bebida como todo produto industrializado, destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica.

Vários são os fatores que podem interferir na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como: matéria-prima, fermentação, o método de condução do processo fermentativo, destilação e envelhecimento.

De acordo com Mendonça et al. (1999), as bebidas alcoólicas possuem características próprias de aroma e sabor conferidas pela presença de diversos constituintes oriundos do processo fermentativo. Além do etanol, compostos orgânicos, como álcoois superiores, ácidos orgânicos e ésteres, podem estar presentes e interferir em tais características.

O aparecimento das bebidas destiladas está relacionado com o surgimento dos alambiques, cujo princípio foi o de separar as substâncias voláteis entre a fase líquida e vapor do produto quente, permitindo recolher o álcool e os compostos aromáticos. Pataro et al. (2002) relataram que atualmente a aguardente está presente em todos os segmentos sociais do Brasil.

2.2 Cachaça

A aguardente de cana tem seus padrões de identidade e qualidade definidos pelo Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997 e pela Portaria nº 371 do Ministério da Agricultura, de 18 de setembro de 1974, que definiu que o coeficiente de congêneres não poderá ser inferior a 200mg/100mL de álcool anidro. Além disso, os componentes voláteis não alcoólicos da aguardente de cana deverão obedecer aos limites expressos na Tabela 1. O teor máximo de metanol permitido em cachaça é de 200mg/100mL, a 100% de álcool anidro e o conteúdo de cobre na bebida final não deve ultrapassar a 5mg/L de produto (Cardoso, 2003).

A cachaça é definida por Brasil (2003) como sendo a “denominação típica e exclusiva para aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius com características sensoriais peculiares”.

TABELA 1 Teores máximos permitidos pela legislação brasileira de cada componente volátil na aguardente

Parâmetros	Teor máximo (mg/100 mL de álcool anidro)
Acidez volátil, em ácido acético	150
Ésteres, em acetato de etila	200
Aldeídos, em aldeído acético	30
Furfural	5
Álcoois superiores	300

2.3 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence à classe das Monocotiledôneas, família Poaceae (Gramineae), gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum* spp. As principais espécies conhecidas têm sua origem na Nova Guiné, Índia e China. A cana foi introduzida no Brasil por volta de 1530, por Martin Afonso de Souza, na capitania de São Vicente e seu cultivo tem proporcionado contribuições econômicas e sociais importantes ao país. (Andrade, 2003).

O Brasil produz cerca de 421 milhões toneladas/ano de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial. O estado de São Paulo é o principal produtor, com 248 milhões toneladas/ano e Minas Gerais o quarto produtor do país, com 23 milhões toneladas/ano (Agrianual, 2005).

Durante a época do ano em que prevalecem temperaturas altas e a máxima atividade pluvial, a cana atinge grande crescimento vegetativo e acúmulo de sacarose nos internódios adultos. Ao terminar o período chuvoso e com a diminuição da temperatura, a cana adquire níveis máximos de síntese de sacarose que se armazenam no colmo, ocorrendo o que é denominado de maturidade tecnológica da cana-de-açúcar (Taupier & Rodriguez, 1999).

A composição química da cana-de-açúcar é de: 65% a 75% de água, 11% a 18% de sacarose, 0,2% a 1,0% de glicose, 0,0% a 0,6% de frutose, 8% a 14% de cinzas e o restante constituído por compostos nitrogenados, minerais, gorduras, ceras e compostos pécnicos (Santana, 1995).

Do esmagamento da cana, obtém-se o caldo, que é constituído de: 78% a 86% de água, 10% a 20% de sacarose, 0,1% a 2,0% de açúcares redutores, 0,3% a 0,5% de cinza, 0,5% a 1,0% de compostos nitrogenados e com pH entre 5,2 e 6,8 (Lima et al., 2001). Composição semelhante feita por meio de análise físico-química do caldo de cana natural, foi relatada por Carvalho (2004).

Em Minas Gerais, trabalhos de pesquisa e assistência técnica com a cana-de-açúcar, entre 1970 e 1990, foram conduzidos pelo extinto Planalsucar, órgão vinculado ao Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA), quando foram desenvolvidas variedades de cana predominantes nas regiões produtoras de cachaça (Silveira et al., 2002). Esses mesmos autores ressaltaram que o desenvolvimento de variedades de cana nas regiões produtoras de cachaça tem papel importante no aumento da produtividade da cultura e, conseqüentemente, no rendimento e na produção de cachaça de melhor qualidade.

2.4 Fermentação alcoólica

Segundo Cadwell (1995), a fermentação é um processo espontâneo, obtido devido à contaminação de microrganismos nos substratos. Por algum tempo foi considerado um processo metabólico exclusivo de microrganismo, que normalmente ocorre na ausência de oxigênio. Além disso, é um processo no qual a fosforilação ocorre em nível de substrato. Segundo o autor, na biotecnologia, o principal aspecto se refere a quais produtos poderão ser obtidos a partir da fermentação.

A grande maioria dos organismos fermentadores tem em comum o fato de metabolizar a fonte de carbono até o piruvato e, deste, sintetizar outros

compostos orgânicos que retêm energia, tais como ácido lático (fermentação láctica), ácido acético (fermentação acética), etanol (fermentação alcoólica), ácido propiônico e outros (Lehninger, 1995).

As leveduras, em condições anaeróbicas, metabolizam a glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), originando, no final do processo, etanol e gás carbônico. Cada molécula de glicose metabolizada dá origem a 2 moléculas de etanol, 2 moléculas de gás carbônico e 2 ATP, não requerendo oxigênio e uma cadeia de transporte de elétrons. O produto final é uma molécula de etanol comoceptor final de elétrons. Dessa maneira, a fermentação de um grama de glicose resulta na formação de 0,511g de etanol, porém, na prática, essa taxa de conversão nunca excede 90% a 93%. A diferença é resultante da utilização de açúcares para biossíntese de material celular de reposição e para reações de manutenção das células vivas. Além disso, parte dos açúcares é usada para reações paralelas, como formação de glicerol, ácido succínico, butanediol e outros compostos (Yokoya, 1995).

Os fungos leveduriformes possuem dois tipos de metabolismo celular: oxidativo e fermentativo (Tortora et al., 2002). O metabolismo oxidativo (respiração) ocorre na presença de oxigênio, havendo a multiplicação intensa da levedura. Na ausência de oxigênio, o metabolismo passa a ser fermentativo, ocorrendo a produção de etanol e gás carbônico.

Durante a fermentação alcoólica, a sacarose é quebrada pela invertase (exoenzima) em glicose e frutose, produzindo 4 moléculas de etanol e 4 de CO₂ (Figura 1). A glicose e a frutose são diretamente fermentadas, mas a sacarose não. Isso ocorre porque as leveduras a fermentam transformando-as em açúcar invertido por meio da inversão enzimática da sacarose (Aqarone et al., 2001).

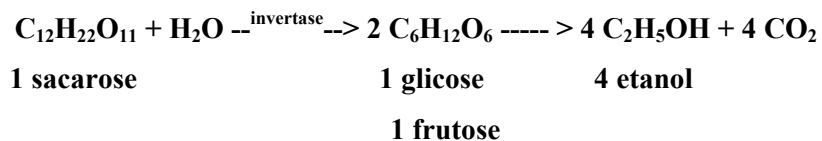


FIGURA 1 Reação geral de formação de etanol e gás carbônico a partir de sacarose

Os álcoois superiores, um dos produtos secundários da fermentação, fazem parte das substâncias que conferem qualidade e são responsáveis pelo odor da cachaça. Eles podem ser formados a partir do desvio dos aminoácidos pelas leveduras (Figura 2). O teor máximo estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é de 300mg/100 mL de álcool anidro.

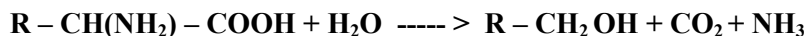


FIGURA 2 Reação geral da formação dos álcoois superiores

No caso de contaminação bacteriana, os açúcares podem ser desviados para outras vias metabólicas, resultando na formação de diversos compostos como os ácidos láctico, acético, fórmico e butírico os aldeídos e os ésteres. Estes, além de causar redução no rendimento alcoólico, provocam alterações nas propriedades sensoriais da cachaça, com conseqüente depreciação do produto.

As bactérias lácticas podem se multiplicar ao final da fermentação, utilizando o etanol como fonte de energia. No mosto, a presença dessas bactérias é devido à sua resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. Isso faz com que, ao final da fermentação, as bactérias lácticas possam produzir compostos secundários que irão aumentar os níveis de acidez da cachaça (Pataro et al., 2002). Entretanto, destiladores de uísque utilizam a fermentação láctica tardia visando, principalmente, um possível efeito benéfico no “flavour” da bebida, mas detalhes precisos deste processo são desconhecidos. A formação de ácidos láctico e acético e de outros metabólitos pode interferir no “flavour” do destilado (Van beek & Priest, 2002).

De acordo com Narendranath et al. (1997), existem poucos estudos sobre a correlação exata da contaminação bacteriana com a perda de álcool produzido, embora seja óbvio que, para cada molécula de açúcar utilizada na produção do ácido láctico pelas bactérias, resulte na perda de duas moléculas de etanol. A elevada acidez da cachaça pode estar relacionada com a presença de um elevado número de bactérias no mosto durante o processo de fermentação (Pataro et al., 2002). Oliva-Neto & Yokoya (1997) observaram correlação entre o aumento da acidez do meio e a diminuição da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo associado com bactérias durante a fermentação alcoólica de cana-de-açúcar. Segundo estes autores, a acidez do mosto em fermentação é o principal fator que causa a redução da viabilidade celular das leveduras durante a fermentação alcoólica.

2.5 Microrganismos envolvidos na fermentação

A cachaça é obtida a partir de uma fermentação natural de caldo de cana recém-cortada e moída. Na extração do caldo, muitos microrganismos são capazes de passar para a parte líquida, formando a microbiota natural do mosto. Esta inoculação de microrganismo selvagem se dá por meio da matéria-prima,

daqueles existentes no meio ambiente, nas superfícies de recipientes, utensílios e também de substratos utilizados para o preparo do inóculo ou pé-de-cuba (Novaes et al., 1971; Yokoya, 1995). Os termos pé-de-cuba, pé-de-fermentação ou lêvedo geralmente são utilizados para designar o volume inicial ou massa de fermento que é adicionado ao mosto, para que a fermentação se realize. São vários os tipos de fermentos utilizados na preparação do pé-de-cuba, entre eles o “caipira” ou natural, constituído de leveduras selvagens, ocorrendo espontaneamente no processamento o fermento prensado e o selecionado (Maia, 1995).

A fim de melhorar as condições de atuação deste inóculo selvagem, têm-se criado várias receitas que normalmente são adotadas por diferentes produtores. Uma delas consiste no seguinte (Novaes et al., 1971): em um saco de aniagem colocam-se 2 a 3 quilos de farelo de arroz, 2 a 3 quilos de fubá, 0,5 a 1 quilo de bolacha doce e quantidade suficiente de caldo de laranja azeda ou limão para formar uma pasta. O volume inicial do inóculo, depois de sedimentado, deve equivaler a, no mínimo, a 20% do volume do cocho de fermentação.

A fermentação artesanal de cachaça de cana tem a característica de ser conduzida por uma diversidade de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Schwan et al., 2001). Leveduras apiculatas (principalmente *Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluveromyces* e *Pichia* também foram freqüentemente isoladas (Morais et al., 1997; Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001; Schwan et al., 2001). Geralmente, o inóculo utilizado na fermentação consiste de uma população mista de levedura contendo em torno de $3,6 \times 10^9$ UFC/mL e de $3,6 \times 10^4$ UFC/mL de bactérias (Schwan et al., 2001).

Espécies de leveduras foram encontradas em número variável, provavelmente devido à adição diária de caldo da cana nas dornas de fermentação. *Saccharomyces cerevisiae* também é a levedura dominante nas fermentações espontâneas para a produção de álcool combustível (Cabrini &

Gallo, 1999), de vinhos (Fleet et al., 1984; Heard & Fleet, 1985; Torija et al., 2001; Lopes et al., 2002) e da tequila (Lachance, 1995). Embora *S. cerevisiae* seja a espécie dominante em vinhos, outras leveduras são também encontradas nos primeiros estágios da fermentação, como as leveduras apiculatas, principalmente pertencentes aos gêneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* (Fleet et al., 1984; Heard & Fleet, 1985).

Leveduras fermentativas proporcionam características típicas em relação à tolerância às condições do meio durante todo o processo fermentativo, que vai desde a etapa do pé-de-cuba até o final da fermentação alcoólica. Nessas condições, esses microrganismos são capazes de tolerar altas concentrações de açúcares, baixos valores de pH e altas concentrações de etanol (Pataro et al., 1998).

Semelhante ao processo de formação de inóculo para a produção da cachaça de cana, a utilização de leveduras selvagens e selecionadas também é feita para a produção do “heavy rum” e o “light rum”. Os primeiros são rums com sabor bastante pronunciados, provenientes da Jamaica e Antilhas Francesas, que são produzidos por fermentação utilizando culturas mistas naturais. Para isso, o mosto é inoculado com leveduras presentes no ar e nas matérias-primas (caldo de cana em elação diluído). Nessas fermentações, os lactobacilos desempenham importante papel, por contribuírem para a produção de certos ácidos e ésteres. Os “light rums”, com sabor menos pronunciado e proveniente principalmente de Porto Rico, são produzidos por fermentação utilizando culturas puras de leveduras (Fahrasmane et al., 1998).

2.5.1 Leveduras selecionadas

As leveduras são fungos unicelulares, sendo a maioria delas classificadas como ascomiceto. As células de levedura são geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas. Reproduzem-se normalmente por brotamento ou fissão

binária (Madigan et al., 2004). São microrganismos anaeróbicos facultativos, capazes de metabolizar açúcares produzindo dióxido de carbono e água na presença de oxigênio. Em condições anaeróbicas, os açúcares são convertidos a etanol e dióxido de carbono (Tortora et al., 2002).

O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de cachaça tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente em relação aos teores de acidez e concentrações de álcoois superiores (Pataro et al., 2002). Schwan e colaboradores têm trabalhado nos últimos anos com seleção de leveduras com características apropriadas para a fermentação de cachaça de qualidade. Nesse trabalho de seleção, foram produzidas quatro dissertações de mestrado (Mendonça, 1999; Fialho, 2000; Campos, 2003; Carvalho, 2004).

Mendonça (1999) isolou 387 leveduras de 10 alambiques da região Sul de Minas Gerais; dessas 158 foram identificadas como *S. cerevisiae* por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e confirmados por técnica de *polimerase chain reaction* (PCR). Destes isolados, cinquenta foram selecionadas por apresentarem rápida assimilação de açúcares nos testes fermentativos (produção de etanol e CO₂). Após nova seleção com relação à floculação e produção de etanol, a *S. cerevisiae* CA 116 foi escolhida por apresentar a mais alta produtividade e rendimento etanólico.

No experimento realizado por Fialho (2000), a levedura CA 116 se apresentou bastante eficiente durante o processo fermentativo em caldo de cana, persistindo até o 24º dia de fermentação.

Campos (2003) testou três cepas de *S. cerevisiae* (CA116; FC9; RL11), sendo avaliadas quanto ao potencial fermentativo. Depois de multiplicados, esses isolados foram testados em alambique comercial por dois anos consecutivos. A cepa selecionada CA116 foi capaz de persistir e dominar a

fermentação frente às contaminações bacterianas e de outras leveduras selvagens.

Carvalho (2004) testou a capacidade fermentativa da levedura selecionada (CA116) em co-incubação com *Lactococcus lactis* nas fermentações em frascos e dornas. Em geral, a cepa CA 116 reprimiu o crescimento da *L. lactis* durante a co-incubação, porém, a presença da bactéria não contribuiu e nem interferiu na qualidade da bebida final produzida.

Oliveira et al. (2004) verificaram a eficiência fermentativa de 24 linhagens de *S. cerevisiae* e 6 de não-*Saccharomyces* isoladas de destilarias de cachaça artesanal em Minas Gerais. Os autores concluíram que várias linhagens isoladas de *S. cerevisiae* apresentaram valores de rendimento similares aos de linhagens industrial utilizadas na produção de álcool. As linhagens não-*Saccharomyces* apresentaram baixo potencial para competição e produção de etanol, com exceção da *Pichia subpelliculosa*.

2.5.2 Bactérias lácticas

As fontes primárias de contaminações no processo de fermentação alcoólica são os microrganismos que são encontrados naturalmente nas plantas, no solo, na matéria orgânica em decomposição e que podem estar associados às pragas e doenças das culturas (Yokoya, 1991). O caldo de cana é ótimo substrato para o crescimento de microrganismos devido aos altos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, elevada atividade aquosa, pH e temperaturas favoráveis (Gallo, 1992).

Estudos da contaminação bacteriana durante a fermentação alcoólica têm caracterizado os aminoácidos oriundos da levedura morta como sendo importantes para a nutrição e o desenvolvimento de lactobacilos (Oliva-Neto & Yokoya, 1996).

A presença de bactérias na fermentação alcoólica geralmente provoca decréscimo no rendimento de etanol, baixo crescimento da levedura, menor utilização de carboidratos e aumento da acidez (Makanjuola et al., 1992). Neste mesmo trabalho, os autores constataram que uma contagem de bactéria de $4,5 \times 10^8$ UFC/mL em 30 horas resultou numa redução de 17% no rendimento do etanol.

Contaminações bacterianas em fermentações industriais são consideradas prejudiciais quando estão acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL; nestes casos, os prejuízos econômicos são significativos quando atingem valores acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, ou, então, acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL quando ocorrem quedas nos rendimentos fermentativos (Cherubim, 2003). A queda observada no rendimento fermentativo geralmente deve-se à redução da viabilidade celular das leveduras em função do aumento da acidez no mosto após oito horas de cultivo associado com bactérias contaminantes do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* da fermentação alcoólica (Alcarde et al., 2002).

As bactérias do ácido láctico fermentam açúcares produzindo ácido láctico (homofermentativo), com pequenas quantidades de ácido acético e CO_2 . Os microrganismos heterofermentativos obrigatórios produzem gás (CO_2) a partir de glicose, ácido láctico e também produzem ácido acético e ou etanol (Hammes et al., 1991). As bactérias do ácido láctico não possuem o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, que são os fatores limitantes para ambientes com baixas concentrações de oxigênio (Kandler & Weiss, 1986).

A Figura 3 ilustra as vias pelas quais são metabolizadas as hexoses e dividem as bactérias ácido-láticas em dois grupos: homoláticas e heteroláticas. As bactérias homoláticas utilizam a via de EMP para gerar dois moles de lactato por mol de glicose, enquanto que as heteroláticas produzem quantias equimoleculares de lactato, CO_2 e etanol a partir de glicose pela via metabólica monofosfato-hexose ou via da pentose-fosfato (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Em estudo com identificação de bactérias contaminantes em destilarias, o gênero *Lactobacillus* representou 71% do total de Gram-positivas; destes, 24% foram do gênero *Bacillus*. As bactérias produtoras do ácido lático formaram os grupos com populações maiores, apesar de não terem sido capazes de se multiplicar durante o processo fermentativo (Schwan et al., 2001).

Embora existam variações entre os microrganismos identificados, todos os trabalhos apontam para o predomínio de bactérias Gram-positivas no ambiente fermentativo, predominando os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (Stroppa et al., 1998).

Gallo (1992) verificou, que na microbiota bacteriana isolada de mosto e de dornas de fermentação alcoólica, houve predomínio de bactérias Gram-positivas (98,52%), bastonete (87,76%) e não esporuladas (73,95%). O gênero *Lactobacillus* foi o contaminante mais freqüente (59,75%), seguido de *Bacillus* (26,58%). As espécies isoladas com maior freqüência foram: *Bacillus coagulans* (15,09%), *Lactobacillus fermentum* (15,04%), *Lactobacillus helveticus* (14,08%), *Bacillus stearothermophilus* (6,91%) e *Lactobacillus plantarum* (5,69%)

As interações levedura-bactéria têm sido estudadas exaustivamente, visto que, durante a fermentação alcoólica, a contaminação bacteriana promove a formação de flocos imediatamente após o contato das bactérias com as leveduras (Gallo & Canhos, 1991; Yokoya & Oliva-Neto, 1991; Yokoya, 1991).

O isolamento freqüente de cepas de *L. fermentum* em fermentações floculadas evidenciou sua importância como contaminante de processos industriais (Yokoya & Oliva-Neto, 1991). Chin & Ingledew (1994), avaliando o efeito de bactérias produtoras de ácido lático em fermentação de bebidas destiladas, observaram que, após 5 fermentações, ocorreu aumento gradual do

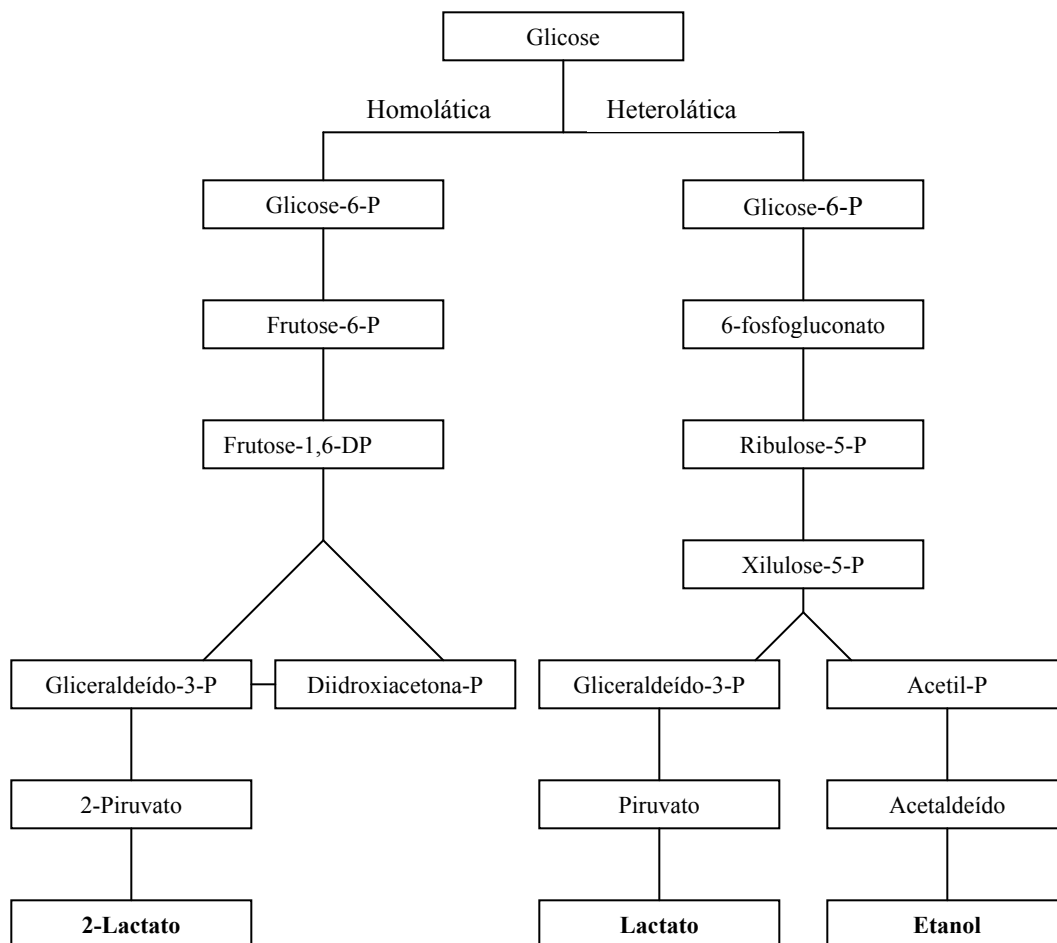


FIGURA 3 Esquema geral da fermentação de glicose por bactérias ácido láticas.
 Fonte: Caplice & Fitzgerald (1999)

teor de ácido láctico, levando à redução de cerca de 60% na viabilidade da levedura.

Wick & Lebeault (2001) avaliaram a quantidade de glicose consumida em meio MRS e metabólitos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* e bactérias láticas em cultura mista. A quantidade de glicose consumida era maior para *L. brevis* (homofermentativa) do que para *L.*

plantarum (heterofermentativa), sugerindo que a competição entre bactéria homofermentativa e levedura pela glicose era maior.

Alcarde & Yokoya (2003) verificaram que *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fructosus* e *Lactobacillus buchneri* podem provocar a floculação de leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1 durante a fermentação alcoólica. Entretanto, nem as espécies ou cepas de *Lactobacillus* provocaram a floculação do fermento industrial, pois há necessidade de certa variação da relação levedura/bactéria, para algumas espécies de *Lactobacillus*.

Avaliando a taxa de floculação em fermentação induzida por *L. fermentum* CCT 1405 sob o efeito dos diferentes valores de pH sobre o fermento, Souza & Mutton (2004) constataram que o tratamento ácido do fermento promoveu a dispersão dos flocos de acordo com o pH utilizado.

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (Oliva-Neto & Yokoya, 1997).

Essia Ngang et al. (1992) estudaram a estimulação no desenvolvimento de *Lactobacillus casei* em cultura mista com *S. cerevisiae* em meio de melão de beterraba e relataram que o estímulo também ocorre, principalmente, devido à hidrólise da sacarose em hexoses (glicose e frutose), proporcionando maior facilidade de assimilação dos carboidratos pela bactéria.

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito da fermentação em batelada com cultura mista de mosto à base de milho e relataram que a presença de *L. fermentum* provocou decréscimo na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda na viabilidade da levedura, redução na formação de massa celular e inibição no desenvolvimento da bactéria.

Guchte et al. (2002) relatam que o efeito do ácido láctico sobre a bactéria ácido-lática não é plenamente conhecido, mas aceita-se que ocorre a difusão passiva e que o acúmulo intracelular reduz o pH, afetando a permeabilidade da membrana. A proporção de ácidos graxos presentes na membrana plasmática da bactéria determina sua resistência aos estresses causados pela presença de ácidos.

Em algumas situações, a presença da levedura favorece o desenvolvimento bacteriano; em outros casos, a fermentação é considerada um ótimo inibidor da multiplicação bacteriana, seja pela presença do etanol, de ácidos orgânicos ou pela rápida assimilação do substrato (Basso et al., 1997; Thomas et al., 2001).

Em seu trabalho, Cherubim (2003) concluiu que a linhagem Fleischmann de *S. cerevisiae* exerceu maior estímulo à multiplicação da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 quando comparada com a linhagem PE-2, sendo esse estímulo inversamente proporcional à viabilidade celular apresentada pela levedura. A contaminação por *L. fermentum*, além de causar floculação, teve grande influência sobre a viabilidade de *S. cerevisiae*, reduzindo-o a valores próximos a zero em cerca de 12 horas após o término da fermentação alcoólica (Oliveira-Freguglia & Horii, 1998).

Narendranath et al. (1997) estudaram o efeito de diferentes espécies de lactobacilos, em distintas concentrações, no rendimento em etanol e crescimento da levedura em mosto de malte de trigo e verificaram decréscimo do rendimento em etanol em amostras. Estes autores observaram que esse decréscimo foi devido ao desvio de carboidratos para o crescimento bacteriano e , conseqüentemente, à produção de ácido láctico. Os mesmos autores relataram que a competição entre leveduras e bactérias por fatores de crescimento foi causa principal do menor desenvolvimento da levedura, ocasionando devido um menor rendimento final em etanol.

Analisando o processo de produção de aguardente em quatro unidades de produção na região de Jaboticabal, SP, Mutton & Providello (1998) verificaram que elevados níveis de contaminação nas unidades foram importantes para a viabilidade celular das leveduras, brotamento e o tempo de fermentação. Além disso, foi constatado que a contaminação do processo fermentativo afetou a qualidade das aguardentes produzidas, principalmente quanto aos teores de acidez total e álcoois superiores.

2.5.3 Processo fermentativo

O processo fermentativo do mosto dura, em média, 24 horas. Em geral, a fermentação pode ser conduzida por três diferentes sistemas: batelada simples (sistema descontínuo), batelada alimentada (sistema semicontínuo) e contínua. Esses sistemas são escolhidos de acordo com o tipo de indústria. Os produtores de cachaça artesanal adotam, comumente, o sistema de batelada simples, que consiste em colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado no cocho de fermentação. Após 24 horas, destila-se o vinho, inicia-se um novo ciclo, utilizando-se para isso o inóculo que permanece na dorna de fermentação (Pataro et al., 2002).

Schwan & Castro (2001) relataram que a propagação do inóculo nas dornas de fermentação deve ser feita sob intensa aeração. Em relação ao teor de açúcar, normalmente recomenda-se que ele não ultrapasse a 2% a 3% (p/v), visto que maiores concentrações prejudicam a respiração e o crescimento das células de leveduras. Na fermentação propriamente dita, em que há a conversão do açúcar em etanol e CO₂, o teor máximo de açúcar tolerado pela levedura fica em torno de 15% (p/v).

O acompanhamento da fermentação é feito por meio de medições do teor de °Brix, da temperatura, do tempo de fermentação, da acidez e do pH. Pode-se ainda realizar análises microscópicas do fermento para determinarem-se

o rendimento e a produtividade da fermentação e de compostos secundários (Yokoya, 1995).

2.6 Destilação

O vinho é um produto resultante da fermentação do mosto, sendo constituído por componentes sólidos, líquidos e gasosos. Os componentes líquidos são representados pela água (80% a 90%) e álcool etílico (6% a 10%). Além destes, estão presentes os ácidos (acético, succínico e láctico), álcoois superiores (amílico, isoamílico, propílico, isopropílico, butílico e isobutílico), glicerol, furfural, aldeídos e ésteres. Os sólidos são representados pelos açúcares não fermentados, sais minerais e substâncias nitrogenadas (aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos). Já os sólidos em suspensos são representados pelas leveduras e bactérias, bagacilhos e minerais insolúveis como argila. O componente gasoso principal é o gás carbônico (Yokoya, 1995).

Pelo aquecimento do vinho em alambique de cobre, formam-se vapores mais ricos em etanol e demais substâncias voláteis, que são condensadas pelo resfriamento, retornando à forma líquida. De um vinho com 7% a 8% de álcool em volume, chega-se a um destilado com 38% a 54%. A temperatura de ebulição está entre 92,6°C a 95,9°C. Os primeiros vapores são condensados com concentração entre 35,8% a 51,0% de álcool. Sendo que à medida que diminui o teor alcoólico do vinho no alambique, o ponto de ebulição aumenta. Na primeira fração do destilado, chamadas de cabeça, saem os produtos mais voláteis que o álcool, como aldeídos, metanol e ésteres. O álcool etílico, a maior parte dos aldeídos, ésteres, álcoois superiores e ácidos voláteis constituem a segunda porção da destilação, chamada de coração; os compostos menos voláteis que o álcool etílico são obtidos da última destilação, chamada de cauda ou água fraca, que é composta de ácidos voláteis e furfural (Boza & Horii, 1999; Yokoya, 1995).

Considerando apenas a destilação em batelada, em alambiques simples, tal como na fabricação artesanal e semi-artesanal da aguardente, distinguem-se usualmente três frações destiladas e Maia (1994) relata esta técnica usual de destilação:

a) o “destilado de cabeça”, que corresponde à primeira fração recolhida na saída do alambique;

b) o “destilado de coração”, que é a porção destilada correspondente à aguardente;

c) o “destilado de cauda”, ou “água fraca”, que é a última fração recuperada na saída do alambique.

Sales (2003) comenta que a separação entre as três frações do destilado é feita por meio de “cortes”. A primeira fração, denominada “cachaça de cabeça”, é a que apresenta maiores concentrações de metanol. A segunda fração é o “coração” e corresponde à cachaça, sendo realizado o seu “corte” quando a cachaça atinge, aproximadamente, 45% de teor alcoólico. A terceira fração, denominada de “cauda ou água fraca”, possui os maiores teores de compostos não voláteis.

A destilação pode ser feita por dois sistemas, ou seja, em bateladas (alambiques) e contínua (colunas). Para a produção de cachaça artesanal utiliza-se a destilação em bateladas, que pode ser efetuada em alambiques simples ou em alambiques de três corpos. Tem-se observado que o alambique de cobre é essencial para evitar a formação de odores desagradáveis na aguardente (Yokoya, 1995). O fluxograma da Figura 4 representa o processo de produção de cachaça.

Segundo Oliveira (2001), a destilação altera as características sensoriais das bebidas alcoólicas, uma vez que as quantidades dos compostos voláteis absolutas e relativas são resultantes e influenciadas pela mesma, tendo sua composição determinada por muitos fatores, incluindo o tipo de destilador, o

grau de purificação e a seleção das frações tomadas para inclusão na bebida destilada.

Os compostos secundários da cachaça constituem um grupo de produtos minoritários oriundos da fermentação do mosto. Esses são os principais responsáveis pelo aroma e sabor dos destilados, e em geral, são principalmente os ésteres e aldeídos, porém, estes podem comprometer a qualidade da cachaça e ser prejudicial à saúde quando encontrados acima dos limites estabelecidos pelo MAPA (Pereira et al., 2003). O esquema da Figura 5 representa o processo de formação dos principais compostos formados em processos fermentativos.

Oliveira et al. (2002) mostraram que três linhagens de *S. cerevisiae* provenientes de destilarias artesanais de aguardente de Minas Gerais produziram maiores quantidades de álcoois superiores (álcool isoamílico, propanol e isobutanol) do que a linhagem isolada de destilaria de álcool.

Furtado (1995) identificou, por meio de cromatografia gasosa, dez componentes em aguardente de cana, que são acetaldeído, acetato de etila, metanol, etanol, propanol, 2-butanol, isobutanol, butanol, álcool amílico e ácido acético. Os álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo de fermentação são conhecidos como óleo de fusel, que são provenientes, em grande parte, de reações de degradação de aminoácidos ocorridos na fermentação. A formação de álcoois superiores, como o álcool amílico a partir da leucina, o isoamílico a partir da leucina e o isobutílico a partir da valina, os quais conferem odores característicos às bebidas (Maia, 1994; Yokoya, 1995).

O gosto, “flavour” e o buquê de uma bebida alcoólica são atribuídos, em pequena parte, ao conteúdo de etanol da bebida. A principal atração de uma bebida alcoólica para o paladar é a grande variedade de combinações de compostos orgânicos presentes em baixas concentrações na bebida produzida por ação de leveduras (Rose, 1977).

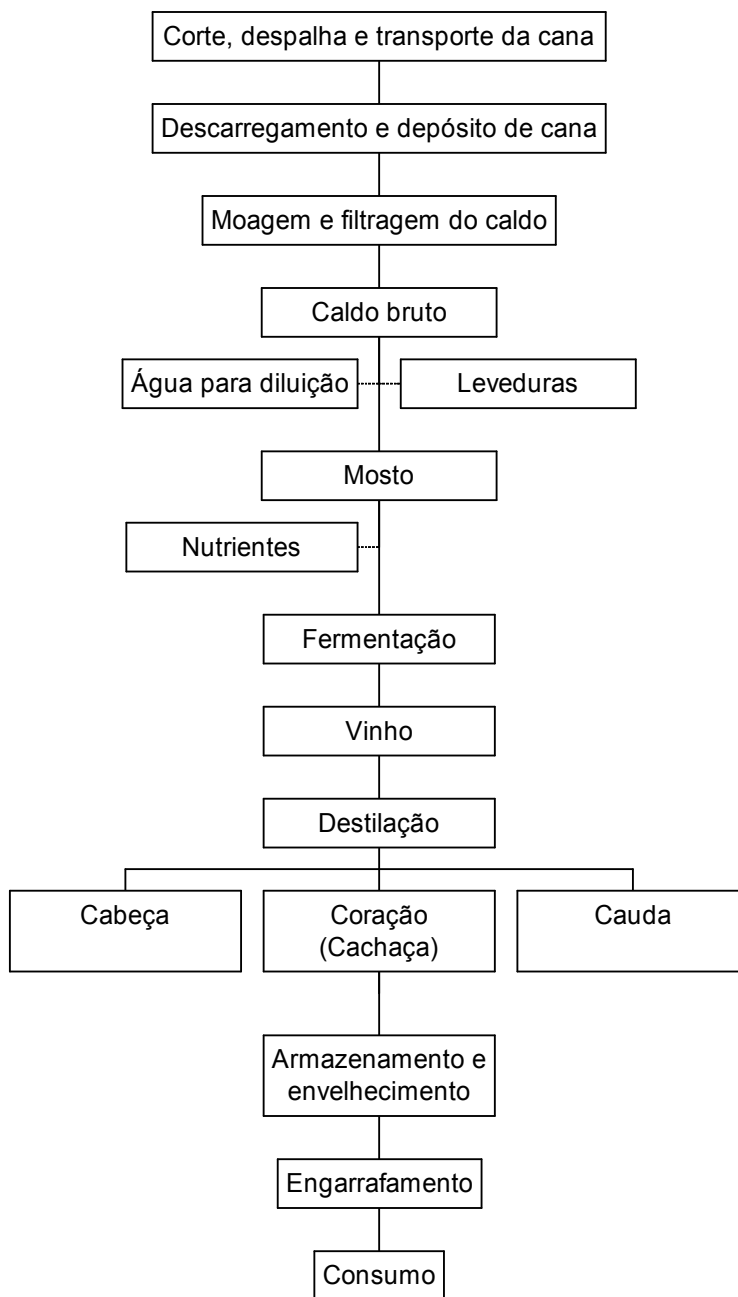


FIGURA 4 Fluxograma do processo produtivo de cachaça (Fonte: Carvalho, 2004).

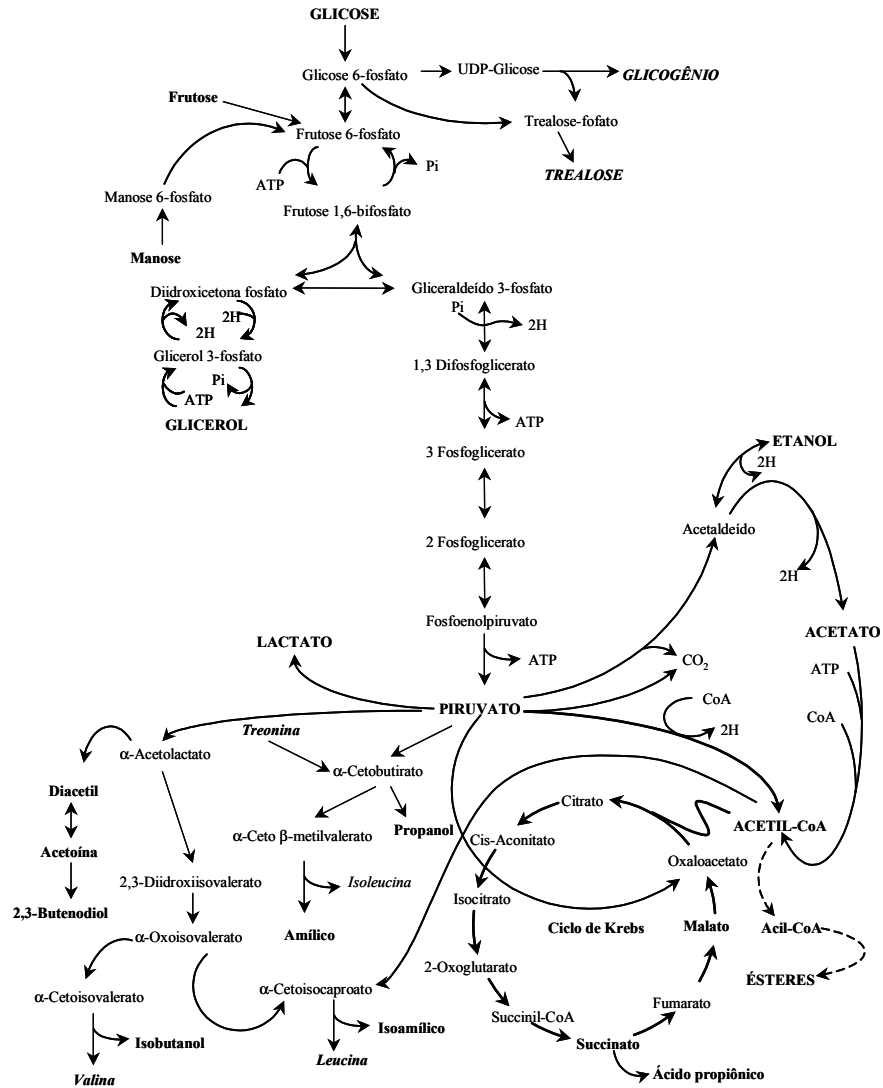


FIGURA 5 Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos (Fonte: Dias, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações dos laboratórios de Microbiologia do Departamento de Biologia (DBI), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas culturas de *Saccharomyces cerevisiae* CA 116, isoladas durante fermentações em alambiques da região Sul de Minas Gerais e pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular de Microrganismo (DBI/UFLA), e *Lactobacillus fermentum* CCT 1407, isolado de destilarias e pertencente à coleção da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, SP.

3.2 Reativação dos inóculos

3.2.1 Levedura

A levedura foi mantida a -20°C em glicerol (20%) e reativada em meio YEPD (em g.L⁻¹: dextrose, 20,0; extrato de levedura, 10,0; peptona, 10,0) a 28°C, por 24 horas. Pelas características morfológicas e microscópicas do isolado por meio de estrias compostas, foi verificada a pureza do microrganismo.

3.2.2 Bactéria

A bactéria foi mantida em freezer (-20°C) em solução de leite desnatado (Cherubim, 2003) e reativada em meio MRS (em g.L⁻¹: dextrose, 20,0; peptona, 10,0; extrato de carne, 10,0; extrato de levedura, 5,0; acetato de sódio, 5,0; citrato de amônio bibásico, 2,0; fosfato de potássio dibásico, 2,0; sorbetano

monooleato, 1,0; sulfato de magnésio, 0,2; sulfato de manganês, 0,05) a 37°C, por 24 horas. O pH do meio foi ajustado entre 6,2 e 6,5 e autoclavado a 121°C por 15 minutos, segundo De Man et al. (1960). Pelas características morfológicas e microscópicas do isolado por meio de estrias compostas, foi verificada a pureza do microrganismo.

3.3 Preparo dos inóculos e adaptação dos microrganismos

A levedura *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407, mantidas sob congelamento (-20°C), foram reativadas transferindo-se 200µL das suspensões de células para 5,0mL de caldo YEPD para a levedura, e de caldo MRS para bactéria, com incubação a 28°C e 37°C, respectivamente, por 24 horas. Em seguida, as culturas foram repicadas, por transferência de 1.000µL da suspensão de células para 200mL de meio YEPD (levedura) e MRS (bactéria), para serem usadas como culturas estoques. Os microrganismos foram incubados em estufa a 28°C e 37°C, respectivamente, sob agitação de 30 rpm por 24 horas.

Para padronização do número de células e adaptação aos meios avaliados neste experimento, alíquotas de 1.000µL da cultura estoque de levedura foram transferidas em 200mL de YEPD e MCC (caldo de cana 5,0 ± 0,1°Brix + 1% de extrato de levedura), e outros 1.000µL da cultura estoque de bactéria inoculadas em 200mL de MRS e MCC. Os microrganismos foram incubados a 28°C (levedura) e 37°C (bactéria), a 30 rpm de agitação, por 24 horas.

3.4 Cana-de-açúcar e preparo do mosto

As variedades de cana usadas foram as cultivares RB 835336 (médio) e RB 72454 (tardia), fornecidas pelo Sítio Manganges, localizado no município de

Lavras, MG. O caldo de cana foi extraído no mesmo dia de seu corte e filtrado para retirada de impurezas (terra e bagacilhos).

O mosto foi conduzido ao Setor de Microbiologia (DBI/UFLA), onde se procedeu a nova filtração. Posteriormente, foi diluído com água destilada de forma a obter-se $5,0 \pm 0,1^\circ\text{Brix}$ e suplementado com 1% de extrato de levedura e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Este meio de cultura líquido foi denominado de meio caldo de cana (MCC).

3.5 Avaliação da eficiência de dois meios na multiplicação de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407

3.5.1 Inoculação

Para a inoculação de *L. fermentum* nos meios MRS e MCC, autoclavados a 121°C por 15 minutos, utilizaram-se alíquotas de $1.000\mu\text{L}$ do inóculo adaptados anteriormente. O experimento foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 250mL com três repetições e incubados a 37°C , a 30 rpm por 28 horas.

3.5.2 Análises realizadas

Durante o período de incubação, foram realizadas coletas em intervalos de 7 horas para a avaliação dos teores de sólidos solúveis totais (SST), pH, açúcares redutores (AR) e crescimento microbiano.

3.5.2.1 Análise microbiológica

O crescimento da bactéria foi acompanhado ao longo de 28 horas, com o uso da técnica de plaqueamento por microgotas (Romeiro, 2001), utilizando-se o meio ágar MRS, incubado a 37°C .

3.5.2.2 Análise química

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado por refratometria, conforme normas da AOAC (1992), utilizando-se refratômetro digital ATAGO PR-32, com compensação de temperatura automática e resultados expressos em °Brix.

O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro digital Micronal B474, segundo técnica estabelecida pela AOAC (1992).

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

3.6 Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na fermentação da cachaça artesanal

3.6.1 Cana-de-açúcar e preparo do mosto

Para a produção do inóculo, o mosto foi diluído com água destilada a 5 °Brix + 1% de extrato de levedura, sendo autoclavado a 121°C por 15 minutos. Na etapa de multiplicação dos microrganismos, o caldo foi diluído a 7° e 10°Brix (Carvalho, 2004). Na fase de fermentação em frascos e dornas, os mostos foram diluídos a 15°Brix e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

3.6.2 Preparo dos inóculos

Alíquotas de 1.000µL de cultura estoque das cepas de *S. cerevisiae* CA 116 em caldo YEPD e *L. fermentum* CCT 1407 em caldo MRS foram inoculados em MCC. Para se alcançar a concentração desejada de inóculo para fermentação em frascos, várias alimentações foram realizadas, até a obtenção de 600 mL de inóculo de levedura com 10⁹ UFC/mL (Carvalho, 2004). Na fase de fermentação em dornas, foi imprescindível o abastecimento de mosto até a obtenção de 2,5L de inoculo de CA 116, na concentração de 10⁹ UFC/mL e 200mL de inóculo

CCT 1407 na concentração de 10^7 UFC/mL, tanto para co-incubação em dornas como em frascos.

O caldo esterilizado a 121°C por 15 minutos e fornecido nas duas etapas do experimento (frascos e dornas), foi tendo, progressivamente, seu teor elevado em 5° , 7° e 10° Brix, estabelecendo-se uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL de leveduras e 10^4 UFC/mL de bactéria no mosto a ser fermentado.

3.6.3 Fermentação em frascos

Após a produção do inóculo, os frascos a serem fermentados isoladamente e em co-incubação foram inoculados com 100 mL da cepa CA 116 e 2mL de *L. fermentum*, contendo 1.500 e 1.600 mL de caldo a 15° Brix, respectivamente. Os erlenmeyers em triplicata foram incubados a 30°C por 26 horas (Carvalho, 2004).

3.6.4 Fermentação em dornas

Após os inóculos terem crescido, inocularam-se 2,5L da cepa CA 116 em cada dorna (capacidade efetiva de 30L, em aço inox) para a realização do processo fermentativo isoladamente; para o cultivo misto, inocularam-se 2,5L da CA 116 e 25mL da CCT 1407 para cada dorna. Foram utilizados 20L de mosto em cada batelada (sistema de corte), sendo 5L referentes ao pé-de-cuba.

3.6.5 Processo fermentativo

Os frascos em triplicata, contendo o mosto a 15° Brix, com *L. fermentum* CCT 1407, isoladamente e co-incubado com *S.cerevisiae* CA 116, foram mantidos a 30°C , por 26 horas (Carvalho, 2004). Na fermentação em dornas foi utilizado o sistema de batelada alimentada, realizado da seguinte forma: após a formação do pé-de-cuba, foi iniciado o abastecimento com mosto estéril (autoclavado) a 15° Brix, de modo que o teor de $^\circ$ Brix na dorna ficasse entre 5 a 7

unidades. Cada alimentação foi realizada quando o °Brix do mosto era de 2 a 3 unidades, sendo o monitoramento feito por leitura direta em sacarímetro de Brix.

Em cada dorna de fermentação, foi adicionado um saco de aniagem estéril contendo 125g de fubá e 125g de farelo de arroz como fonte de nutrientes para as leveduras. A fermentação foi concluída quando o teor de °Brix zerou e as leveduras decantaram no fundo da dorna. Após a retirada do vinho, que foi enviado ao alambique, as células (pé-de-cuba) foram usadas em novas bateladas, com adição de novo caldo a 15°Brix. A fermentação durou aproximadamente 24 horas, sendo a temperatura no interior das dornas mantidas entre 30°C a 32 °C. As dornas eram cobertas com tela de pano, para evitar a queda de insetos e a entrada de sujidades no mosto de fermentação. Foram realizadas quatro bateladas simples em duas dornas para cada tratamento (CA 116 isolada e co-incubada com CCT 1407).

3.6.6 Destilação

Após o término da fermentação de cada batelada, o vinho foi enviado ao alambique de cobre com capacidade de 50L para a realização do processo de destilação, obtendo-se uma bebida com 38% a 48% de teor alcoólico. A primeira fração deste destilado, denominada de “cabeça”, foi constituída de 20% do volume total da alambicagem (Campos, 2003). A segunda porção do destilado, chamada de “coração”, foi recolhida num recipiente, sendo o corte feito a 45% de teor alcoólico. A última porção da destilação, denominada de “cauda” ou “água fraca”, saiu após o corte. Durante a destilação, o teor alcoólico foi monitorado com alcoômetro de Gay-Lussac.

3.6.7 Amostragem

Amostras foram coletadas no decorrer da fermentação para plaqueamento, determinação de sólidos solúveis totais (somente para frascos),

açúcares redutores e pH. Na fermentação em frascos, coletou-se amostra em intervalos de 3 em 3 horas durante 12 horas de incubação, após este período, à coleta foi feita em intervalos de 7 horas, até a 26^a hora. No processo fermentativo em dornas, foram coletadas amostras no final do enchimento da mesma (tempo inicial) e após o envio do vinho ao alambique (tempo final) (Carvalho, 2004).

Após o término da alambicagem, foram amostrados 1.000 mL da fração coração de todas as bateladas para análise físico-química, sendo a cromatografia realizada em todas bateladas das frações cabeça, coração e cauda.

3.6.7.1 Análise microbiológica

De cada amostra na fermentação em frasco, foram preparadas diluições seriadas, sendo o crescimento de leveduras e bactérias acompanhado em meios YW e MRS, respectivamente. Na etapa de fermentação em dornas, o crescimento celular de leveduras foi realizado pela técnica de espalhamento e microgotas (Romeiro, 2001) para bactérias. Amostras retiradas dos frascos e dornas da co-incubação utilizaram YW e MRS, acrescidos de ampicilina (100µg/mL de meio) e nistatina (4mL de suspensão oral 100.000 UI por litro de meio), respectivamente. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 28°C e 37°C, por 24 horas.

3.6.7.2 Análises químicas

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado por refratometria, conforme normas da AOAC (1992), utilizando-se refratômetro digital ATAGO PR-32 com compensação de temperatura automática e resultados expressos em °Brix.

O valor de pH foi determinado, utilizando-se potenciômetro digital Micronal B474, segundo a técnica estabelecida pela AOAC (1992). Os teores de

açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

A análise físico-química da fração coração foi realizada no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Bebidas do DQI/UFLA, avaliando-se os teores de densidade relativa, cobre, grau alcoólico real, acidez volátil em ácido acético, álcool superior, aldeídos em aldeído acético, ésteres em acetato de etila e álcool metílico (Brasil, 2003).

As análises cromatográficas das frações cabeça, coração e cauda foram feitas em cromatógrafo gasoso no Laboratório de Análises Físico-Química de Bebidas do DQI/UFLA, onde se avaliou quantitativamente o teor de álcool superior e metanol. O equipamento utilizado da marca Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de chama ionizada. As frações da cachaça redestiladas foram injetadas (1 µL) nas seguintes condições de operação: detector e injetor operando a 130°C e 150°C, respectivamente; coluna capilar (DB-WAX, 30m, 0,25mm de diâmetro, fase estacionária polietileno glicol), operando em gradiente de temperatura (60°C/2,5min.; elevação de 2,0°C/min., até chegar a 80°C e permanecendo a 80°C /2min.). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com fluxo de 1,6123mL/min., a pressão de 17,0psi e o split foi de 1:30. A concentração dos álcoois superiores nas frações foi determinada pela curva-padrão.

3.6.7.3 Análise sensorial

A análise sensorial da cachaça artesanal foi realizada por 50 provadores não treinados, inicialmente selecionados por apreciarem a bebida. O painel de provadores constituiu-se de alunos e professores da UFLA, com idade entre 18 e 55 anos. A cada provador foram fornecidas quatro amostras da bebida, codificadas ao acaso, oriundas da fermentação com CA 116 (1ª e 2ª bateladas) e co-incubação CA 116 + CCT 1407 (3ª e 4ª bateladas), respectivamente. A

quantidade de cada amostra fornecida aos provadores foi de 10mL, intercalando-se entre as amostras o branco (biscoito água e sal e água mineral) para não haver interferência na avaliação seguinte.

Em cada amostra foram avaliados os atributos (aparência, aroma e sabor) e aspectos gerais das bebidas por meio do preenchimento por parte de cada provador de duas fichas (Figura 1A e 2A) de avaliação independentes e separadas, na forma de Escala Hedônica (teste de preferência) de nove pontos (Dutcosky, 1996).

3.6.7.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento para avaliação do meio de crescimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 2 tratamentos (MRS e MCC) em 5 tempos (0, 7, 14, 21 e 28 horas de incubação) com 3 repetições. A análise estatística foi realizada por meio do software SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999). A diferença entre as médias foi verificada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparar o crescimento nos diferentes meios de cultivo de *L. fermentum* CCT 1407.

O modelo estatístico adotado está descrito abaixo:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} = observação referente ao tratamento i na repetição j , sendo $j = 1,2,3$;

μ = média geral associada ao efeito da observação;

t_i = efeito do tratamento i , sendo $i = 1,2$;

e_{ij} = erro experimental associado a cada observação y_{ij} .

Para o teste de preferência (análise sensorial) o experimento foi conduzido em DIC, com 2 tratamentos [cachaça produzida por *S. cerevisiae* CA 116 e co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407, avaliando-se 4 atributos sensoriais (aparência, aroma, sabor e aspectos gerais)] com 50 repetições. A análise estatística foi realizada por meio do software SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999). A diferença entre as médias foi verificada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O modelo estatístico adotado está descrito abaixo:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} = observação referente ao tratamento i na repetição j , sendo $j = 1, 2, 3, \dots, 50$;

μ = média geral associada ao efeito da observação;

t_i = efeito do tratamento i , sendo $i = 1, 2$;

e_{ij} = erro experimental associado a cada observação y_{ij} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407

A bactéria *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 foi submetida à avaliação de eficiência de crescimento em diferentes meios de cultivo De Man, Rogosa e Sharp (MRS) e meio caldo de cana (MCC). Os resultados encontrados para °Brix, pH e açúcares redutores estão apresentados na Figura 6.

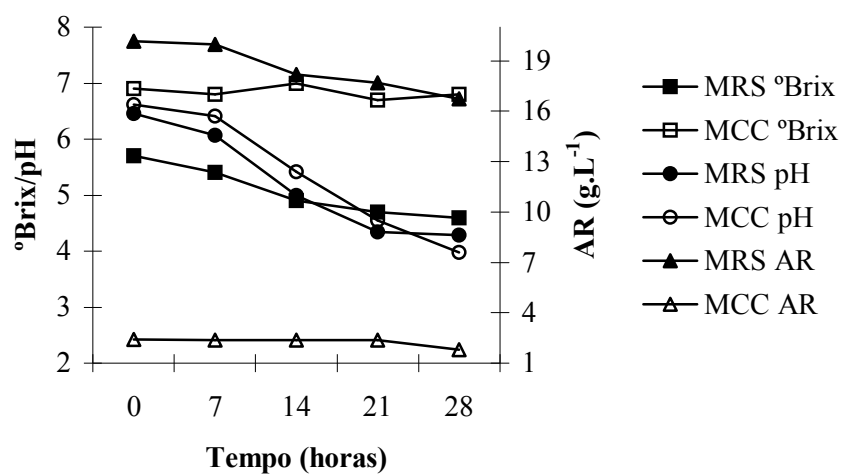


FIGURA 6 Avaliação do °Brix, pH e açúcares redutores (AR) durante o crescimento de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 em dois meios de cultivo (MRS e MCC)

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) inicial observado foi de 5,7 no meio de cultivo MRS e de 6,9 no meio de cultivo MCC (5°Brix + 1% de extrato de levedura). Após 28 horas de incubação com *L. fermentum* CCT 1407, o valor do °Brix decresceu até 1,1 no meio MRS. Não foi observado decréscimo significativo no valor do °Brix inicial no meio MCC (Figura 6).

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) corresponde às concentrações de sacarose (em maior proporção) e outros açúcares (Aquarone, 2001). A maior concentração de °Brix do meio MCC comparado com o meio MRS, possivelmente, foi devido ao fato do primeiro meio possuir açúcares não redutores (sacarose) em sua composição, o que não ocorre com o meio MRS.

Foi realizado o acompanhamento do valor de pH dos meios testados (MRS e MCC) durante o crescimento da cepa de *L. fermentum*. Observou-se que, no intervalo entre 7 a 21 horas após a inoculação, houve maior decréscimo do valor de pH do meio de cultivo e, após este intervalo, a variação foi mínima. Os valores de pH decresceram 2,18 e 2,78 unidades após 28 horas de incubação para os meios MRS e MCC, respectivamente. Os valores finais encontrados do pH nos meios de cultivo foram de 4,28. Isto sugere que *L. fermentum* é produtora de ácidos em caldo MRS (Figura 6). Oliveira-Freguglia (1998) obteve resultados semelhantes nos valores de pH em meio de cultivo à base de caldo de cana suplementado com extrato de levedura (1,0%) e peptona (1,0%).

O teor de açúcares redutores foi inicialmente mais elevado no meio MRS. Isto pode ter ocorrido porque este meio tem em sua composição dextrose (açúcar redutor) na proporção de 20g.L⁻¹; em contrapartida, o meio MCC é composto por elevadas concentrações de sacarose (açúcar não redutor) e pequenas de açúcares redutores. Durante o período de 28 horas de incubação, a variação do consumo de açúcares redutores (T₀ - T₂₈) pela bactéria variou de 3,44 a 0,62g.L⁻¹ para os meios MRS e MCC, respectivamente (Figura 6).

Os resultados da avaliação do crescimento da cepa de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 em dois meios de cultivo (MRS e MCC) estão apresentados na Figura 7. A cepa de *L. fermentum* CCT 1407 apresentou crescimento de $1,45 \times 10^8$ UFC/mL ao ser cultivada em MRS e $2,95 \times 10^8$ UFC/mL no MCC, em 28 horas de incubação. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) no crescimento da bactéria entre os meios testados após 14 e 21 horas de incubação (Figura 7). Este resultado permite sugerir que o meio MCC nas condições de avaliação proporcionou aparentemente melhor crescimento quando comparado ao meio MRS.

Alcarde et al. (2002) utilizando meio à base de caldo de cana suplementado extrato de levedura e peptona, observaram contagens populacionais superiores àquelas obtidas nos meios tradicionais, principalmente das bactérias do gênero *Lactobacillus*. Estes mesmos autores comentaram que o meio de cultivo à base de caldo de cana foi capaz de proporcionar maior população bacteriana por simular a composição do mosto no meio no qual as bactérias foram isoladas no processo industrial de produção de álcool.

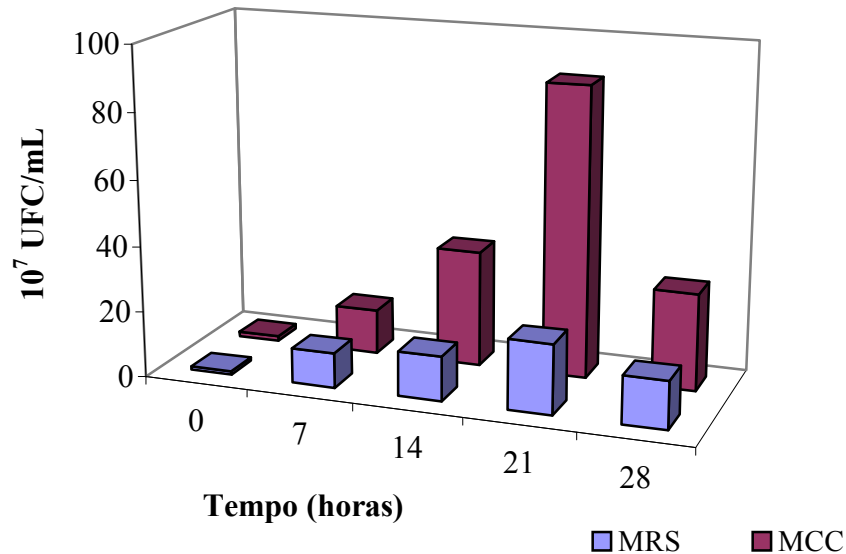


FIGURA 7 Avaliação do crescimento de *Lactobacillus fermentum* em dois meios de cultivo (MRS e MCC)

4.2 Avaliação da interação de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 na fermentação da cachaça artesanal

4.2.1 Avaliação do crescimento

A interação de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* na fermentação da cachaça artesanal foi observada cultivando-se *S. cerevisiae* isoladamente e co-incubando-se os dois microrganismos em frascos erlenmeyers (2.000 mL) com caldo de cana a 15°Brix a 30°C. Os resultados observados estão apresentados na Figura 8.

Em geral, a cepa *S. cerevisiae* CA 116 apresentou tendências similares no crescimento avaliado pela contagem de UFC (log UFC/mL) e na concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) durante o período de 26 horas

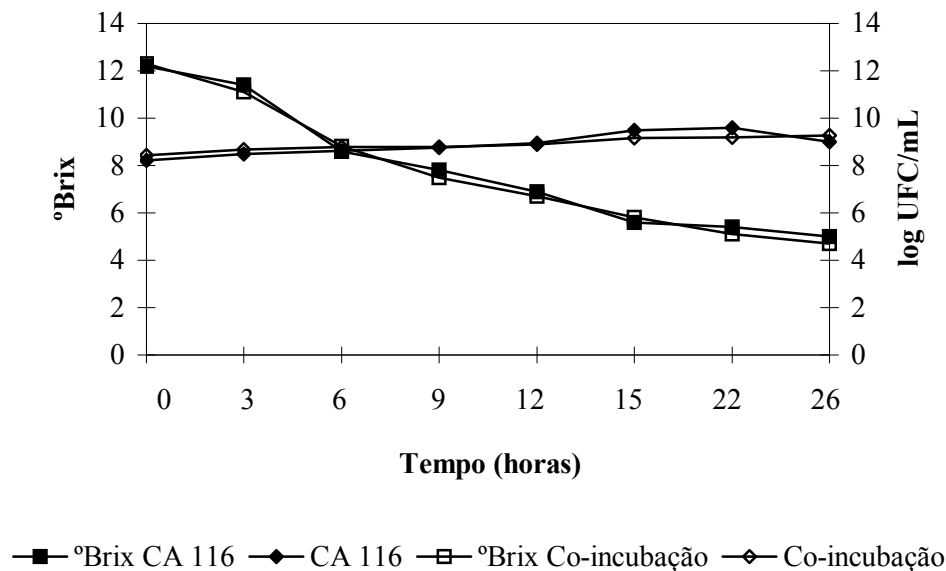


FIGURA 8 Avaliação da concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) e do crescimento (log UFC/mL) de *S. cerevisiae* CA 116 inoculada isoladamente e co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407 em frascos com caldo de cana 15 °Brix a 30 °C

de incubação, quando inoculada isoladamente ou co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407 (Figura 8).

A avaliação por meio da curva de crescimento demonstrou que *S. cerevisiae*, quando co-incubada com o *L. fermentum*, não apresentou, aparentemente, nenhum tipo de inibição ou interferência em seu crescimento. Foi observado aumento do número de células, de $1,66 \times 10^8$ (8,22 log UFC/mL) para $9,72 \times 10^9$ UFC/mL (8,98 log UFC/mL). Por outro lado, o °Brix do meio de cultivo decresceu, aproximadamente, de 12,3 para 5,0, em ambos os tratamentos avaliados durante no período de 26 horas de incubação (Figura 8).

Isso pode ter ocorrido porque tanto a glicose quanto a frutose são fermentáveis de forma direta, enquanto que para a sacarose há a necessidade da inversão (D-glicose + D-frutose) enzimática pela ação da invertase proveniente de *S. cerevisiae* (Aquarone et al., 2001).

Os resultados obtidos na avaliação da concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) e do crescimento de *L. fermentum* inoculado isoladamente e co-incubado em frascos de erlenmeyers de 2.000 mL com caldo de cana a 15°Brix, estão apresentados na Figura 9.

O mosto, quando foi inoculado isoladamente com *L. fermentum* CCT 1407, apresentou pouca variação no teor de sólidos solúveis totais (°Brix). Entretanto, quando esta bactéria foi co-incubada na presença de *S. cerevisiae* CA 116, os valores variaram de 12,3 para 4,8, em 26 horas de incubação, demonstrando que aparentemente apenas a levedura possui a capacidade de utilizar a sacarose presente no caldo de cana (Figura 9).

Durante o crescimento de *L. fermentum*, os resultados demonstraram que esta, quando co-incubada com a *S. cerevisiae*, teve o seu crescimento reprimido devido à perda da viabilidade celular, principalmente 12 horas após a incubação (Figura 9). Segundo Basso et al. (1997), a fermentação pode causar uma ação antibacteriana, exercida pelo ácido succínico sinergicamente com etanol, metabólitos estes produzidos por *S. cerevisiae* na fermentação.

Os resultados do número de células de levedura durante o processo fermentativo em dornas nos tempos inicial (enchimento da dorna: T0) e final (esvaziamento da dorna com vinho a 0 °Brix: Tf) estão apresentados na Figura 10. O número de células (log UFC/mL) no interior da dorna é referente às células no início e final da fermentação, após quatro bateladas alimentadas. A quantidade de células presentes ao final da fermentação deveria ser semelhante à do início da batelada seguinte, o que não ocorreu ao longo das bateladas, devido à difícil homogeneização do mosto causado pela floculação das leveduras.

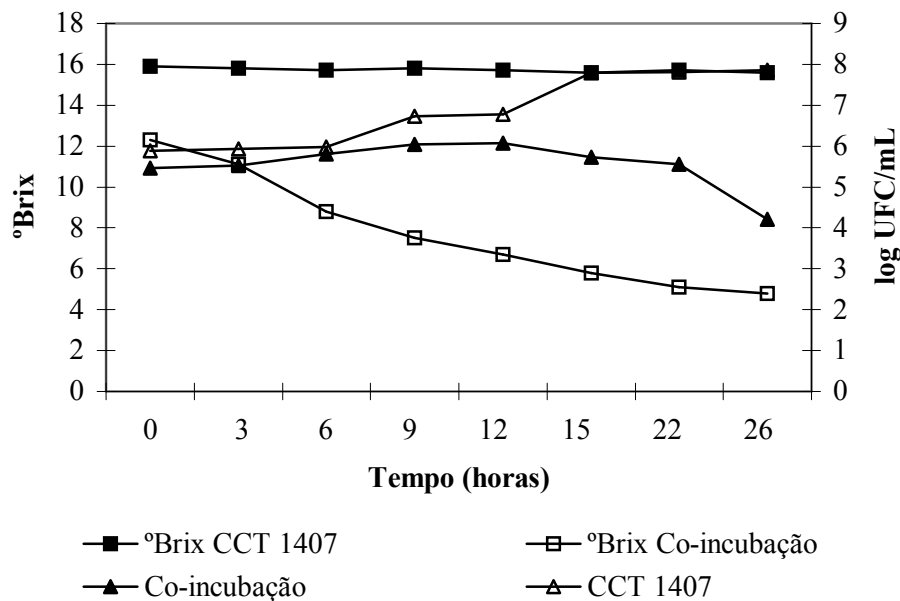


FIGURA 9 Avaliação da concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) e do crescimento (log UFC/mL) de *L. fermentum* CCT 1407 inoculado isoladamente e co-incubado com *S. cerevisiae* em frascos com caldo de cana 15°Brix a 30°C

O valor inicial (T0) oscilou entre $1,6 \times 10^8$ e $6,6 \times 10^9$ UFC/mL (8 a 10 log UFC/mL) e, no tempo final (Tf), entre $2,2 \times 10^{12}$ e $2,0 \times 10^{13}$ UFC/mL (12 a 14 log UFC/mL) (Figura 10).

Resultados semelhantes a estes foram observados por Carvalho (2004) trabalhando na avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação da cachaça artesanal. Os valores encontrados com a CA 116 inoculada isoladamente variaram de 9 a 10 log UFC/mL no tempo inicial e de 12 a 14 log UFC/mL no tempo final de fermentação.

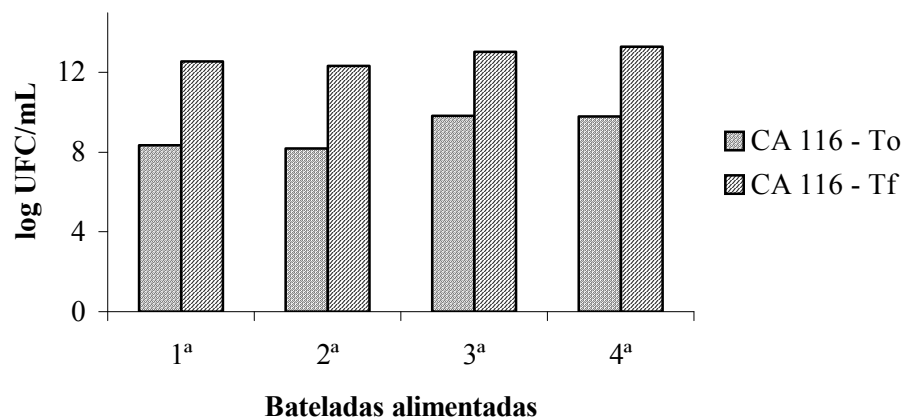


FIGURA 10 Avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* CA 116 durante a fermentação em dornas em quatro bateladas alimentadas nos tempos inicial (T0) e final (Tf) do enchimento das dornas

Verificou-se que o Tf da fermentação com *S. cerevisiae* inoculada isoladamente apresentou um menor valor de população na ordem de $3,6 \times 10^{12}$ UFC/mL (12,56 log UFC/mL) na 1ª batelada, em relação ao valor da 4ª batelada $2,0 \times 10^{13}$ UFC/mL (13,31 log UFC/mL).

Os resultados encontrados para a avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* durante a fermentação em dornas com quatro bateladas alimentadas nos tempos iniciais (T0) e finais (Tf) do enchimento da dorna estão apresentados na Figura 11.

No gráfico da Figura 11 percebe-se que o tempo final (Tf) de crescimento foi superior ao tempo inicial, o que, possivelmente, foi causado por problemas no momento de coleta das amostras. Houve uma oscilação no tamanho da população de *S. cerevisiae* no tempo inicial (T0) entre $1,7 \times 10^8$ e

7,8 x 10⁸ UFC/mL (8,24 a 8,89 log UFC/mL) e no tempo final (Tf) de 9,3 x 10⁸ e 3,4 x 10¹⁰ UFC/mL (8,35 a 10,53 log UFC/mL). Na população de *L. fermentum* no tempo inicial (T0), os resultados oscilaram de 6,2 x 10⁷ a 1,1 x 10⁸ UFC/mL (7,79 a 8,04 log UFC/mL) e o tempo final (Tf) de 1,5 x 10⁸ a 2,6 x 10⁸ UFC/mL (8,19 a 8,41 log de UFC/mL). Essas diferenças apresentadas entre os tempos T0 e Tf para os microrganismos co-incubados foram semelhantes aos obtidos na fermentação em frascos.

A população de *L. fermentum* durante a co-incubação tanto nos frascos como nas dornas, manteve-se aparentemente constante e não persistiu por um longo período, concordando com o que foi descrito por Schwan et al. (2001). Estes autores observam, ainda, que as bactérias produtoras do ácido láctico formam o grupo mais populoso, apesar de não terem sido capazes de se multiplicar durante a fermentação.

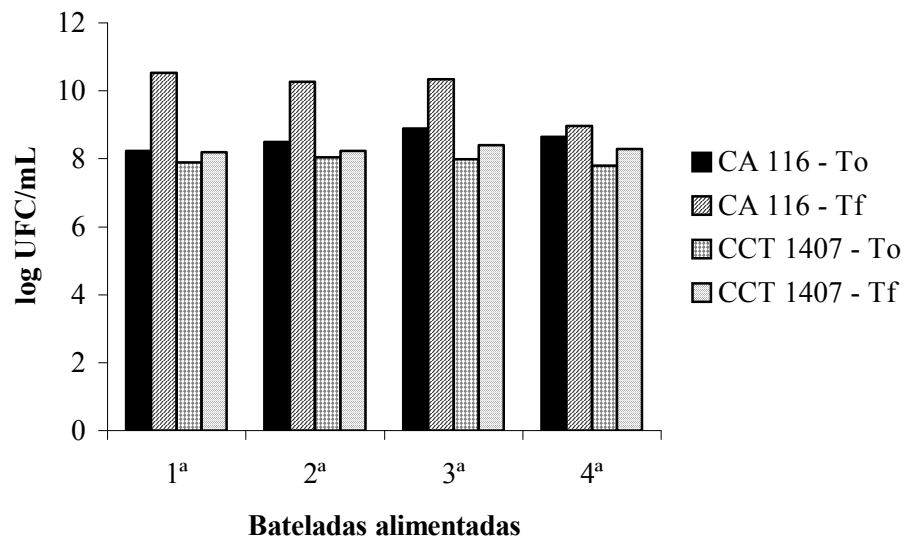


FIGURA 11 Avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 durante a fermentação em co-incubação em dornas com quatro bateladas alimentadas nos tempos iniciais (T0) e finais (Tf) do enchimento da dorna

4.2.2 Avaliação do teor de açúcares redutores

O gráfico da Figura 12 apresenta os teores de açúcares redutores observados na fermentação em frascos erlenmeyers. A cepa de *L. fermentum* CCT 1407 consumiu $4,75\text{g.L}^{-1}$ num período de 26 horas de incubação.

O mesmo comportamento foi encontrado em mosto de trigo fermentado com *Lactobacillus plantarum* inoculado isoladamente (Narendranath et al., 1997). Esta bactéria consumiu menos de 10g.L^{-1} de carboidratos fermentáveis para crescimento e metabolismo. Resultados semelhantes foram observadas nas cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus* #3, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* (Narendranath et al., 1997).

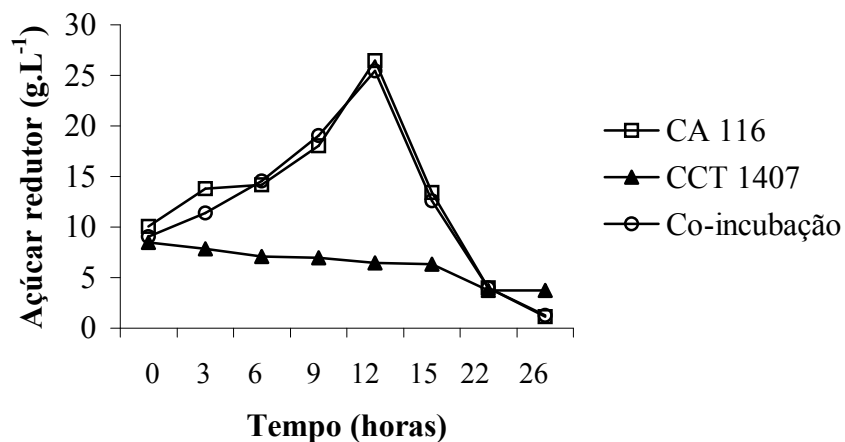


FIGURA 12 Avaliação do teor de açúcar redutor na fermentação em frascos com cepas de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 inoculados isoladamente e co-incubados em caldo de cana 15°Brix a 30°C

Isoladamente e co-incubada com *L. fermentum*, a levedura apresentou comportamento semelhante em relação ao consumo de açúcares redutores durante o período total de incubação. Os teores iniciais de açúcares redutores foram 10,09g.L⁻¹ para a levedura avaliada isoladamente e de 9,02g.L⁻¹ para a levedura co-incubada, atingindo um pico de aproximadamente 26g.L⁻¹, em 12 horas de incubação para ambos os microrganismos testados (Figura 12). Este pico ocorreu devido à hidrólise da sacarose por ação da invertase (exoenzima) extracelular procedente da *S. cerevisiae* CA 116. Os monossacarídeos (D-glicose + D-frutose) assim formados são fosforilados e convertidos em intermediários da glicólise. Nota-se que a sacarose é hidrolisada mais rapidamente do que consumida, sendo o resultado semelhante na inoculação isolada CA 116 e co-

incubada, corroborando com os resultados obtidos em melaço de beterraba por Essia Ngang et al. (1992).

Nas fermentações em dornas conduzidas com a cepa de *S. cerevisiae* e co-incubadas com *L. fermentum*, houve um comportamento semelhante quanto ao consumo de açúcares redutores. Foram encontrados os seguintes resultados na diferença entre tempos iniciais e finais nas quatro bateladas: 2,98; 2,91; 3,16 e 2,46g.L⁻¹ para a levedura inoculada isoladamente e 2,77; 2,10; 2,06 e 2,07g.L⁻¹ quando co-incubada. A variação destes teores ocorreu, provavelmente devido às pequenas oscilações no volume e tempo de enchimento, na diferença entre os teores de açúcar redutor nas repetições (Dornas A e B) e na metodologia adotada para manutenção do teor de °Brix no interior das dornas entre 5 a 7 unidades.

4.2.3 Avaliação do pH

A avaliação do pH durante a fermentação em frascos com cepas de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 inoculados isoladamente e co-incubados em caldo de cana 15°Brix a 30°C, está apresentada na Figura 13.

Inicialmente, o pH do caldo de cana inoculado com a bactéria *L. fermentum* isoladamente apresentou valor de 5,58. No caso de *S. cerevisiae*, o valor inicial do pH foi de 4,28 e, quando co-incubada com a *L. fermentum*, apresentou pH de 4,30.

Os resultados dos valores de pH no meio de cultivo foram semelhantes, tanto para *S. cerevisiae* inoculada isoladamente quanto a co-incubada com a bactéria láctica. Entretanto, quando se comparou o resultado encontrado para o *L. fermentum* isoladamente, observou-se que a mesma apresentou valor mais elevado de pH. Esta diferença pode ter ocorrido devido aos métodos experimentais utilizados, pois há necessidade de ambientação da *S. cerevisiae* CA 116 isoladamente e co-incubada ao °Brix do caldo de cana; a elevação deste deve acontecer de forma gradativa para não ocasionar um estresse osmótico da

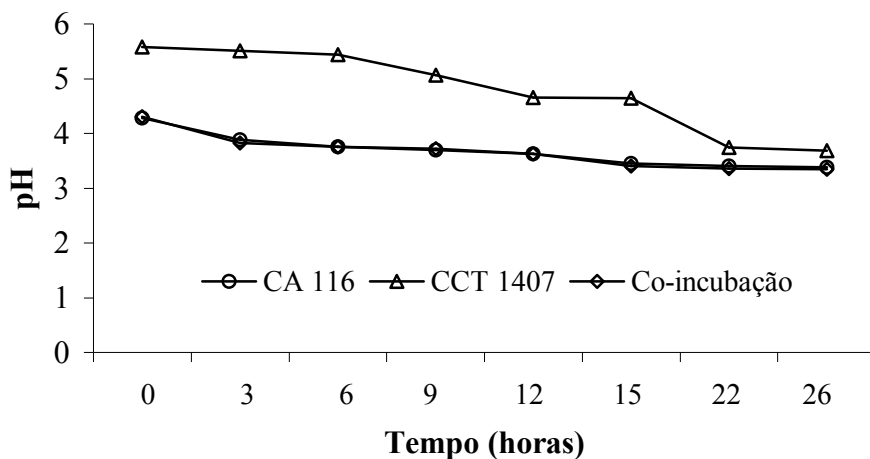


FIGURA 13 Avaliação do pH durante a fermentação em frascos com a cepa de *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407 inoculados isoladamente e co-incubados em caldo de cana 15°Brix a 30°C

levedura, fato que não ocorre quando inoculada com a bactéria *L. fermentum* (Figura 13).

A variação de pH no meio, quando cultivado com *L. fermentum* e *S. cerevisiae* isoladamente nos frascos, foi de 1,89 e 0,90, respectivamente, em 26 horas de incubação. Quando feita a co-incubação, o valor de pH apresentou variação de 0,95, sendo semelhante à *S. cerevisiae* inoculada isoladamente (0,90) (Figura 13).

O gráfico da Figura 14 apresenta a variação do pH durante a fermentação em dornas com cepa de *S. cerevisiae* CA 116 isoladamente e co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407 em caldo de cana.

As diferenças dos valores de pH para os tempos (T0 e Tf) para a

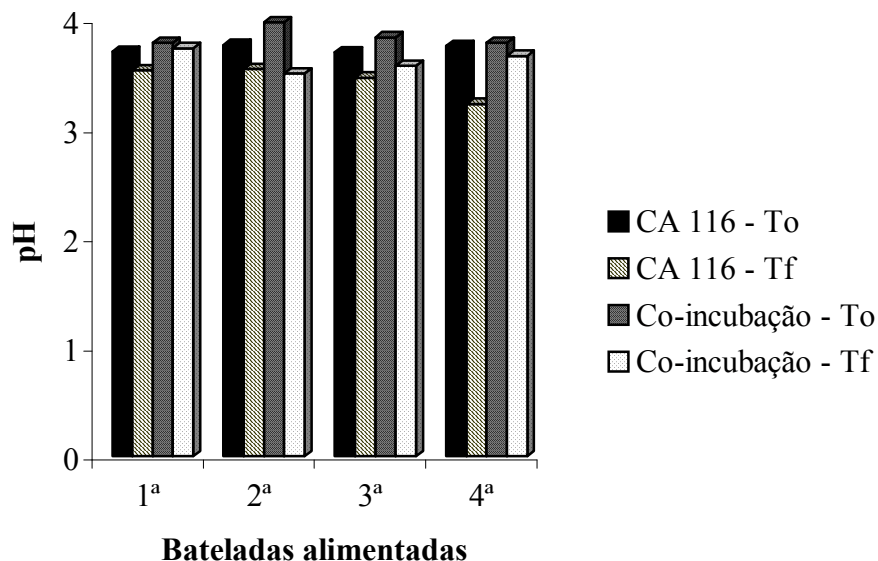


FIGURA 14 Valores de pH durante a fermentação em dornas com a cepa de *S. cerevisiae* CA 116 isoladamente e co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407 em caldo de cana

fermentação com *S. cerevisiae* isolada e co-incubada com *L. fermentum*, em quatro bateladas sucessivas foram de 0,29; 0,18; 0,03 e 0,39 e 0,05; 0,47; 0,26 e 0,12, respectivamente (Figura 14), mostrando que houve mínimas oscilações de pH entre as bateladas. As oscilações observadas entre as bateladas pode ter ocorrido em função da variação do volume (enchimento e retirada do caldo) nas dornas de fermentação.

4.2.4 Análise físico-química e cromatográfica da cachaça artesanal

As Tabelas 2A e 2B apresentam os resultados das análises físico-químicas das cachaças Tipo A (1ª, 2ª, 3ª e 4ª bateladas) e Tipo B (1ª, 2ª, 3ª e 4ª

bateladas) produzidas com a cepa de *S. cerevisiae* CA 116 e co-incubada com *L. fermentum* CCT 1407, respectivamente.

O grau alcoólico da cachaça Tipo B (1ª batelada) apresentou valor de 36% v/v, estando, portanto, fora do limite estabelecido pela legislação vigente no País (Brasil, 2003).

Os resultados da acidez volátil, álcool superior, aldeídos, ésteres e soma dos componentes secundários encontram-se dentro dos padrões em todas as bateladas analisadas, indicando uma adequada condução da destilação (Brasil, 1997).

Os teores de cobre encontrados nas cachaças Tipo B (1ª, 2ª, 3ª e 4ª bateladas) ficaram acima do estabelecido pela legislação, que é de 5,0mg/L de álcool anidro. Esse fato deve ter ocorrido, provavelmente, devido à deficiente manutenção do alambique, ocasionada por uma parada imprevista ao longo do desenvolvimento do trabalho.

A concentração de metanol na fração coração de todas as cachaças analisadas encontra-se dentro do limite máximo de 0,25mg/100mL de álcool anidro, indicando que o manejo realizado no momento do corte da fração “cabeça” das bebidas foi adequado. Segundo Maia (1994), numa correta destilação, a fração “cabeça” deve concentrar a maior parte do metanol proveniente do vinho num pequeno volume de destilado.

TABELA 2 Resultados de análise físico-química de cachaça artesanal produzida com CA 116 (A) e co-incubação CA 116 + CCT 1407 (B)

(A)

Análises	Limite		Batelada			
	Mínimo	Máximo	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Exame organoléptico	-x-	-x-	Normal	Normal	Normal	Normal
Densidade relativa (20°C)	-x-	-x-	0,952	0,951	0,950	0,948
Cobre (mg/L)	-x-	5	4,16	3,19	4,92	3,86
Extrato seco a 100°C (g/L)	-x-	-x-	0	0	0	0
Grau alcoólico real a 20°C (%v/v)	38	48	38	39	39,5	41
Acidez volátil em ácido acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	150	19,75	23,10	43,71	28,34
Álcool superior (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	300	257,07	240,33	210,55	218,14
Furfural (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	5	-x-	-x-	-x-	-x-
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	30	15,03	12,37	12,51	12,62
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	200	61,78	54,44	55,82	54,77
Soma dos componentes secundários (mg/100mL de álcool anidro)	200	650	353,65	330,25	322,60	313,89
Álcool metílico (mL/100mL de álcool anidro)	-x-	0,25	0,005	0,004	0,003	0,011

Continuação...

Tabela 2 Continuação**(B)**

Análises	Limite		Batelada			
	Mínimo	Máximo	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Exame organoléptico	-x-	-x-	Normal	Normal	Normal	Normal
Cobre (mg/L)	-x-	5	13,02	6,82	5,55	5,47
Extrato seco a 100°C (g/L)	-x-	-x-	0	0	0	0
Grau alcoólico real a 20°C (%v/v)	38	48	36	38	38,5	38
Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	150	47,54	37,53	27,30	22,82
Álcool superior (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	300	250,27	223,20	232,30	239,38
Furfural (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	5	-x-	-x-	-x-	-x-
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	30	16,97	22,39	23,62	25,31
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	200	55,01	58,02	56,21	57,70
Soma dos componentes secundários (mg/100mL de álcool anidro)	200	650	369,80	341,16	339,44	345,22
Álcool metílico (mL/100mL de álcool anidro)	-x-	0,25	0,014	0,011	0,007	0,008

TABELA 3 Concentração de álcoois superiores nas frações cabeça, coração e cauda das amostras de cachaças artesanais provenientes de diferentes tratamentos, cachaças Tipo A (1ª e 2ª bateladas) e B (3ª e 4ª bateladas)

Concentração na cachaça artesanal (mg/100mL)					
Álcoois superiores	Frações	Tipo A ¹	Tipo A	Tipo B ²	Tipo B
		1ª batelada	2ª batelada	3ª batelada	4ª batelada
Propanol	Cabeça	nd	11,67	nd	20,30
	Coração	26,70	nd	nd	17,01
	Cauda	nd	nd	nd	nd
Isobutanol	Cabeça	98,94	29,98	29,56	25,21
	Coração	37,12	33,43	32,94	33,71
	Cauda	nd	nd	nd	8,38
Butanol	Cabeça	nd	nd	nd	nd
	Coração	nd	4,55	nd	nd
	Cauda	nd	nd	nd	nd
Álcool isoamílico	Cabeça	415,49	146,33	380,72	262,00
	Coração	155,54	128,45	151,38	153,77
	Cauda	nd	22,55	27,54	36,09
Álcool amílico	Cabeça	nd	nd	nd	nd
	Coração	nd	nd	nd	nd
	Cauda	nd	nd	nd	nd

1- Fermentação CA 116

2- Co-incubação CA 116 + CCT 1407

nd- não detectado

A Tabela 3 apresenta a concentração dos álcoois superiores determinados por meio de cromatografia gasosa das cachaças Tipo A (1ª e 2ª bateladas) e Tipo B (3ª e 4ª bateladas) produzidas por *S. cerevisiae* CA 116 e co-incubadas com *L. fermentum* CCT 1407.

Os valores obtidos na composição cromatográfica dos álcoois superiores das cachaças Tipos A (1ª e 2ª bateladas) e B (3ª e 4ª bateladas), encontra-se na Tabela 3. A cachaça Tipo A (1ª batelada) diferenciou-se das demais por produzir

as maiores quantidades de propanol, isobutanol, álcool isoamílico, com exceção de butanol produzido apenas pela cachaça Tipo A (2ª batelada). No caso da aguardente de cana, têm sido também os mais determinados para avaliar a sua qualidade (Brasil, 1997; Boza & Horii, 1998).

Os álcoois superiores totais das 4 cachaças confirmam os resultados da análise físico-química quanto ao limite máximo permitido pela legislação e a preferência dos provadores pela cachaça Tipo A (1ª batelada), avaliada segundo a análise sensorial.

Nas cachaças analisadas, os álcoois superiores predominantes em ordem decrescente foram: álcool isoamílico com concentração variando de 71% a 82,2%, isobutanol de 16,5% a 20,0%, propanol de 8,3% a 12,2% e butanol 2,7%. Oliveira et al. (2002), estudando linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de fermentações de aguardente de cana-de-açúcar artesanal, encontraram resultados semelhantes nos teores predominantes de álcoois superiores, à exceção do butanol que não foi identificado pelos referidos autores.

O álcool isoamílico foi o composto que esteve presente em maiores concentrações em todas as bateladas analisadas, confirmando os resultados encontrados por Campos (2003) e Fialho (2004).

O metanol foi encontrado em pequenas quantidades nas concentrações de 0,065 e 0,063mL/100mL nas cachaças Tipo B (3ª e 4ª bateladas), indicando que o corte da fração “cabeça” foi corretamente realizado.

4.2.5 Análise sensorial da cachaça artesanal

Os resultados encontrados na análise sensoriais para os parâmetros de aparência, aroma, sabor e aspectos gerais são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 Valores médios das notas para cada atributo de análise sensorial avaliado

Bebida	Atributos			
	Aparência	Aroma	Sabor	Aspectos gerais
Tipo A ¹ (1ª batelada)	6,68 ^a	6,66 ^a	6,32 ^a	6,50 ^a
Tipo A (2ª batelada)	6,42 ^a	6,32 ^a	6,16 ^{ab}	6,14 ^{ab}
Tipo B ² (3ª batelada)	6,24 ^a	5,80 ^a	5,26 ^{bc}	5,46 ^{bc}
Tipo B (4ª batelada)	6,30 ^a	5,80 ^a	5,02 ^c	5,08 ^c

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

1- Tipo A (1ª e 2ª bateladas): fermentação com *S. cerevisiae* CA 116;

2- Tipo B (3ª e 4ª bateladas): co-incubação *S. cerevisiae* CA 116 e *L. fermentum* CCT 1407.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, observou-se que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os valores médios das notas para os atributos aparência e aroma em todas as bebidas; entretanto, para os atributos sabor e aspectos gerais houve diferença ($P < 0,05$) entre as cachaças Tipo A (1ª e 2ª bateladas) e do Tipo B (3ª e 4ª bateladas). Esta diferença nos indicou que a co-incubação entre *S. cerevisiae* e *L. fermentum* alterou as características sensoriais, reduzindo a aceitação das bebidas. Isso pode ser atribuído aos valores encontrados nas análises de acidez volátil, aldeídos e álcoois superiores, pois são compostos responsáveis diretamente pelo sabor, odor e aroma.

A acidez volátil na cachaça Tipo A (1ª batelada) apresentou o menor valor (19,75mg/100mL de álcool anidro) em comparação com as demais bebidas, confirmando a preferência dos provadores pelos atributos de sabor e aspectos gerais. Bebidas com teores elevados de acidez são consideradas mais fortes, por ser um dos componentes mais agressivos ao organismo (Mutton & Providello, 1998). Boza & Horii (1998) acrescentam ainda, por meio da correlação entre análises química e sensorial de várias aguardentes, é possível

identificar que aguardentes com baixos teores de acidez apresentam as melhores características sensoriais.

As cachaças Tipo B (3ª e 4ª bateladas) tenderam a apresentar maiores teores de aldeídos, quando comparadas com as cachaças Tipo A (1ª e 2ª bateladas). O excesso de aldeídos nas cachaças pode ser uma indicação de oxidação espontânea ou também da atividade de bactérias contaminantes (Yokoya, 1995).

Outro fator que contribuiu para a baixa aceitação verificada para as cachaças Tipo B (3ª e 4ª bateladas) foi a média de álcool superior. Na cachaça Tipo A (1ª e 2ª bateladas), foram observadas as maiores médias: 257,07 e 240,33mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente, em comparação com as cachaças Tipo B (3ª e 4ª bateladas,) esses valores foram, respectivamente, de 232,30 e 239,38mg/100 mL de álcool anidro. Alcoois superiores são responsáveis diretos pela alteração no odor da bebida, conferindo aromas característicos pelo fato de serem originados a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras (Cardoso, 2003).

A Tabela 5 apresenta as porcentagens de aceite e recusa das bebidas (cachaças) em relação aos atributos analisados pela escala hedônica.

Considerando a aparência, o aroma, o sabor e o aspecto geral, a cachaça mais aceita pelos provadores foi a Tipo A (1ª batelada) com médias de: 82,3%; 89,2%; 91,5% e 90,8% respectivamente, indicando uma melhor aceitação por parte dos provadores. A cachaça Tipo B (4ª batelada) apresentou porcentagem de recusa maior em relação aos atributos avaliados, com exceção da aparência, apresentando médias de: 19,3% para aroma; 27,9% para sabor e 25,6% para aspectos gerais, indicando mais uma vez que a co-incubação influenciou negativamente no “flavour” da cachaça.

TABELA 5 Porcentagem de aceite e recusa das bebidas, conforme análise de escala hedônica de 9 pontos respondida por 50 provadores não treinados

Atributos	Bebida	(1-4)	(6-9)
Aparência	Tipo A (1ª batelada)	2,7%	82,3%
	Tipo A (2ª batelada)	6,5%	77,9%
	Tipo B (3ª batelada)	2,9%	71,5%
	Tipo B (4ª batelada)	5,4%	70,8%
Aroma	Tipo A (1ª batelada)	4,8%	89,2%
	Tipo A (2ª batelada)	6,6%	83,9%
	Tipo B (3ª batelada)	18,3%	76,5%
	Tipo B (4ª batelada)	19,3%	75,5%
Sabor	Tipo A (1ª batelada)	5,4%	91,5%
	Tipo A (2ª batelada)	13,3%	81,8%
	Tipo B (3ª batelada)	23,9%	72,2%
	Tipo B (4ª batelada)	27,9%	68,1%
Aspectos gerais	Tipo A (1ª batelada)	3,1%	90,8%
	Tipo A (2ª batelada)	13,0%	82,1%
	Tipo B (3ª batelada)	21,6%	74,7%
	Tipo B (4ª batelada)	25,6%	60,6%

(1-4) Recusa

(6-9) Aceitação

5 CONCLUSÕES

A partir dos dados observados foi possível concluir que:

O meio MCC (5°Brix + 1% de extrato de levedura) apresentou mesma eficiência para o crescimento da cepa de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 quando comparado com o meio MRS.

O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* não foi influenciado pela co-incubação com *Lactobacillus fermentum*.

Lactobacillus fermentum não competiu com a *Saccharomyces cerevisiae* pelo consumo de açúcares redutores.

A co-incubação de *Lactobacillus fermentum* com *Saccharomyces cerevisiae* não contribuiu para a redução do pH.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CA 116 reprimiu o crescimento de *Lactobacillus fermentum* após 12 horas de co-incubação.

A presença de *Lactobacillus fermentum* durante a fermentação alcoólica interferiu negativamente na qualidade sensorial da cachaça artesanal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2005. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2005. 520 p.
- ALCARDE, A. R.; ROSSI, P.; BISCOLA, V.; HORII, J. Cultivo misto de leveduras e bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre, RS, 2002. p. 936-939.
- ALCARDE, V. E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v. 21, n. 4, p. 40-42, mar./abr. 2003.
- ANDRADE, L. A. de B. Cultura da cana de açúcar. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Produção artesanal de cachaça de qualidade**. Lavras, 2003. p. 01-17.
- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. (Coord.). **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4, cap. 1. (Série Biotecnologia Industrial).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of official analytical chemistry**. 12. ed. Washington, 1992. 1015 p.
- BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 77-82, 1997. Suplemento 1.
- BOZA, Y. E. A. G.; HORII, J. A destilação na obtenção de aguardente de cana-de-açúcar. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 98-105, jan./jun. 1999.
- BOZA, Y. E. A. G.; HORII, 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 nº 2.314 do Ministério da Agricultura de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de set. de 1997.

BRASIL. **Decreto nº 4.851 – 02 de outubro de 2003**. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 08 set. 2003.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 207-216, jan./abr. 1999.

CADWELL, D. R. **Microbial physiology and metabolism**. Dubuque: Wm. C. Brown, 1995. 353 p.

CAMPOS, C. R. **Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça**. 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 131-149, Sept. 1999.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Produção artesanal de cachaça de qualidade**. Lavras, 2003. p. 61-73.

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

CARVALHO, M. G.; SILVA, P. S. **Cachaça: uma alegre história brasileira**. São Paulo: Caninha 51, 1998. 157 p.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 123 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology and Technology**, Woburn, v. 16, n. 4, p. 311-317, Apr. 1994.

DIAS, D. R. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir de frutas tropicais**. 2001. 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.1, n. 23, p. 130-135, 1960.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 123 p.

ESSIA NGANG, J. J.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of *lactobacilli* during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, London, v. 14, n. 8, p. 741-746, Aug. 1992.

FERREIRA, D. F. SISVAR 4.3 – **Sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA, 1999.

FIALHO, C. J. **Avaliação da estabilidade de leveduras selecionadas para a produção de cachaça**. 2004. 90 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP.

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 Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLEET, G. H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; REBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 1034-1038. 1984.

FURTADO, S. M. B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas**. 1995. 99 p. Tese (Doutorado

em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos.
Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v. 10, n. 5, p. 30-34, maio/jun. 1992.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v. 9, n. 5, p. 35-37, jul./ago. 1991.

GOMES, F. C. O.; PATARO, C.; GUERRA, J. B.; NEVES, M. J.; CORRÊA, S. R.; MOREIRA, E. S. A.; ROSA, C. A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 399-406, May 2002.

GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRlich, E. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 82, n. 1/4, p. 187-216, Aug. 2002.

GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 106-111, Aug. 2001.

HAMMES, N. W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 3, p. 727-728, Sept. 1985.

KANDLER, O.; WEISS, R. B. Regular nonsporing gram positive rods. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLF, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkens, 1986. v. 2, p. 1208-1234.

LACHANCE, M. A. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 68, n. 2, p. 151-160, Aug. 1995.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1995. v. 1, 262 p.
- LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1. (Série Biotecnologia Industrial).
- LOPES, C. A.; VAN BROOCK, M.; 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, v. 93, n. 4, p. 608-615, 2002.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.
- MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, jul./ago. 1994.
- MAIA, A. B. R. A. **1º Curso AMPAQ de produção artesanal de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte, 1995. 106 p. (apostila).
- MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 14. p. 350-357, May. 1992.
- MENDONÇA, A. T. **Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentações espontâneas de cana-de-açúcar**. 1999. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 13, n. 2, p. 241-243, Mar. 1997.

MUTTON, M. J. R.; PROVIDELLO, R. A. Avaliação dos contaminantes no processo fermentativo e seus reflexos sobre a qualidade da aguardente produzida. **Ciência & Engenharia**, Uberlândia, v. 7, n. 2, p. 26-28, 1998.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on yeast-catalysed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, Nov. 1997.

NOVAES, F. V.; STUPIELLO, J. P.; OLIVEIRA, A. J.; DELGADO, A. A.; OLIVEIRA, E. R.; AZEREDO-CESAR, M. A.; VALSECHI, O. “**Tecnologia das aguardentes**”. Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Tecnologia Rural, 1971.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan./mar. 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 170-174, jul./set. 1996.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 20, n. 1, p. 19-24, Feb. 2004.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações de aguardente de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre, RS, 2002. p. 336-339.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 520-527, set./dez. 1998.

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

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 1-9, July 2000.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 29, n. 1, p. 69-73, jan./mar. 1998.

PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. das G.; AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R. de; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, set./out., 2003.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFRV, 2001. 279 p.

ROSE, A H. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: ROSE, A H. (Ed). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v. 1, cap. 1 (Economic microbiology series).

SALES, A. C. Dimensionamento e operação de uma unidade produtora de aguardente. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Produção artesanal de cachaça de qualidade**. Lavras: FAEPE/ UFLA, 2003. p. 18-44.

SANTANA, D. M. N. **Controle de qualidade de produtos agropecuários**. Seropédica: UFRRJ - Imprensa Universitária, 1995. 157 p. Apostila.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 45-57.

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

SEBRAE-MG. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. 259 p.

SILVEIRA, L. C. I.; BARBOSA, M. H. P.; OLIVEIRA, M. W. Manejo de variedades de cana-de-açúcar predominantes nas principais regiões produtoras de cachaça em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 25-32, 2002.

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 Agrotecnologi.**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 893-898, jul./ago. 2004.

STROPPIA, C. T.; SERRA, G.; ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.. ANDRIETTA, S. R. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. **STAB**, Piracicaba, v. 16, n. 3, p. 35-38, jan./fev. 1998.

TAUPIER, L. O. G.; RODRÍGUEZ, G. G. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matéria-prima, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Cap. 1, a cana-de-açúcar. Brasília: ABIPTI, 1999. 474 p.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 5, p. 819-828, May 2001.

TORIJA, M. J.; ROZÉS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v. 79, n. 3/4, p. 345-352, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artemed, 2002. 827 p.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F. Evolution of the lactic bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 297-305, Jan. 2002.

WICK, M.; LEBEAULT, J. M. Pressure measurement to evaluate ethanol or lactic acid production during glucose fermentation by yeast or heterofermentative bacteria in pure and mixed culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 5/6, p. 687-692, Sept. 2001.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias “André Tosello”, 1995. 92 p.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 38-39, jul./ago. 1991.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 12-16, jan./mar. 1991.

ANEXOS

ANEXO A		Página
FIGURA 1A	Ficha modelo para avaliação sensorial de preferência da cachaça em relação a aparência, aroma e sabor.....	68
FIGURA 2A	Ficha modelo para avaliação sensorial de preferência nos aspectos gerais da cachaça	69

TESTE DE PREFERÊNCIA

ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Nº da amostra: _____

Avalie cada amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto gostou ou desgostou do produto, de acordo com os seguintes atributos:

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
1. Desgostei muitíssimo	1. Desgostei muitíssimo	1. Desgostei muitíssimo
2. Desgostei muito	2. Desgostei muito	2. Desgostei muito
3. Desgostei regularmente	3. Desgostei regularmente	3. Desgostei regularmente
4. Desgostei ligeiramente	4. Desgostei ligeiramente	4. Desgostei ligeiramente
5. Indiferente	5. Indiferente	5. Indiferente
6. Gostei ligeiramente	6. Gostei ligeiramente	6. Gostei ligeiramente
7. Gostei regularmente	7. Gostei regularmente	7. Gostei regularmente
8. Gostei muito	8. Gostei muito	8. Gostei muito
9. Gostei muitíssimo	9. Gostei muitíssimo	9. Gostei muitíssimo

Comentários: _____

FIGURA 1A Ficha modelo para avaliação sensorial de preferência da cachaça em relação a aparência, aroma e sabor.

ASPECTOS GERAIS DA CACHAÇA

Nome: _____ Data: _____

Nº da amostra: _____

Avalie cada amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto gostou ou desgostou do produto.

1. Desgostei muitíssimo
2. Desgostei muito
3. Desgostei regularmente
4. Desgostei ligeiramente
5. Indiferente
6. Gostei ligeiramente
7. Gostei regularmente
8. Gostei muito
9. Gostei muitíssimo

Comentários: _____

FIGURA 2A Ficha modelo para avaliação sensorial de preferência nos aspectos gerais da cachaça.