

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE
Saccharomyces cerevisiae e *Lactococcus lactis* NA
FERMENTAÇÃO DA CACHAÇA ARTESANAL**

FERNANDA PAULA CARVALHO

2004

FERNANDA PAULA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* e
Lactococcus lactis NA FERMENTAÇÃO DA CACHAÇA ARTESANAL**

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

Orientadora

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

Carvalho, Fernanda Paula

*Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação da cachaça artesanal / Fernanda Paula Carvalho. --*
Lavras : UFLA, 2004.

76 p. : il.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

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

CDD-663.53

FERNANDA PAULA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* e
Lactococcus lactis NA FERMENTAÇÃO DA CACHAÇA ARTESANAL**

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

APROVADA em 03 de março de 2004.

Profa. Rosane Freitas Schwan UFLA

Prof. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Roberta Hilsdorf Piccoli
Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICO

***A todos aqueles que contribuíram
para a minha formação***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais, pelo carinho e incentivo nos momentos mais difíceis.

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

À professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação neste trabalho.

Ao meu noivo, William, pela compreensão durante minha ausência.

Ao Alexandre e Sabrina, pelo incentivo durante a realização do mestrado.

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão.

À grande amiga Aramália, pela amizade, carinho e presença constante em todas as etapas deste trabalho.

À amiga Claudinelli, pela companhia e alegria transmitidas diariamente.

Aos amigos Mirian, Éderson, Alexandre pelo agradável convívio.

Aos colegas de laboratório, Cristina, Evânia, Marisa, Luiz, Cláudia Labory, Raquel, Cássia, Sílvia, Pascoal, Luana, Leidiane, Claudinha, Rogério, Euziclei, Márcio, Cláudia Eugênia, Sheila, Débora e João Borges pela amizade e companhia.

Aos estagiários Wasley e Ana Paula, pelo apoio na fase final do experimento.

Ao Sr. Antônio Claret Sales, funcionários e familiares, pelo fornecimento do caldo de cana, estágio e visita técnica a alambiques.

Aos professores Eustáquio, Rosane, Romildo, Disney e Roberta, pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários Lamartine, Ivani, Magda, Cidinha, Rosângela e Erondina, pelo apoio.

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

À FAPEMIG, pela bolsa e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos Departamentos de Biologia e Ciência de Alimentos, pelos materiais concedidos para realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	i
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Bebidas alcoólicas.....	3
2.2 Cana-de-açúcar.....	4
2.3 Fermentação alcoólica.....	6
2.4 Microrganismos envolvidos na fermentação.....	7
2.4.1 Leveduras selecionadas.....	8
2.4.2 Bactérias láticas.....	10
2.4.3 Interação levedura-bactéria.....	11
2.5 Processo tradicional de produção de cachaça.....	15
2.6 Fases da curva de crescimento.....	20
2.7 Compostos voláteis em bebidas alcoólicas.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CA116) e <i>Lactococcus lactis</i>	26
3.1.1 Microrganismos e reativação do inóculo.....	26
3.1.2 Preparo do inóculo e adaptação dos microrganismos.....	26
3.1.3 Cana-de-açúcar e preparo do mosto.....	27
3.1.4 Inoculação.....	27
3.1.5 Análises realizadas.....	28
3.1.5.1 Análise microbiológica.....	28
3.1.5.2 Análises químicas.....	28
3.1.5.3 Análise estatística.....	29
3.2 Seleção da fonte ideal de crescimento para <i>Lactococcus lactis</i>	29
3.2.1 Inoculação.....	29
3.2.2 Análises realizadas.....	29
3.2.2.1 Análise microbiológica.....	30
3.3 Avaliação do crescimento e do teor de açúcares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactococcus lactis</i> em caldo de cana 5°B.....	30
3.3.1 Adaptação.....	30
3.3.2 Inoculação.....	30
3.3.3 Análises realizadas.....	31
3.3.3.1 Análise microbiológica.....	31
3.3.3.2 Análise química.....	31

3.4 Avaliação da interação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactococcus lactis</i> na fermentação da cachaça artesanal	31
3.4.1 Cana-de-açúcar e preparo do mosto	31
3.4.2 Preparo do inóculo e adaptação	32
3.4.3 Inoculação	33
3.4.3.1 Fermentação em frascos.....	33
3.4.3.2 Fermentação em dornas	33
3.4.3.2.1 Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> (CA116).....	33
3.4.3.2.2 Co-incubação de <i>S. cerevisiae</i> (CA116) e <i>L. lactis</i>	33
3.4.4 Processo fermentativo	33
3.4.4.1 Fermentação em frascos.....	33
3.4.4.2 Fermentação em dornas	34
3.4.5 Destilação.....	34
3.4.6 Análises realizadas	35
3.4.6.1 Análises microbiológicas	35
3.4.6.2 Análises químicas	36
3.4.6.3 Análise sensorial.....	37
3.4.6.4 Análise estatística	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CA116) e <i>Lactococcus lactis</i>	38
4.2 Seleção da fonte ideal de crescimento para <i>Lactococcus lactis</i>	44
4.3 Avaliação do crescimento e do teor de açúcares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactococcus lactis</i> em caldo de cana 5 °B	45
4.4 Avaliação da interação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactococcus lactis</i> na fermentação da cachaça artesanal	50
4.4.1 Avaliação do crescimento.....	50
4.4.2 Avaliação do teor de açúcares redutores	55
4.4.3 Avaliação do pH.....	58
4.4.4 Análise físico-química e cromatográfica da cachaça.....	60
4.4.5 Análise sensorial da cachaça	64
5 CONCLUSÕES	67
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	74

RESUMO

CARVALHO, Fernanda Paula. 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*.

A cachaça artesanal é uma bebida destilada originada da fermentação natural da cana-de-açúcar, com 38% a 48% de etanol v/v, sendo frequentemente envelhecida em tonéis de madeira por diversos anos. A população microbiana compreende leveduras e bactérias, as quais interagem durante o processo fermentativo. Tem sido relatado que *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura predominante, mas elevada população de bactérias ácido-láticas tem sido encontrada durante a fermentação do caldo da cana-de-açúcar, tendo *Lactococcus lactis* sido a bactéria mais isolada em alambiques de Minas Gerais. O objetivo deste trabalho foi verificar a interação entre cultura iniciadoras de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* durante a fermentação alcoólica e avaliar a qualidade do produto final. O meio de cultura contendo caldo de cana-de-açúcar a 5° Brix acrescido de 0,1% e 1% de extrato de levedura foi selecionado para crescimento de bactérias e leveduras iniciadoras. A fermentação foi realizada em Erlenmeyers e em dornas de 20 L inoculadas com CA116, adicionada de *L. lactis* e comparadas com fermentação contendo CA116 isoladamente. As culturas iniciadoras foram inoculadas a 10^8 UFC/mL de leveduras e 10^4 UFC/mL de bactérias. Foram observados um aumento na população de leveduras que atingiu 10^{11} UFC/mL após as primeiras 16 horas de fermentação. *L. lactis* não apresentou crescimento durante o processo fermentativo e a sua população diminuiu após 3 bateladas consecutivas. Foi observado durante o experimento que a população mista microbiana inoculada não interferiu nem no crescimento e nem na produção de etanol por *S. cerevisiae* (CA116). As concentrações de álcoois superiores foram aproximadamente 300 mg/100 mL de álcool anidro em todas as bateladas analisadas. A análise sensorial da cachaça produzida foi realizada com 37 provadores não treinados, usando-se a escala hedônica (1-9). Os dados foram avaliados pelos testes paramétricos e não paramétricos, utilizando as faces de Chernoff. A análise sensorial indicou que não houve diferença significativa entre as bebidas finais analisadas.

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

ABSTRACT

CARVALHO, Fernanda Paula. Evaluation of interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation of artisanal cachaça. 2004. 76 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The artisanal cachaça is a distilled beverage from a natural fermentation of sugar cane, which has 38% to 48% ethanol v/v and is often allowed to mature in wooden barrels for several years. The microbial population comprising yeast and bacteria which interact during the fermentative process. It has been reported that *Saccharomyces cerevisiae* is the predominant yeast but it was also found high population of lactic acid bacteria during sugar cane fermentation. *Lactococcus lactis* was one of the bacteria often found in the alambiques of Minas Gerais. The aim of this work was to verify the interaction between selected start culture of *Saccharomyces cerevisiae* (CA116) and lactic acid bacteria during cachaça fermentation and to evaluate the quality of final product. The culture medium containing sugar cane broth at 5 °Brix plus 1% of yeast extract was selected for growth of both yeast and bacteria as starters. The fermentations were done in vats of 20 L inoculating CA 116 plus *L. lactis* and compared with fermentations containing only CA116. The starters were inoculated at 10^8 cells/ml of yeasts and 10^4 cells/ml of bacteria. It was observed that the *S. cerevisiae* increased the population and reached 10^{11} cels/mL after 16 hours of fermentation. *L. lactis* did not grow during fermentation and decreased the population after 3 consecutive batches. It was observed that the mixed microbial fermentation did not interfere in neither growth nor ethanol production by *S. cerevisiae* CA 116. The higher alcohol content was approximately 300 mg/100 mL anhydrous alcohol in all samples analysed. The sensorial analysis of the cachaça produced was assessed by 37 untrained panellists using the hedonic scale (1-9), and the data was evaluated by the Chernoff test, non-parametrical, utilising the Statistical program. The sensorial analysis indicated that there was no significant differences among the final beverages analysed.

* Guidance Committee: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Major Professor), Rosane Freitas Schwan – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% v/v, a 20°C. Ela é obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L expressos em sacarose (Brasil, 2003). A cachaça é a segunda bebida mais consumida no mercado brasileiro e a sua aceitação no mercado externo tem apresentado crescimento acentuado, tornando-a o terceiro destilado mais consumido no mundo. A produção nacional desta bebida está estimada em 1,3 bilhão de litros por ano, sendo que o estado de Minas Gerais contribui com aproximadamente 160 milhões de litros (Estanislau et al., 2002).

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

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

A população microbiana natural do caldo de cana é composta por bactérias e leveduras que interagem no decorrer do processo fermentativo, sendo observada a ocorrência freqüente de bactérias lácticas e diversas linhagens de leveduras durante a fermentação alcoólica. Esta diversidade de microrganismos envolvidos na fermentação pode ocasionar oscilações na qualidade da bebida ao

longo da safra. Atualmente, empregam-se linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de alambiques como iniciadoras do processo fermentativo para garantir a padronização na qualidade da bebida, visto sua capacidade de dominar a fermentação e diminuir as contaminações bacterianas. Entretanto, ainda pouco se conhece sobre a interação de leveduras e bactérias lácticas e a influência destas bactérias no *flavor* final da bebida (Pataro et al., 2002).

Os objetivos deste trabalho foram: i) selecionar um meio de cultivo alternativo e menos oneroso que os utilizados em escalas laboratoriais para posterior multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis*; ii) avaliar a fonte de nutrientes requerida para o crescimento de *L. lactis*; iii) avaliar o comportamento dos microrganismos nos meios selecionados anteriormente; iv) avaliar a interação dos microrganismos *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* durante a fermentação alcoólica e v) verificar se existe contribuição dessa bactéria na qualidade final da bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bebidas alcoólicas

A legislação brasileira define bebida alcoólica como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante, destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais de meio grau Gay-Lussac de álcool etílico. As bebidas alcoólicas são geralmente classificadas em dois grandes grupos: fermentadas e destiladas. Os dois grupos são obtidos por fermentação, sendo que o último passa pelo processo de destilação (Aquarone, 2001). As bebidas que contêm baixos teores de álcool (10%-12%) são produzidas por fermentação. Já as bebidas com elevadas concentrações de álcool são obtidas por meio da destilação do produto fermentado (Carliile et al., 2001).

A produção de bebidas destiladas deve ter começado em vinícolas, em regiões produtoras de bebidas fermentadas de produtos amiláceos. O nome dado ao produto fermentado era “água-da-vida”, *acquavite* em italiano, *eau-de-vie* em francês, *acqua ardens* em grego e *uisgebeatha* em gaélico (Pataro et al., 2002). Na Itália, o destilado de uva ficou conhecido como *grappa*; na Alemanha, o destilado de cereja como *kirsch*; o *whisky* é o destilado da cevada sacarificada produzido na Escócia e na Rússia, a *vodka* é o destilado do centeio. Em Portugal, o destilado de bagaço de uva é denominado de bagaceira (Lima, 2001).

As bebidas destiladas podem ser produzidas de materiais alcoólicos como mostos fermentados de grão de cereais, de suco de frutas, caldo de cana açúcar, melado, mel e extrato de cacto. Algumas importantes bebidas destiladas são “brandy”, “brandy” fruta, rum, tequila, “whisky” e cachaça (Reed & Nagodawithana, 1991; Watson, 1977).

A história da cachaça se confunde com a própria história do Brasil. Entre 1532 e 1548, os portugueses trouxeram a cana-de-açúcar, originária da Ásia

Meridional e então se produzia uma bebida alcoólica resultante dos tachos de melaço, a garapa azeda, que passou mais tarde a ser chamada *cagaça* e, finalmente, *cachaça* (Pataro et al., 2002).

A cachaça é uma bebida tipicamente brasileira, exótica e de sabor especial, que vem conquistando o mercado externo (Estanislau et al., 2002). É necessário dividir o setor de cachaça em dois blocos: a caninha industrial, dominada pelas grandes indústrias de São Paulo e do Nordeste, e a cachaça artesanal de alambique, liderada por Minas Gerais (Campelo, 2002).

A cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% v/v, a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose (Brasil, 2003).

2.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à classe das Monocotiledônias, família Poaceae (Gramíneas), do gênero *Saccharum*. Esta planta se desenvolve bem em climas tropicais e subtropicais (Andrade, 2001).

A cana-de-açúcar constitui, sob os aspectos econômico e social, uma das principais culturas do país, e vem sendo utilizada desde o início da colonização do Brasil para a produção de cachaça, açúcar e na alimentação animal. A partir da década de 1980, ela passou a ser empregada também na produção de álcool carburante (Silveira et al., 2002).

O Brasil tem área plantada com cana-de-açúcar de aproximadamente 4,3 milhões de ha, sendo o maior produtor mundial (aproximadamente 275 milhões de t/ano, 30% da produção mundial). O estado de São Paulo é o principal produtor (135 milhões de t/ano, cerca de 50% da produção nacional) e o estado

de Minas Gerais é o quarto maior produtor (cerca de 18 milhões de t/ano, 7% da produção nacional) (Andrade, 2001).

Em geral, a cana-de-açúcar necessita de 6 a 8 meses com temperaturas elevadas, radiação solar intensa e precipitações regulares para que ocorra pleno crescimento vegetativo, acompanhado por gradual formação de sacarose nos internódios adultos. Após este período, 4 ou 6 meses de estação seca e ou baixas temperaturas favorecem a formação predominante de sacarose. Os principais açúcares redutores são a glicose e a frutose, ocorrendo a diminuição destes teores com o amadurecimento da cana. A concentração de açúcares é maior no sentido da base dos colmos para o ápice e da parte externa para a parte interna (Silveira et al., 2002; Andrade, 2001; Lima et al., 2001).

A cana-de-açúcar é uma cultura plurianual, com colheita anual. A média do rendimento agrícola é de 85 – 100 toneladas/hectare/ano em grandes culturas e condições normais. A cana-de-açúcar pode conter: 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose e 0,6% de frutose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos. O caldo obtido pela moagem da cana possui pH entre 5,2 e 6,8 e é constituído de 78% - 86% de água, 10%-20% de sacarose, 0,1%-2% de açúcares redutores, 0,3%-0,5% de cinzas e 0,5%-1% de compostos nitrogenados (Lima et al., 2001).

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

A utilização de cana-de-açúcar com qualidade é o início para o sucesso na produção de cachaça (Silveira et al., 2002).

2.3 Fermentação alcoólica

O termo fermentação é derivado do verbo latim *fervere*, que significa ferver, o que descreve a aparência da ação das leveduras no mosto (Stanbury et al., 1994).

A fermentação alcoólica é o processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose. Primeiramente, através da via glicolítica, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato por meio de dez reações catalisadas por diferentes enzimas. As duas moléculas de piruvato sob condições anaeróbicas são descarboxiladas pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de gás carbônico. As moléculas de acetaldeído são reduzidas a duas moléculas de etanol pela enzima álcool desidrogenase (Voet et al., 2000; Campbell, 2000; Tortora, 2000). Além do álcool etílico e CO₂, outros metabólitos são produzidos durante a fermentação alcoólica, como glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoina, butilenoglicol, etc. (Lima et al., 2001). O número de co-produtos da fermentação alcoólica, como glicerol, acetaldeído e ácidos orgânicos, diminui o rendimento em etanol (Reed & Nagodawithana, 1991). O etanol e o CO₂ são apenas produtos de excreção da célula e não são utilizados pela levedura em condições anaeróbicas. Além das rotas que levam à formação do etanol, rotas alternativas são utilizadas para formação de materiais necessários à constituição de biomassa (polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros), além de produtos necessários à adaptação e sobrevivência (Lima et al., 2001).

No início da fermentação, quando o açúcar disponível para as leveduras é a sacarose, esta é quase imediatamente hidrolisada à glicose e frutose pela ação da enzima invertase. A maioria das linhagens de leveduras é glicofílica, ou seja, fermenta a glicose em taxas mais rápidas que a frutose (Reed & Nagodawithana, 1991).

Em condições industriais, há desvio de 10% do açúcar consumido para a formação de produtos secundários da fermentação (Lima et al., 2001).

A fermentação anaeróbica de açúcares é composta por reações exotérmicas que liberam 23 a 24 kcal por mol de glicose fermentado (Reed & Nagodawithana, 1991). A fermentação alcoólica é um processo de grande importância, realizado por vários microrganismos, pelo qual obtêm-se todo o álcool industrial e ampla variedade de bebidas alcoólicas, destiladas ou não (Lima et al., 2001; Carlile et al., 2001).

O principal microrganismo utilizado na produção de bebidas alcoólicas é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Reed & Nagodawithana, 1991).

Quando as leveduras se encontram sob escassez ou ausência de oxigênio ou em elevadas concentrações de açúcares, ocorre o processo de fermentação (Carlile et al., 2001). A levedura se utiliza da fermentação para gerar energia, ATP (adenosina trifosfato), realizando, assim, diversos trabalhos fisiológicos e biossíntese para a manutenção da vida, o crescimento e a multiplicação celular.

2.4 Microrganismos envolvidos na fermentação

A fermentação de frutas e sucos de frutas ocorre naturalmente e espontaneamente sem a intervenção humana, sendo praticada há muitos anos. Durante a fermentação, ocorre uma multiplicação sucessiva de leveduras pertencentes aos gêneros *Kloeckera*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Cândida*, *Pichia* e *Torulaspora*, que são substituídas por *Saccharomyces cerevisiae* no decorrer do processo fermentativo (Reed & Nagodawithana, 1991).

Schwan et al. (2001) relataram que, após a identificação de 443 leveduras isoladas de quinze destilarias produtoras de cachaça do Sul de Minas Gerais, foi encontrada *Saccharomyces cerevisiae* como a levedura predominante, exceto em três destilarias, onde predominaram *Rhodotorula glutinis* e *Candida maltosa*. Em determinado alambique, após identificação de

739 leveduras, foi encontrada *Saccharomyces cerevisiae* como predominante e seis outras espécies de leveduras encontravam-se em sucessão: *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia heimii* e *Hanseniaspora uvarum* estiveram presentes no início; *Pichia subpelliculosa* e *Debaryomyces hansenii* no meio e final da fermentação e *Pichia methanolica* apareceu após o término da fermentação. Bactérias ácido-lácticas, bacilos, bactérias ácido-acéticas e enterobacteriaceae foram encontradas durante a fermentação, sendo que o grupo bacteriano mais encontrado foi o das bactérias ácido-lácticas.

2.4.1 Leveduras selecionadas

As leveduras são fungos unicelulares não filamentosos que se apresentam sob forma esférica ou oval. Podem se multiplicar por fissão binária ou brotamento. Elas são anaeróbias facultativas, metabolizando carboidratos e formando gás carbônico e água na presença de oxigênio. Já em sua ausência, elas fermentam os carboidratos a etanol e gás carbônico (Tortora, 2000).

O processo de fermentação natural ou espontâneo para a produção de cachaça é realizado por microrganismos presentes no caldo-de-cana e ou equipamentos. A presença de diferentes linhagens de leveduras e microrganismos contaminantes pode levar à variação na qualidade da bebida ao longo da safra e entre safras. Para tentar evitar este problema, têm-se isolado da fermentação de cachaça linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para serem utilizadas no preparo do fermento iniciador (Pataro et al., 2002).

As linhagens de leveduras devem apresentar habilidade fermentativa, propiciar bom rendimento, ser tolerantes a elevadas concentrações de etanol, produzir compostos organolepticamente desejáveis em concentrações adequadas, apresentar capacidade de floculação no término da fermentação e ser estáveis (Rose, 1977; Reed & Nagodawithana, 1991).

Efeitos inibitórios entre linhagens de leveduras e entre espécies têm sido relatados e são denominados fator *killer*. As leveduras que apresentam o fator *killer* excretam toxina de origem proteica ou glicoproteica (Reed & Nagodawithana, 1991).

Nurgel et al. (2002) encontraram que, para a produção de vinho, a utilização de levedura comercial e levedura selecionada da fermentação de vinho apresentou maior capacidade fermentativa que a fermentação espontânea. Estas leveduras produziram maior quantidade de etanol, maior crescimento celular e maior produção de compostos voláteis quando comparadas com a fermentação espontânea.

Mendonça (1999) relatou que das 387 leveduras isoladas de fermentação de caldo-de-cana, apenas 158 foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* pelo método tradicional de classificação bioquímica e fisiológica e posteriormente confirmadas por técnica molecular de PCR (polimerase chain reaction). As leveduras classificadas como *S. cerevisiae* foram avaliadas quanto à produção de CO₂ e etanol, e o isolado CA116 sobressaiu-se nas características fermentativas desejáveis, apresentando elevada produção de etanol e excelente capacidade de floculação.

Três cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliadas em relação à persistência e dominância no processo fermentativo e contribuição de compostos voláteis na cachaça. A levedura CA116 foi selecionada como a mais adequada para a produção de cachaça (Campos, 2003).

O uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de produção de cachaça tem aumentado a produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores (Pataro et al., 2002).

2.4.2 Bactérias lácticas

As bactérias são organismos unicelulares, simples e muitos pequenos, cujo material genético não está envolto por uma membrana nuclear. As células bacterianas podem apresentar-se sob vários formatos, podendo ainda formar agrupamentos (Tortora, 2000).

A espécie *Lactococcus lactis* apresenta-se como células esféricas ou ovóides de 0,5-1,2 x 0,5-1,5 μm , ocorrendo em pares e cadeias curtas em meio líquido. São cocos gram-positivos, não móveis, não formam endósporos e não possuem cápsulas. São anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, com metabolismo fermentativo. Fermentam grande número de carboidratos com a produção de principalmente, de L(+) ácido láctico, mas não produzem gás. Necessitam de requerimentos nutricionais complexos. São catalase negativo e oxidase negativo. A temperatura ótima de crescimento é 30°C. Conseguem crescer a 10°C, mas não a 45°C. São encontrados em indústrias de laticínios em geral, tanto nos produtos como nos equipamentos (Sneath et al., 1993).

As bactérias lácticas são os microrganismos mais freqüentemente encontrados e adaptados às condições das dornas de fermentação das destilarias de álcool. Ao isolar bactérias lácticas contaminantes de dornas de fermentação, Oliva Neto (1990) encontrou que *Lactobacillus fermentum* foi a bactéria predominante (62%), seguida de *Lactobacillus murinus* (9%), *Lactobacillus vacciostercus* (9%), *Lactobacillus plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%). Dentre os lactobacilos, houve o predomínio do tipo heterofermentativo obrigatório (85%). As cepas testadas apresentaram-se resistentes a 7% (v/v) de etanol e 64% resistiram a 10% de etanol, o que mostra adaptação ao ambiente alcoólico (Oliva-Neto, 1990).

Olsen et al. (1995), avaliando a atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas originadas de milho fermentado e sua interação durante a fermentação, encontraram que aproximadamente metade dos *L. plantarum* e

praticamente todos os *L. fermentum* e *L. breuteri* investigados mostraram inibir outras bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo a produção de ácido o principal fator antimicrobiano encontrado.

2.4.3 Interação levedura-bactéria

Na busca pela sobrevivência, crescimento e dominância, podem ocorrer interações entre diferentes linhagens e espécies de microrganismos (Fleet, 1999).

Na produção de cachaça artesanal há poucos relatos sobre a caracterização das populações bacterianas presentes nas dornas de fermentação e a relação destes microrganismos com a produção de compostos secundários, responsáveis pelo *flavor* da bebida (Pataro et al., 2002).

A fermentação láctica tardia tem sido utilizada por muitas destilarias de “whisky” devido à sua contribuição positiva para o *flavor* da bebida, mas detalhes precisos deste processo são desconhecidos. A formação de ácidos láctico e acético e de outros metabólitos pode ter efeito no *flavor* do destilado. O ácido láctico pode reagir com o etanol durante a destilação e produzir etil lactato (Van Beek & Priest, 2002).

Van Beek & Priest (2002) observaram que o desenvolvimento da comunidade de bactérias ácido lácticas na fermentação do “whisky” de malte ocorre em três fases. Inicialmente as bactérias são reprimidas pelo forte crescimento das leveduras (35 horas). A segunda fase (35-70 horas) compreende o período de crescimento exponencial dos lactobacilos, à custa da exaustão das células de leveduras. Já na fase final, ou estacionária, as bactérias não crescem, mas continuam acumulando ácido láctico.

A acidez elevada encontrada na cachaça pode estar relacionada com a presença do número elevado de bactérias no mosto durante a fermentação (Pataro et al., 2002).

base levedura

Alcarde et al. (2002) relatam que, em cultivo misto de leveduras e bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Lactobacillus*, a viabilidade celular das leveduras é reduzida com o aumento da acidez no meio após oito horas de cultivo.

Dankovtsev et al. (2002) avaliaram a fermentação da tradicional bebida russa “sourish shchi”, obtida por fermentação espontânea e adicionada de leveduras de pão, leveduras de cervejaria e adicionada de cultura mista de levedura e bactéria ácido-lática (*L. brevis* linhagem 11 e *S. cerevisiae* linhagem “M-Kvasnaya”). Os parâmetros organolépticos ótimos para esta bebida foram obtidos quando a cultura mista de leveduras e bactérias foi utilizada como inóculo.

Narendranath et al. (1997), avaliando a co-incubação de levedura (10^6 UFC/mL) com cinco diferentes *Lactobacillus* nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 em mosto de trigo, mostraram o crescimento das bactérias na ausência das leveduras permanecendo viável até o término do período fermentativo. Já quando as bactérias foram co-incubadas com leveduras, elas morriam próximo ao término da fermentação. A taxa de morte das bactérias é elevada com o aumento da concentração de ácido lático na presença de etanol. Provavelmente, o etanol torne-se mais tóxico com o abaixamento do pH, proporcionado pela presença de ácido lático no meio.

Rodarte et al. (2003) avaliaram a interação entre dois isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (CA1162 e CA1183) e *Lactococcus lactis*. Cada isolado de *S. cerevisiae* (10^8 UFC/mL) foi co-incubado com *L. lactis* (10^6 UFC/mL) e todos os microrganismos foram inoculados isoladamente (controle) na concentração de 10^8 UFC/mL (leveduras) e 10^6 UFC/mL (bactéria) em caldo de cana 16°B a 30°C. Durante o processo fermentativo, a população celular dos dois isolados de leveduras, isoladamente e co-incubados manteve-se constante, em torno de 10^8 UFC/mL. A bactéria láctica cultivada isoladamente apresentou

população de 10^8 UFC/mL; já em associação com CA1162, a população manteve-se constante em 10^6 UFC/mL. Quando *L. lactis* foi co-incubada com CA1183, ocorreu um decréscimo na população de 10^6 para 10^4 UFC/mL. Estes resultados sugerem que, dependendo do isolado de *S. cerevisiae* utilizado na co-incubação, pode haver uma inibição do crescimento ou morte celular de *L. lactis*.

Cherubin (2003), avaliando o comportamento das linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 e M-26 em cultura pura e mista com *L. fermentum* CCT1407, relatou que, devido ao maior crescimento apresentado pela linhagem PE-2 em relação a M-26, as linhagens de *S. cerevisiae* podem exercer interações diferenciadas com a bactéria.

Quando *L. plantarum*, na concentração de 10^7 UFC/mL, foi inoculada isoladamente, o consumo de açúcares redutores foi de apenas 1 g/100 mL, sendo os açúcares remanescentes algumas vezes convertidos pelas leveduras a etanol. Resultados similares em relação ao consumo de açúcares redutores foram encontrados em estudos com as bactérias *Lactobacillus* #3, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *L. fermentum* quando cultivadas isoladamente (Narendranath et al., 1997).

Quando dois microrganismos crescem juntos num mesmo meio pode haver competição por certos nutrientes. As bactérias metabolizam glicose anaerobicamente a ácido láctico para a obtenção de energia para crescimento e manutenção celular. Como cada grama de ácido láctico formado reduz a formação de 0,51 g de etanol, houve queda no rendimento alcoólico para o seu experimento de co-incubação em mosto de trigo. Para todos os isolados de bactérias avaliados, o aumento da produção de ácido láctico está relacionado com o decréscimo na concentração final de etanol e número de células viáveis de leveduras (Narendranath et al., 1997).

Os lactobacilos, quando presentes em elevadas concentrações, podem consumir rapidamente fatores de crescimento essenciais para o crescimento das leveduras. Como a taxa de crescimento de lactobacilos selecionados é superior à taxa de crescimento das leveduras e as bactérias ácido lácticas encontradas em bebidas removem os fatores de crescimento essenciais, isto pode resultar em reduções nas taxas de crescimento, atividade catalítica e redução no rendimento de etanol (Narendranath et al., 1997).

Cherubin (2003) constatou, em seus experimentos, que a linhagem Fleishmann de *S. cerevisiae* exerceu maior estímulo à multiplicação da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 que a linhagem PE-2, sendo esse estímulo inversamente proporcional à viabilidade celular apresentada pela levedura. Durante sucessivos ciclos fermentativos, a autólise das células de leveduras pôde fornecer aminoácidos ao mosto, que estimularam o desenvolvimento bacteriano. O autor também relatou relação entre pH e contaminação bacteriana, em que menores valores de pH estavam associados a maiores contaminações para a linhagem PE-2.

Cherubin (2003) constatou que a contaminação bacteriana presente no vinho estimulou a produção de glicerol por *S. cerevisiae*, independente da linhagem de levedura avaliada. O autor relata que o desvio de açúcar para a formação de glicerol pelas leveduras e para a formação de ácido láctico pelas bactérias, estaria envolvido com a redução do teor alcoólico e rendimento fermentativo dos tratamentos envolvendo a linhagem Fleischmann.

Oliva-Neto (1990) constatou, em cultivo misto de leveduras com *L. fermentum*, que acidez acima de 4,8 g/L expressa em ácido láctico, e a relação levedura/bactéria inferior a 0,9 afetaram severamente as características vitais e o crescimento da levedura.

Kaji (1989) avaliou o cultivo misto de duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com as bactérias isoladas de usinas, *Leuconostoc mesenteroides* e

Lactobacillus fermentum. O autor concluiu que ambas as bactérias afetaram o brotamento das cepas de *S. cerevisiae* e que, ao término da fermentação, o *Leuconostoc* não pôde ser detectado e o número de *Lactobacillus* manteve-se praticamente constante. A morte celular de *Leuconostoc* pode ser atribuída à baixa velocidade específica de crescimento e ao efeito adverso do etanol.

As contaminações bacterianas presentes em fermentações industriais são consideradas prejudiciais acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL; apresentam prejuízos econômicos significativos acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL e, acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificuldades de operação de centrífugas, floculação e aumento de consumo de ácido sulfúrico e de antibióticos (Cherubin, 2003).

2.5 Processo tradicional de produção de cachaça

Os três processos principais de fermentação alcoólica podem ser classificados em: descontínuo (batelada simples e batelada alimentada) e contínuo (Alves, 1996).

As fermentações descontínuas clássicas ou em bateladas vêm sendo utilizadas pelo homem desde a antiguidade e hoje, ainda são as mais utilizadas para a obtenção de vários produtos fermentados.

O sistema de batelada simples pode ser considerado como um sistema fechado. Durante a fermentação nada é adicionado ao sistema, exceto oxigênio na fase inicial para produção de biomassa, antiespumante e soluções para ajustes do pH. Neste processo, os microrganismos são adicionados num substrato e incubados em condições ótimas de fermentação. É neste sistema que pode-se observar uma curva típica de crescimento microbiano.

O processo de batelada simples é o mais utilizado por produtores de cachaça artesanal. Consiste na inoculação de uma dorna com o pé de cuba e quando não há mais formação de bolhas, transfere-se metade do conteúdo para

outra dorna vazia (corte da dorna). Após o corte, completa-se o volume das duas dornas com o caldo a ser fermentado (Mendonça, 1999). Outros produtores já colocam o inóculo e todo caldo a ser fermentado na dorna e, após 24 horas, o mosto é destilado e inicia-se um novo processo fermentativo (Gomes, 2002).

No sistema de batelada alimentada, o substrato é fornecido à dorna de fermentação de maneira intermitente ou contínua, de maneira que o teor de açúcares não ultrapasse um valor pré-fixado (Mendonça, 1999). Este sistema evita a repressão catabólica causada por elevadas concentrações de açúcares.

O sistema contínuo é considerado um sistema aberto, em que quantidades equivalentes de substrato e mosto fermentado entram e saem do tanque de fermentação (Walker, 1998).

A produção de cachaça inicia-se com a obtenção do caldo-de-cana pela trituração da cana nas moendas. Após a moagem, o caldo é filtrado e decantado para retirada das impurezas (Lima, 2001).

O processo tradicional de produção de cachaça é realizado em duas etapas distintas. A primeira é a propagação do microrganismo, que é feita sob intensa aeração e em caldo diluído com teores de açúcar próximo a 5°B, visto que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para crescimento eficiente. Na maioria dos alambiques, a propagação do inóculo é realizada de forma empírica (fermento caipira) ou com a inoculação de fermentos prensados utilizados na panificação. Os microrganismos responsáveis pela fermentação são oriundos dos substratos e também de equipamentos utilizados na moagem da cana-de-açúcar. Além dos microrganismos responsáveis pela fermentação podem haver outros microrganismos que interferem de maneira negativa no processo fermentativo e qualidade da cachaça. Para evitar oscilações na qualidade da bebida durante as safras, têm-se utilizado linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*

isoladas de fermentação de cachaça na preparação do inóculo inicial (Pataro et al., 2002).

A segunda etapa é a fermentação na qual o caldo adicionado deve apresentar teores de açúcar entre 14-16°B (Schwan & Castro, 2001; Pataro et al., 2002). Concentrações de açúcares acima de 16°B podem acarretar em fermentações mais lentas e frequentemente incompletas (Pataro et al., 2002).

Para que ocorra multiplicação vigorosa das células, manutenção da fisiologia celular e, conseqüentemente, aumento da produtividade é necessário que as exigências nutricionais das leveduras sejam supridas (Schwan & Castro, 2001; Lima, 2001). Algumas substâncias requeridas pelas leveduras e que são encontradas em quantidades insuficientes no caldo-de-cana são as vitaminas e ácidos graxos. No preparo do fermento em Minas Gerais é comum o enriquecimento do caldo com fubá de milho, farelo de arroz e, algumas vezes, farelo de soja, de acordo com receitas de cada produtor e região (Pataro et al., 1998).

O volume inicial de inóculo utilizado deve ser aproximadamente 20% do volume da dorna de fermentação (Schwan et al., 2001). A duração de um processo fermentativo pode variar de 20-36 horas, mas, em média, é de 24 horas (Gomes, 2002; Pataro et al., 2002). O acompanhamento da fermentação é realizado observando-se a queda do °Brix (Gomes, 2002). O decréscimo do °B no mosto é a medida de conversão de glicose em álcool. Os sólidos dissolvidos contribuem para a gravidade específica, sendo que a gravidade decresce quando o açúcar é convertido em álcool e CO₂ (Narendranath et al., 1997).

Após o processo de fermentação, o vinho é encaminhado ao alambique para a obtenção da bebida destilada (Lima et al., 2001). Uma nova fermentação pode ser iniciada utilizando-se o fermento que permaneceu na dorna (Gomes, 2002).

O vinho é constituído por aproximadamente 88%-93% água, 5% a 8% etanol e pequenas quantidades de álcoois amílico, isoamílico, propílico, butílico, isobutílico, aldeídos, ácidos, furfural, ésteres e ácidos orgânicos que são substâncias importantes na qualidade dos destilados (Lima et al., 2001; Sales, 2001).

No processo de destilação pode-se separar, total ou parcialmente, substâncias de diferentes volatilidades (Sales, 2001). Durante este processo deve-se separar o destilado em frações para melhorar a qualidade da bebida. Esta separação é denominada de corte. A primeira fração denominada de “destilado de cabeça” é a que apresenta maiores concentrações de metanol. A segunda fração é o “coração” e corresponde à cachaça. O corte do coração é realizado quando a cachaça atinge, aproximadamente, 45% de teor alcoólico. A terceira fração “cauda ou água fraca” apresenta maiores teores de produtos não voláteis. O resíduo que fica na panela do alambique é denominado de vinhoto ou vinhaça (Sales, 2001). A Figura 1 apresenta um fluxograma do processo de produção de cachaça.

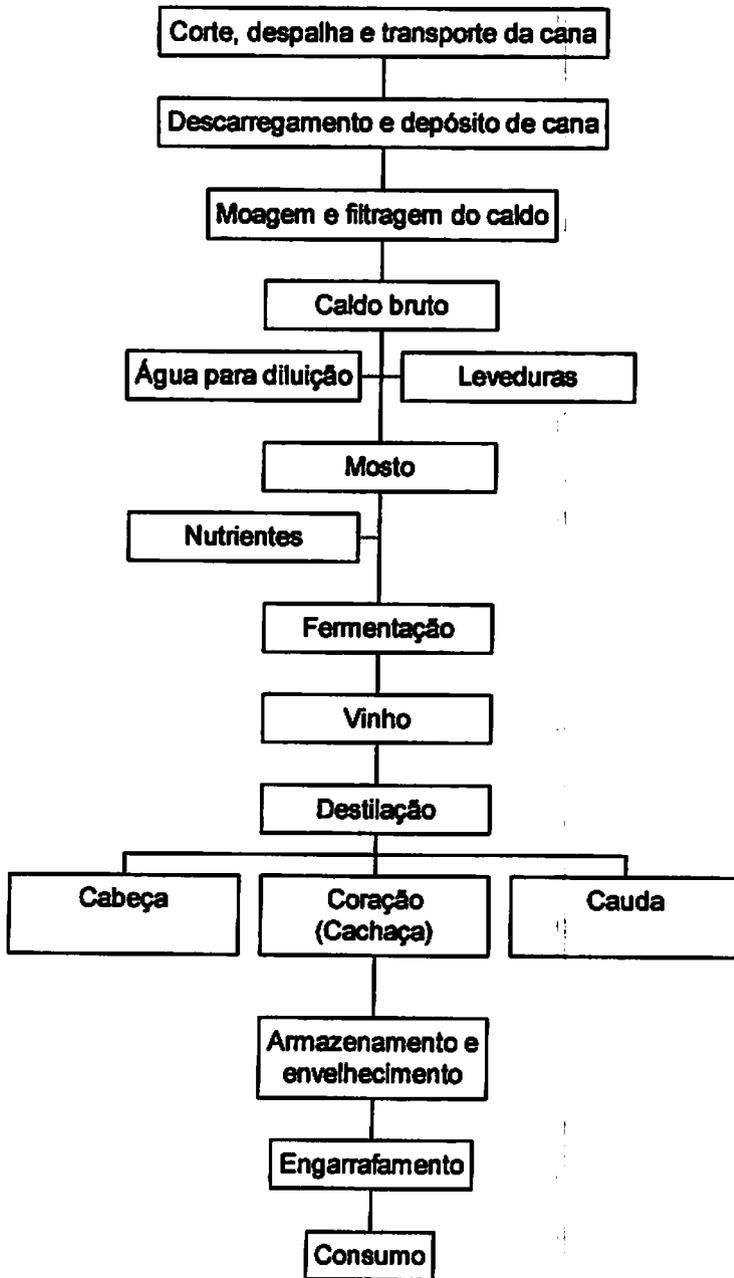


FIGURA 1 Fluxograma do processo produtivo de cachaça. Fonte: modificado a partir de Sales (2001).

2.6 Fases da curva de crescimento

O crescimento é a última expressão da fisiologia de um organismo, em que todas as suas estruturas estão trabalhando de maneira coordenada. O crescimento microbiano envolve aumento na quantidade de protoplasma, formação de novas estruturas e formação de novas células. A divisão celular é um requerimento obrigatório para o crescimento dos microrganismos (Caldwell, 1995).

Uma curva de crescimento demonstra o crescimento das células durante um período de tempo (Tortora, 2000). A curva de crescimento típica do sistema descontínuo ocorre em quatro fases distintas: fase de latência, fase logarítmica, fase estacionária e fase de morte (Crueger & Crueger, 1993).

A fase de latência ou fase lag é definida como um período de adaptação às novas características físicas e químicas do ambiente, por meio da síntese de ribossomos e novas enzimas para que se estabeleça uma elevada taxa de crescimento. Em geral, a fase lag é curta quando o microrganismo precisa de poucos ajustes e longa quando muitos ajustes são requeridos para o microrganismo crescer. A duração da fase lag não é dependente unicamente das condições de crescimento, mas também da densidade do inóculo. Nesta fase, a taxa de crescimento específica (μ) é igual a zero (Walker, 1998; Caldwell, 1995).

A fase de crescimento acelerado é estabelecida como o curto período de tempo que antecede a fase de crescimento logarítmico. A ocorrência desta fase se deve ao fato de que nem todas as células conseguem chegar ao final da fase lag ao mesmo tempo. O valor da taxa de crescimento específico (μ) varia entre $\mu=0$ (fase lag) e μ_{\max} (fase log) (Walker, 1998; Caldwell, 1995).

A fase logarítmica (fase log) ou exponencial representa o período em que a célula duplica de maneira logarítmica, constante e apresenta uma taxa de crescimento específico máximo (μ_{\max}). Quando os componentes do meio e os

fatores ambientais ou físicos estiverem adequados, o crescimento dos microrganismos é limitado apenas pelo seu potencial genético. Os sistemas metabólicos são operados na máxima taxa e eficiência. Devido à intensa capacidade metabólica, as células da fase logarítmica são normalmente mais sensíveis a mudanças fisiológicas que as células de outras fases de crescimento.

No cultivo em batelada, pode ocorrer ocasionalmente uma segunda fase exponencial de crescimento, denominado diauxia. Isto ocorre quando os microrganismos possuem duas fontes de carbono diferentes que são utilizadas seqüencialmente (Walker, 1998; Caldwell, 1995).

A fase log é relativamente curta devido à exaustão de nutrientes, acúmulo de metabólitos inibitórios ou floculação excessiva das células. O retardamento do crescimento da fase log é denominado de fase de desaceleração do crescimento e pode ser observado pela diminuição do valor de μ_{max} . Esta fase antecede a fase de crescimento igual a zero (fase estacionária). A entrada das leveduras na fase estacionária pode ser influenciada por metabólitos tóxicos, baixo pH, elevado CO_2 , O_2 variável e elevadas temperaturas. Após a fase estacionária, as células podem entrar na fase de morte acelerada até atingir a fase de morte logarítmica (Walker, 1998; Caldwell, 1995).

A massa de células produzidas por unidade de nutriente limitante é uma constante determinada de rendimento de crescimento (Y) e pode ser calculada pela equação abaixo:

$$Y = \frac{X - X_0}{[S]}$$

em que X é o peso seco, por mililitro da cultura, no início do crescimento estacionário; X_0 é a massa de células inicial imediatamente após a inoculação e $[S]$ é a concentração do substrato limitante.

Todas as fases são importantes para o processo biotecnológico. Um processo fermentativo ideal deve minimizar o período da fase lag e maximizar a taxa e o período da fase exponencial (Lee, 1996).

2.7 Compostos voláteis em bebidas alcoólicas

As características organolépticas desejáveis em bebidas alcoólicas e destilados são atribuídas, em pequena parte, ao conteúdo de etanol nas bebidas. O *flavor* característico de cada bebida é atribuído à presença de baixas concentrações de compostos orgânicos secundários, como álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos sulfurados (Rose, 1977; Reed & Nagodawithana, 1991).

Os compostos organolepticamente importantes para o "*flavor*" das bebidas podem derivar da matéria-prima utilizada para a fabricação das bebidas e permanecer inalterados durante a fermentação e destilação ou podem sofrer transformações químicas nestes processos. Durante a fermentação, as leveduras produzem uma série de compostos que também influenciam na qualidade da bebida. Outros compostos podem ser formados no processo de maturação por meio de reações da bebida com a madeira (Rose, 1977; Reed & Nagodawithana, 1991).

A Figura 2 apresenta um esquema de formação dos principais compostos formados em processos fermentativos.

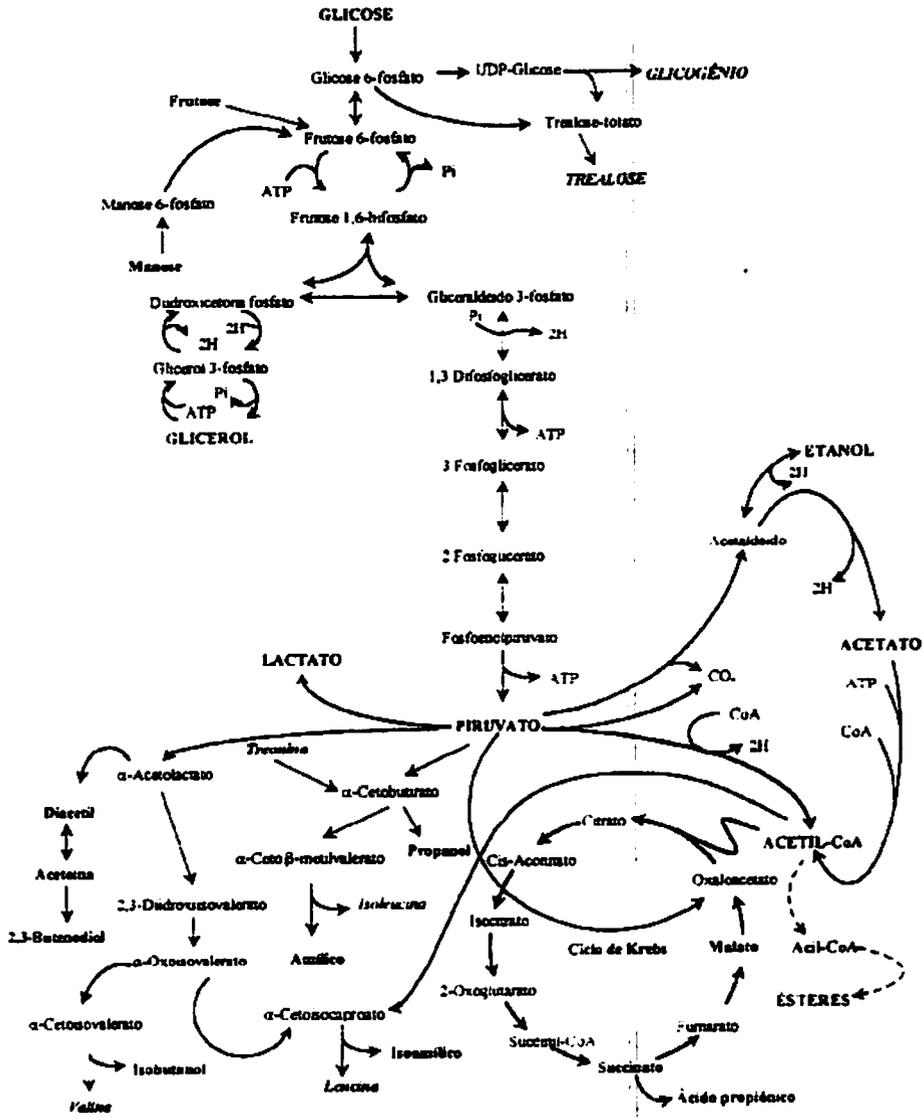


FIGURA 2 Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos.

A aguardente de cana tem seus padrões de identidade e qualidade definidos pelo decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997, que especifica que a soma dos componentes voláteis (aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e álcoois superiores) não pode ser inferior a 200 mg/100 mL de álcool anidro. Estes componentes deverão obedecer aos limites especificados na Tabela 1:

O teor alcoólico para a aguardente deve ser de 38% – 54% v/v (Brasil, 1997) e, para a cachaça, de 38% – 48 % (Brasil, 2003), à temperatura de 20°C.

O etanol é o maior constituinte volátil das bebidas; apresenta um leve sabor doce e abranda o sabor ácido (Oliveira, 2001). É o principal produto do metabolismo das leveduras e pode ser inibitório em concentrações elevadas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode tolerar uma concentração de álcool até 10%-12% (v/v) (Carlile et al., 2001).

O grupo dos compostos dos álcoois superiores é o mais importante encontrado em bebidas e destilados. Estes compostos são responsáveis pelo *flavor* das bebidas e são usualmente encontrados em elevadas concentrações (mg/mL) (Rose, 1977). Os álcoois 1-propanol, isobutanol, amílico, isoamílico e 1-hexanol foram identificados em cachaça, tendo o álcool isoamílico sido encontrado em maiores concentrações para as três cepas de leveduras avaliadas (Campos, 2003).

TABELA 1 Teores máximos permitidos pela legislação 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

As condições aeróbicas, temperaturas elevadas, concentração de aminoácidos elevada e pH baixo (3,0 - 4,0) podem aumentar a concentração de álcoois superiores (Cardoso, 2001; Reed & Nagodawithana, 1991). As cepas de leveduras também podem influenciar no teor de álcoois superiores (Ough, 1996).

A acidez da cachaça depende de vários fatores no processo fermentativo, como: estirpe da levedura, pureza do pé-de-cuba, tempo e temperatura de fermentação e manejo do mosto (Cardoso, 2001). Na acidez volátil das bebidas alcoólicas, além do ácido acético e láctico que são subprodutos normais da fermentação alcoólica, encontram-se também os ácidos fórmico, butírico, propiônico e outros em pequena quantidade (Oliveira, 2001).

A quantidade de ácido pirúvico, cetoglutárico, cítrico e láctico, formados pelas leveduras, é desprezível. O ácido láctico pode ser encontrado em elevadas concentrações no vinho quando há presença de bactérias fermentativas (Reed & Nagodawithana, 1991).

As bactérias acéticas contaminantes da cana ou do mosto podem gerar acidez elevada na bebida devido à produção de ácido acético (Cardoso, 2001).

A maioria dos ésteres volátil se forma durante a fermentação (Ough, 1996). O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila, que proporciona um aroma agradável de fruta na bebida (Oliveira, 2001).

Os aldeídos são compostos importantes no desenvolvimento de sabores. O acetaldeído é um subproduto normal da fermentação alcoólica, que apresenta um odor pronunciado, sendo o aldeído presente em maiores quantidades em bebidas alcoólicas (Oliveira, 2001). O furfural pode estar presente no caldo de cana quando a cana é queimada antes da colheita (Cardoso, 2001).

Os compostos secundários mais estudados na fermentação alcoólica destinada à produção de bebidas destiladas são acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, propanol, isobutanol e álcool isoamílico (Oliveira, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* (CA116) e *Lactococcus lactis*

3.1.1 Microrganismos e reativação do inóculo

Os microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis*, utilizados neste experimento, foram isolados de uma destilaria de produção artesanal de cachaça do município de Lavras, MG e identificados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (Mendonça, 1999; Schwan, comunicação pessoal).

A levedura e bactéria foram mantidas sob congelamento em glicerol a 20% e reativados em meio YEPG (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 10,0; glicose, 20,0) a 28°C e 35°C, respectivamente, por 24 horas. A pureza destes microrganismos foi verificada pelas características morfológicas e microscópicas de colônias isoladas obtidas por estrias compostas em meio YW para leveduras (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona bacteriológica, 5,0; glicose, 10,0 e ágar, 15,0) e TSA (em g.L⁻¹: peptona de caseína, 15,0; peptona de soja, 5,0; cloreto de sódio, 5,0 e ágar-ágar, 15,0) para bactérias.

3.1.2 Preparo do inóculo e adaptação dos microrganismos

A multiplicação de *S. cerevisiae* e *L. lactis* iniciou-se com a inoculação das colônias isoladas em 150 mL de meio YEPG (cultura estoque). Os frascos de vidro foram incubados em estufa a 28°C e 35°C, respectivamente, sob agitação de 30 rpm por 24 horas.

Para padronização do número de células e adaptação aos meios de cultivo avaliados neste experimento, alíquotas de 1000 μ L da cultura estoque de cada microrganismo foram semeadas em 150 mL de YEPG e caldo cana 5°B adicionado de 1% de extrato de levedura. Os frascos de vidro foram incubados em estufa a 28°C e 35°C, respectivamente, com 30 rpm de agitação pelo período de 24 horas.

3.1.3 Cana-de-açúcar e preparo do mosto

A cana-de-açúcar utilizada neste experimento foi da variedade RB 835054 e fornecida pelo Sítio Manganges, situado na cidade de Lavras, MG. A cana foi moída no mesmo dia de seu corte. Após a moagem a cana foi filtrada para a retirada das impurezas presentes no caldo.

O caldo de cana foi conduzido ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, onde foi novamente filtrado em peneiras. O caldo foi diluído em água destilada, atingindo 5°B e acrescido de 1% de extrato de levedura e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

3.1.4 Inoculação

Para a inoculação da linhagem de *S. cerevisiae* e *L. lactis* nos tratamentos YEPG e caldo de cana 5°B + 1% de extrato de levedura, ambos esterilizados a 121°C por 15 minutos, utilizaram-se alíquotas de 1000 μ L dos inóculos anteriormente adaptados. O experimento foi realizado em triplicata em frascos de vidro de 250 mL e incubados a 28°C (levedura) e 35°C (bactéria) com 30 rpm de agitação por 28 horas.

3.1.5 Análises realizadas

Durante o período de incubação foram realizadas coletas em intervalos de 7 horas para avaliação do teor de sólidos solúveis totais (SST), pH, crescimento e teor de açúcares redutores.

3.1.5.1 Análise microbiológica

A multiplicação da levedura e bactéria foi acompanhada utilizando-se a técnica de plaqueamento por microgota utilizando-se os meios de cultivo YW e TSA, respectivamente (Romeiro, 2001). As placas de YW e TSA foram incubadas a 28°C e 35°C, por 24 horas.

3.1.5.2 Análises químicas

O teor de sólidos solúveis totais e o pH foram determinados por leitura direta em refratômetro e pHmetro digitais.

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

Foram realizadas análises físico-químicas do caldo de cana natural e autoclavado no Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. As análises realizadas foram: umidade, matéria seca, proteína, resíduo mineral fixo (cinzas), sólidos solúveis, pH, acidez titulável, açúcares redutores (glicose), açúcares não redutores (sacarose), açúcares totais, cálcio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, nitrogênio, cobre, ferro, zinco e sódio (AOAC, 1965; AOAC, 1990; Yemn & Willis, 1954; Miller, 1959; Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.1.5.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SISVAR 4,3 (Sistema de Análise Estatística) (Ferreira, 1999) por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação do crescimento dos microrganismos *S. cerevisiae* e *L. lactis* nos diferentes meios de cultivo analisados.

3.2 Seleção da fonte ideal de crescimento para *Lactococcus lactis*

3.2.1 Inoculação

Para a realização da seleção da fonte ideal de crescimento para *L. lactis* inocularam-se alíquotas de 1000 μ L da cultura estoque obtida na etapa 3.1.2 nos seguintes tratamentos: MMM (meio mínimo mineral em $g.L^{-1}$: $NaNO_3$, 6,0; KCl , 0,52; $MgSO_4.7H_2O$, 0,52; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,01; K_2HPO_4 , 0,75 e glicose, 10) adicionado de 2% glicose; MMM adicionado de 2% frutose; MMM adicionado de 1% sacarose; MMM adicionado de 0,1% extrato levedura; MMM adicionado de 1% extrato levedura; caldo de cana 2°B e caldo de cana 5°B.

O experimento foi realizado em duplicata em Erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio e incubados sob 30 rpm de agitação a 35°C por 24 horas. Apenas os tratamentos contendo extrato de levedura ficaram incubados por 48 horas.

3.2.2 Análises realizadas

Foram coletadas amostras para plaqueamento em intervalos de 24 horas para avaliação do crescimento.

3.2.2.1 Análise microbiológica

O crescimento celular da bactéria foi obtido por meio da técnica de plaqueamento por microgota (Romeiro, 2001) das diluições seriadas em meio de cultivo TSA. As placas foram incubadas a 35°C por um período de 24 horas.

3.3 Avaliação do crescimento e do teor de açúcares de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* em caldo de cana 5°B

3.3.1 Adaptação

Alíquotas de 1000 µL de cultura estoque da linhagem de *S. cerevisiae* (CA116) em meio YEPG (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 10,0; glicose, 20,0) foi previamente adaptada em meio caldo de cana 5°B com 1% de extrato de levedura. Para *L. lactis*, a adaptação ocorreu em meio caldo de cana 5°B acrescido de 0,1% de extrato de levedura. A incubação da levedura e da bactéria foi realizada sob agitação a 28°C e 35°C, respectivamente, por um período de 24 horas. O meio caldo de cana utilizado neste experimento foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

3.3.2 Inoculação

Decorrido o tempo de adaptação, os microrganismos foram inoculados em caldo de cana 5°B acrescidos de 1% e 0,1% de extrato de levedura para a linhagem de *S. cerevisiae* e *L. lactis*, respectivamente. Os frascos de vidro em triplicata foram incubados sob agitação, a 28°C para levedura e a 35°C, para bactéria por um período de 48 horas.

3.3.3 Análises realizadas

Foram coletadas amostras para plaqueamento, determinação de sólidos solúveis totais em intervalos de 3 horas durante as primeiras 15 horas. Após este período, as coletas foram realizadas em intervalos de 7 horas até 29 horas de incubação. A última coleta foi realizada após 48 horas de incubação. As amostras para determinação de pH e açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) foram coletadas após 0, 6, 12 e 22 horas de incubação (Miller, 1959).

3.3.3.1 Análise microbiológica

O crescimento celular da bactéria (0 a 48 horas) e da levedura (0 a 15 horas) foi obtido por meio da técnica de plaqueamento por microgota das diluições seriadas em meio de cultivo TSA e YW, respectivamente (Romeiro, 2001). A partir de 15 horas, o plaqueamento das leveduras foi realizado pela técnica de espalhamento. As placas de YW e TSA foram incubadas a 28°C e 35°C, por um período de 24 horas.

3.3.3.2 Análise química

O teor de sólidos solúveis totais e o pH foram determinados por leitura direta em refratômetro e pHmetro digitais.

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

3.4 Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação da cachaça artesanal

3.4.1 Cana-de-açúcar e preparo do mosto

Para a etapa de produção de inóculo, o caldo de cana foi diluído com água destilada a 5°B acrescido de 0,1% e 1% de extrato de levedura e

autoclavado a 121°C por 15 minutos. Na fase de adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo foi utilizado caldo de cana diluído à concentração de 7 e 10°Brix. Na fase de fermentação em frascos, o caldo foi diluído a 15°B e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Na etapa de fermentação em dornas, o caldo foi fervido puro e, posteriormente, diluído a 14°B com água destilada esterilizada.

3.4.2 Preparo do inóculo e adaptação

Aliquotas de 1000 µL de cultura estoque da linhagem de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* em meio YEPG (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 10,0; glicose, 20,0) foram inoculadas em caldo cana 5°B acrescido de 1% e 0,1% extrato de levedura, respectivamente. Para a obtenção de inóculo para a fermentação em frascos realizaram-se diversas alimentações do frasco contendo a levedura até a obtenção de 600 mL de inóculo com concentração de 10⁹ UFC/mL. No experimento de fermentação em dornas, foi necessário fornecer caldo de cana até a obtenção de 2.500 mL de inóculo de levedura com concentração de 10¹⁰ UFC/mL e 200 mL de inóculo de bactéria com concentração de 10⁶ UFC/mL. O caldo de cana fornecido para a alimentação dos microrganismos foi diluído a 5°B e acrescido de extrato de levedura. O número de células a ser produzido para os dois experimentos foi definido de maneira a se obter a concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL de levedura e 10⁴ UFC/mL de bactéria no meio a ser fermentado.

Após a obtenção do número de células desejado, os inóculos de CA116 e *L. lactis* foram colocados em caldo de cana 7°B e incubados a 30°C, por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado com caldo de cana a 10°B. O meio de caldo de cana utilizado foi autoclavado a 121°C, por 15 minutos.

3.4.3 Inoculação

3.4.3.1 Fermentação em frascos

Decorrida a produção do inóculo e adaptação, inocularam-se isoladamente 100 mL do inóculo de CA116 e 2 mL de *L. lactis* em frascos Erlenmeyers contendo 1.600 mL e 1.700 mL de caldo de cana a 15°B, respectivamente. No frasco a ser realizado o cultivo misto, inocularam-se 100 mL de CA116 e 2 mL de *L. lactis*. Os frascos em triplicata foram incubados a 30°C por 26 horas.

3.4.3.2 Fermentação em dornas

3.4.3.2.1 Fermentação com *S. cerevisiae* (CA116)

Após a produção do inóculo e adaptação, inocularam-se 2,5 L do inóculo de CA116 em cada dorna (capacidade de 30 litros) para a realização do processo fermentativo somente com levedura. Foram utilizados 15 L de caldo de cana para cada dorna, tendo 5 L sido referentes ao pé de cuba.

3.4.3.2.2 Co-incubação de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis*

Na co-incubação, inocularam-se 2,5 L de inóculo de CA116 e 100 mL de *L. lactis* em cada dorna (capacidade de 30 litros). Foi utilizado 19 L de caldo de cana para cada dorna, tendo 5 L sido referentes ao pé de cuba.

3.4.4 Processo fermentativo

3.4.4.1 Fermentação em frascos

Os Erlenmeyers contendo caldo de cana a 15°B e microrganismos *S. cerevisiae* e *L. lactis*, isoladamente e co-incubados, foram mantidos a 30°C.

3.4.4.2 Fermentação em dornas

A dorna foi abastecida lentamente com caldo de cana a 14°B, de maneira que o °Brix no interior da dorna permanecesse entre 5-7°B. O monitoramento do °Brix foi realizado pela leitura direta em refratômetro digital. O período de alimentação das dornas foi de, aproximadamente, 8 a 10 horas. Foram adicionados, em cada dorna, 125 g de fubá e 125 g de farelo de arroz (esterilizado a 121°C por 30 minutos) como fonte de nutrientes para as leveduras. Após o °Brix zerar e as leveduras decantarem, o mosto fermentado (vinho) foi encaminhado ao alambique. Este processo ocorreu aproximadamente 24 horas após o início da alimentação. A temperatura no interior da dorna foi mantida entre 30-32°C. Durante todo o processo fermentativo, as dornas foram mantidas cobertas com telas para evitar a entrada de insetos. Foram realizadas 4 bateladas em 2 dornas para cada tratamento (levedura isolada e co-incubada com *L. lactis*).

3.4.5 Destilação

Após o °Brix zerar e as leveduras decantarem, o vinho foi encaminhado ao alambique para a realização do processo de destilação. A primeira fração de cachaça, denominada de “cabeça”, foi constituída de 20% do volume total do destilado e descartado (Campos, 2003). A segunda fração da destilação, denominada de coração, foi recolhida em recipiente e o corte só foi realizado quando a cachaça atingiu 45% de teor alcoólico. A última porção que saiu após o corte, denominada de cauda, possui baixo teor alcoólico. Durante todo o processo de destilação, o teor alcoólico da cachaça foi monitorado com alcoômetro de Gay-Lussac.

3.4.6 Análises realizadas

Foram coletadas amostras durante o processo fermentativo para plaqueamento, sólidos solúveis totais, pH e açúcares redutores. No experimento de fermentação em frascos, amostras foram coletadas em intervalos de 3 horas durante as primeiras 12 horas de incubação. Após este período, as coletas foram realizadas em intervalos de 7 horas, até 26 horas de incubação. No processo fermentativo nas dornas, coletaram-se amostras ao ocorrer o enchimento da dorna e após o envio do vinho para o alambique.

Após o processo de destilação, coletaram-se 700 mL das frações coração, cabeça e cauda de todas as bateladas para análise físico-química. A análise cromatográfica foi realizada com as frações da 4ª batelada da fermentação com *S. cerevisiae* (CA116) isoladamente e da 1ª e 4ª bateladas da co-incubação.

3.4.6.1 Análises microbiológicas

O crescimento celular das leveduras e bactérias, nas fermentações em frascos, foi obtido pelo plaqueamento das diluições seriadas pela técnica de espalhamento em meios de cultivo YW (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona bacteriológica, 5,0; glicose, 10,0; agar, 15) e TSA (em g.L⁻¹: peptona de caseína, 15,0; peptona de soja, 5,0; cloreto de sódio, 5,0; ágar-ágar, 15,0), respectivamente. No processo fermentativo realizado em dornas, o crescimento celular das leveduras foi determinado pela técnica de plaqueamento por espalhamento e o da bactéria pelo método da microgota (Romeiro, 2001), em meio de cultivo YW (leveduras) e TSA (bactérias). No plaqueamento das alíquotas retiradas dos frascos e dornas da co-incubação foram utilizados YW e TSA, acrescidos de ampicilina (100 µg/mL de meio) e nistatina (4 mL de suspensão oral 100.000 UI por litro de meio),

respectivamente. As placas de YW e TSA foram incubadas a 28°C e 35°C, por 24 horas.

3.4.6.2 Análises químicas

O teor de sólidos solúveis totais e o pH do vinho foram determinados por leitura direta em refratômetro e pHmetro digitais. A concentração de açúcares redutores do vinho foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

A análise físico-química e cromatográfica das frações cabeça, coração e cauda foram realizadas no Laboratório de Análise de Bebidas do Departamento de Química da UFLA. Na análise físico-química, foram avaliados os teores de acidez volátil em ácido acético, ésteres em acetato de etila, aldeídos em aldeído acético, furfural, álcoois superiores, metanol e cobre (Brasil, 1997).

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo gasoso (CG) para a avaliação quantitativa de álcoois superiores e qualitativa de metanol nas amostras das bebidas. O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de chama ionizada. As amostras de 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, 30 m, 0,25 mm de diâmetro, fase estacionária polietileno glicol) operando em gradiente de temperatura (60°C por 2,5 minutos; elevação de 2,0°C. min⁻¹ até chegar a 80°C e permanecendo a 80°C por 2 minutos). O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com fluxo de 1,6123 mL/min, a pressão foi de 17,0 psi e o split foi de 1:30. A concentração dos álcoois superiores nas amostras de cachaça foi determinada pela curva padrão.

3.4.6.3 Análise sensorial

A análise sensorial da cachaça proveniente da destilação do vinho das dornas foi realizada com 37 provadores não treinados, porém, apreciadores da bebida. Foram fornecidas a cada provador três amostras da bebida, codificadas como 1, 2 e 3, para cachaça proveniente de fermentação com CA116, de co-incubação (1ª batelada) e co-incubação (4ª batelada), respectivamente. A avaliação da cachaça foi realizada em 10 mL de cada bebida, sendo que, entre as amostras, foi solicitado ao provador que degustasse um biscoito salgado e tomasse água para não haver interferência na avaliação seguinte.

Para cada uma das amostras, os provadores preencheram duas fichas de avaliação na forma de escala hedônica de nove pontos (Moraes, 1993). A primeira ficha de avaliação foi referente às características separadamente (aparência, aroma e sabor). A segunda ficha foi em relação à aceitação global da bebida.

3.4.6.4 Análise estatística

As análises estatísticas para comparação das cachaças produzidas foram realizadas com base no teste de Chernoff (não paramétrico) e o teste de escala hedônica, utilizando-se os softwares Statistica (Stasoft Inc, 1995) e SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* (CA116) e *Lactococcus lactis*

A análise físico-química do caldo de cana natural e autoclavado foi realizada para verificar se o tratamento térmico influenciou na composição do caldo. Foi constatado que a autoclavagem praticamente não alterou a composição do caldo de cana (Tabela 2).

TABELA 2 Análise físico-química do caldo de cana natural e autoclavado

Análises realizadas	Caldo de cana natural	Caldo de cana Autoclavado
Umidade	79,85%	80,45%
Matéria seca	20,15%	19,55%
Proteína	0,44%	0,46%
Resíduo mineral fixo (cinzas)	0,49%	0,55%
Sólidos solúveis	25,00%	23,50%
PH	5,72	5,60
Açúcares redutores (glicose)	1,79%	1,75%
Açúcares não redutores (sacarose)	19,05%	19,40%
Açúcares totais	21,84%	22,18%
Cálcio	0,06%	0,07%
Fósforo	0,0%	0,03%
Potássio	0,04%	0,05%
Magnésio	0,01%	0,01%
Enxofre	0,10%	0,12%
Nitrogênio	0,07%	0,08%
Cobre	0,30 mg/100 g	0,33 mg/100 g
Ferro	0,19 mg/100 g	0,22 mg/100 g
Zinco	2,54 mg/100 g	2,61 mg/100 g
Sódio	6,22 mg/100 g	6,27 mg/100 g

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) inicialmente foi próximo de 6,0 para o meio com caldo de cana acrescido de extrato de levedura e 4,0 para o meio YEPG. Após 28 horas de incubação com as leveduras, o °Brix decresceu até 2,0 – 2,5, para os dois meios testados. Com o crescimento bacteriano não foi observado decréscimo no valor do °Brix inicial para ambos os meios avaliados (Figura 3).

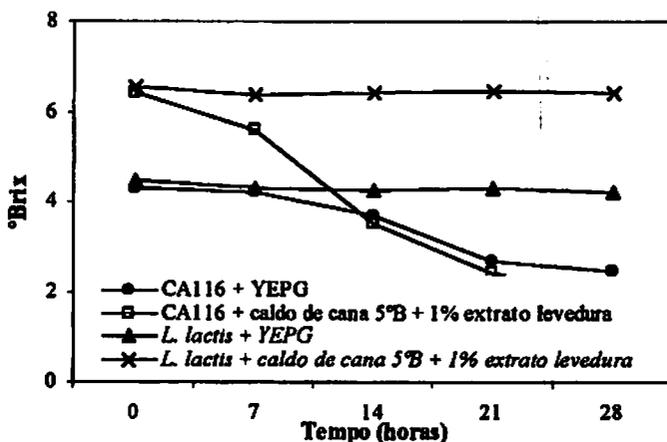


FIGURA 3 Concentração de sólidos solúveis totais em dois meios de cultivo inoculados com a linhagem de *S. cerevisiae* CA116 e *L. lactis*.

O teor de açúcares redutores foi inicialmente mais elevado no meio YEPG, visto que o caldo de cana é composto por elevadas concentrações de açúcares não redutores, como a sacarose (Figura 4).

De modo geral, as leveduras não são capazes de assimilar sacarose. Após a inoculação da linhagem de *S. cerevisiae* e produção da enzima invertase, a sacarose presente no caldo de cana foi degradada em glicose e frutose, ocorrendo um pico de 41,92 g/L, após 7 horas de incubação. Durante 28 horas de incubação, o consumo de açúcares redutores (tempo inicial – tempo final) pelas leveduras foi de 22,15 e 40,69 g/L e, para as bactérias, foi de apenas 1,10 g/L e 1,62 g/L para os meios YEPG e caldo cana 5°B + 1% extrato de levedura, respectivamente.

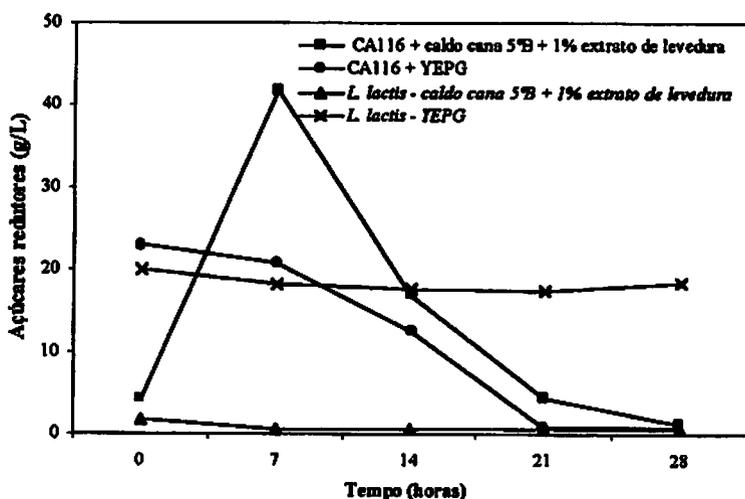


FIGURA 4 Concentração de açúcares redutores em dois meios de cultivo inoculados com *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis*

A Figura 5 mostra que o valor de pH dos meios inoculados com bactérias apresentou variação maior nas primeiras 7 horas, e, após este período, a variação foi mínima. O pH decresceu 1,87 e 1,70 em 28 horas de incubação para os meios YEPG e caldo de cana acrescido de extrato de levedura, respectivamente. Já as leveduras apresentaram pequena variação no pH em 28 horas de incubação, tendo o pico de variação ocorrido em 14 horas de incubação para ambos os meios avaliados. O pH decresceu de 0,93 e 1,27, em 28 horas de incubação, para os meios YEPG e caldo de cana acrescido de extrato de levedura, respectivamente.

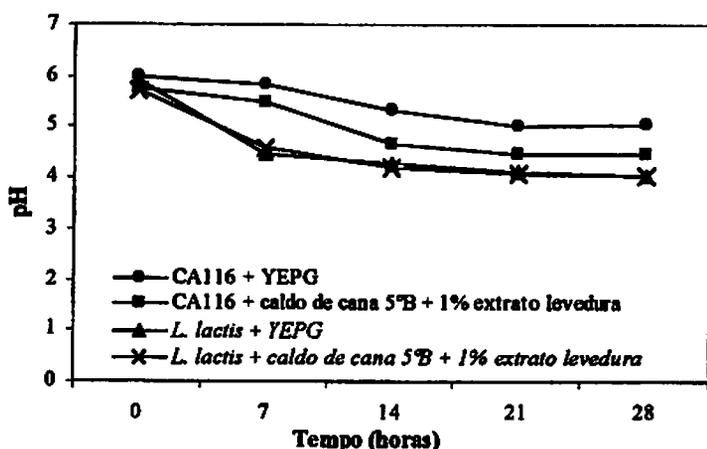


FIGURA 5 Avaliação do pH durante o crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* em dois meios de cultivo

A linhagem *S. cerevisiae* CA116 apresentou um crescimento de $3,7 \times 10^{10}$ UFC/mL no meio YEPG e $7,75 \times 10^{10}$ UFC/mL para o meio caldo cana 5°B acrescido de 1% de extrato de levedura, em 28 horas de incubação (Figura 6). Os fatores de conversão de açúcares redutores em biomassa ($Y_{X/S}$) foram de $1,66 \times 10^9$ UFC/mg AR para o meio YEPG e de $1,90 \times 10^9$ UFC/mg AR para o caldo de cana enriquecido com 1% de extrato de levedura.

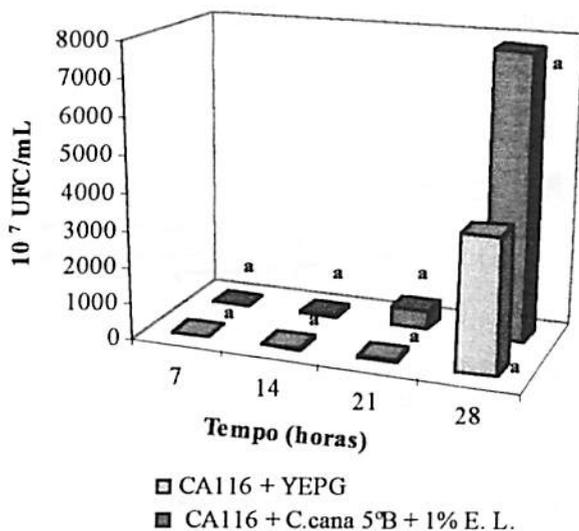


FIGURA 6 Avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) em dois meios de cultivo

A Figura 7 mostra que a bactéria *L. lactis* apresentou crescimento de $2,25 \times 10^{11}$ UFC/mL no meio YEPG e $6,67 \times 10^{11}$ UFC/mL no meio caldo cana 5°B acrescido de 1% de extrato de levedura, em 21 horas de incubação.

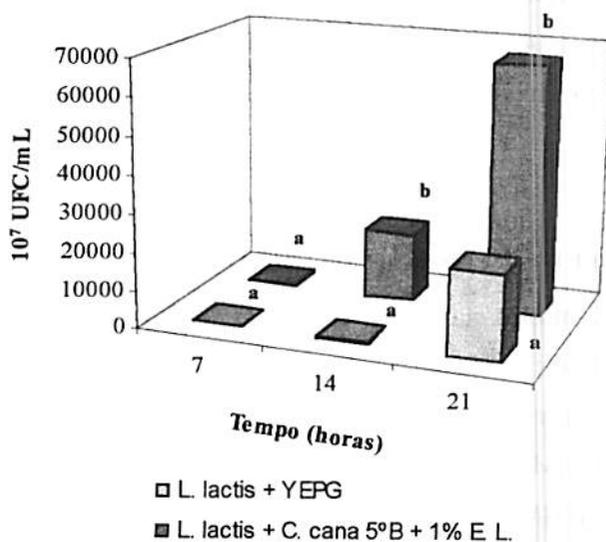
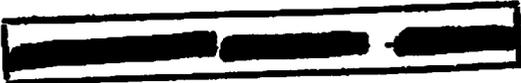


FIGURA 7 Avaliação do crescimento de *L. lactis* em dois meios de cultivo



A análise estatística realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, indicou que não houve diferença significativa no crescimento das leveduras para os dois meios em todos os intervalos de tempo avaliados. Já para bactérias houve diferença significativa no crescimento para os dois meios avaliados nos tempos 14 e 21 horas, tendo o caldo de cana acrescido de extrato de levedura proporcionado melhor crescimento que o meio YEPG (Ferreira, 1999).

4.2 Seleção da fonte ideal de crescimento para *Lactococcus lactis*

A Tabela 3 mostra que houve decréscimo na população de *L. lactis* nos tratamentos MMM adicionado de 2% glicose e MMM adicionado de 2% frutose, atingindo valores inferiores a 10^4 UFC/mL, após 24 horas. Já nos outros tratamentos com MMM, a bactéria apresentou crescimento, tendo o maior deles sido observado no MMM acrescido de 1% de extrato de levedura em 48 horas de incubação. Foi realizada a leitura de 48 horas para MMM adicionado de extrato de levedura devido a uma contaminação das placas com fungos filamentosos, oriundas da leitura de 24 horas. A bactéria também apresentou ótimo crescimento quando inoculada em caldo cana 5°B, o que indicou que o caldo de cana apresenta nutrientes satisfatórios para o crescimento de *L. lactis*.

TABELA 3 Avaliação do crescimento de *L. lactis* em diferentes fontes de carboidratos

Tratamento	0 horas (UFC/mL)	24 horas (UFC/mL)	48 horas (UFC/mL)
MMM + 2% glicose	$8,65 \times 10^5$	$< 10^4$	
MMM + 2% frutose	$9,20 \times 10^5$	$< 10^4$	
MMM + 1% sacarose	$5,30 \times 10^5$	$9,83 \times 10^6$	
MMM + 0,1% extrato levedura	$8,35 \times 10^5$	-	$1,22 \times 10^9$
MMM + 1% extrato levedura	$1,05 \times 10^6$	$1,43 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{10}$
Caldo de cana 2°B	$4,17 \times 10^4$	$7,34 \times 10^8$	
Caldo de cana 5°B	$6,67 \times 10^5$	$3,08 \times 10^9$	

4.3 Avaliação do crescimento e do teor de açúcares de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* em caldo de cana 5°B

A linhagem de *S. cerevisiae* CA116 não apresentou fase lag na curva de crescimento devido ao fato da cultura ter sido previamente adaptada no meio caldo de cana acrescido de 1% de extrato de levedura. A linhagem CA116 atingiu a metade da fase log de crescimento após, aproximadamente, 9 horas de incubação. O início da fase estacionária ocorreu após 29 horas de incubação. A população inicial de $5,54 \log$ (número de células/mL) atingiu o máximo de células $10,26 \log$ (número de células/mL) em 29 horas de incubação (Figura 8).

A variação do °Brix foi utilizada para o rápido acompanhamento do consumo de açúcares durante o período de incubação. Posteriormente, análises do teor de açúcares redutores foram realizadas. O °Brix inicial de 6,71 (g sacarose/100 mL mosto) decresceu para 1,82 (g sacarose/100 mL mosto) após 48 horas de incubação. A queda do °Brix acompanhou a rápida taxa de crescimento das leveduras (Figura 8).

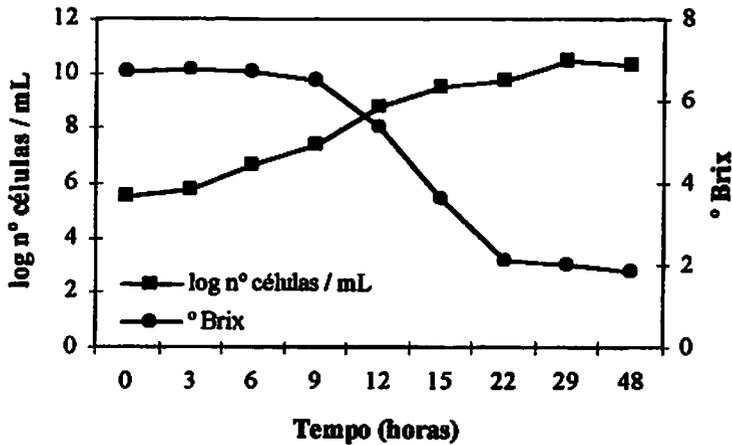


FIGURA 8 Curva de crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) e variação do °Brix em meio de caldo-de-cana 5°B acrescido de 1% de extrato de levedura (CA116)

Os resultados obtidos indicam que a linhagem CA116 apresentou rápido crescimento com elevada produção de células em meio caldo de cana acrescido de 1% de extrato de levedura. Para a produção de inóculo de CA116 foi ideal que o fornecimento de caldo de cana ocorresse em intervalos próximos de 9 horas, devido ao fato desse microrganismo se encontrar no meio da fase de crescimento exponencial.

A bactéria *L. lactis* também não apresentou fase lag na curva de crescimento, por a ter sido previamente adaptada no meio caldo de cana acrescido de 0,1% de extrato de levedura. Este microrganismo atingiu a metade da fase log de crescimento após, aproximadamente, 7 horas e 30 minutos de incubação. O início da fase estacionária ocorreu após 22 horas de incubação. A população inicial de 4,76 log (número de células/mL) atingiu o máximo de células 10,90 log (número de células /mL), em 48 horas de incubação. O °Brix inicial de 5,84 (g sacarose/100 mL mosto) decresceu para 5,72 (g sacarose/100 mL mosto), após 48 de incubação. O °Brix não acompanhou o rápido crescimento das bactérias e manteve-se praticamente estável durante as 48 horas de incubação (Figura 9).

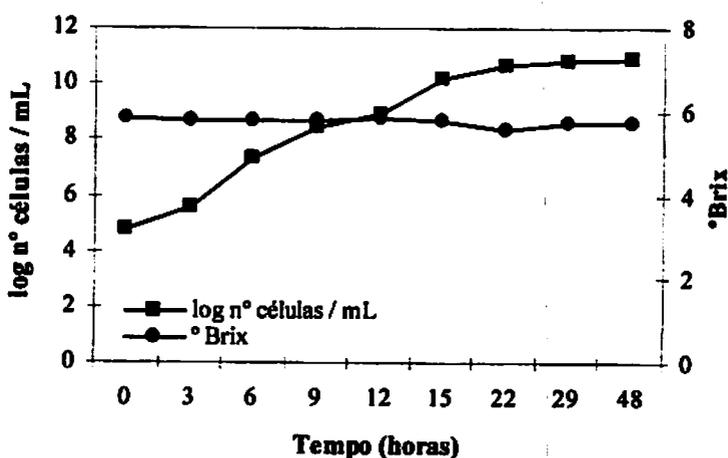


FIGURA 9 Curva de crescimento e variação do °Brix em meio de caldo cana 5°B acrescido de 0,1% de extrato de levedura (*L. lactis*) e 1% de extrato de levedura (CA116); (A) *S. cerevisiae* (CA116); (B) *L. lactis*.

A linhagem *S. cerevisiae* CA116 apresentou maior crescimento celular num intervalo de tempo menor que as leveduras avaliadas por Walker (1998) e Martins et al. (1998), sugerindo que o isolado CA116 apresenta ótima multiplicação celular. Walker (1998) apresentou uma curva típica de crescimento de leveduras, em que a metade da fase log foi atingida após 12 horas de incubação. O número de células inoculadas foi de aproximadamente, 5,00 log (número de células /mL) e atingiu o máximo de número de células 8,1 log (número de células /mL) em 37 horas de incubação. O meio de cultivo utilizado para crescimento das leveduras não foi citado. Da mesma forma, Martins et al. (1998) avaliaram o crescimento das linhagens de leveduras ABXR.11B e IZ 987 em meio YEPG (glicose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1%). As linhagens ABXR.11B e IZ 987 atingiram a metade da fase log de crescimento em 15 e 21 horas de incubação, respectivamente. A população inicial de aproximadamente 4,47 log (número de células/mL) atingiu 8,65 log

(número de células/mL) em 33 horas para a linhagem ABXR.11B e 45 horas para a IZ987, sendo que ambas as linhagens já se encontravam na fase estacionária.

A concentração de açúcares redutores no caldo de cana foi inicialmente baixa devido ao fato do açúcar predominante ser a sacarose, que é não redutor. As leveduras produzem a enzima invertase que degrada a sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose), os quais são assimilados pelas leveduras. A Figura 10 mostra que, após a inoculação de *S. cerevisiae*, o teor de açúcares redutores aumentou devido à quebra da sacarose, atingindo o pico de 26,38 g/L em 12 horas de incubação. Em 22 horas de incubação, o teor de açúcares decresceu para 2,19 g/L, indicando que as leveduras consumiram quase todo o açúcar presente no meio de cultivo. A entrada deste microrganismo na fase estacionária coincidiu com o decréscimo do teor de açúcares redutores. O consumo de açúcares redutores pelas bactérias foi mínimo. O teor inicial de 1,821 g/L decresceu para 0,941 g/L em 22 horas de incubação.

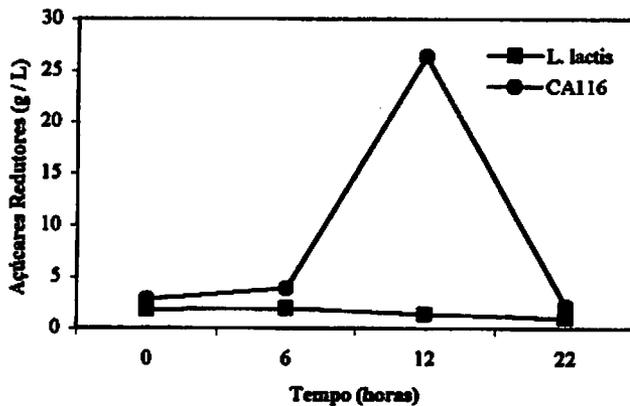


FIGURA 10 Avaliação do teor de açúcares redutores durante o crescimento da linhagem *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* em caldo de cana 5°B, acrescido de 1% e 0,1% de extrato de levedura, respectivamente.

A Figura 11 mostra a variação do pH durante o período de crescimento dos microrganismos. O meio de cultivo da levedura CA116 iniciou com um pH de 5,81 e decresceu para 5,19, em 22 horas de incubação, apresentando variação de 0,62. Já o meio de cultivo inoculado com *L. lactis* iniciou com um pH de 5,60 e decresceu para 4,04, em 22 horas de incubação, apresentando variação de 1,56. A provável razão da maior queda no pH apresentado pelas bactérias foi devido à produção de ácido láctico.

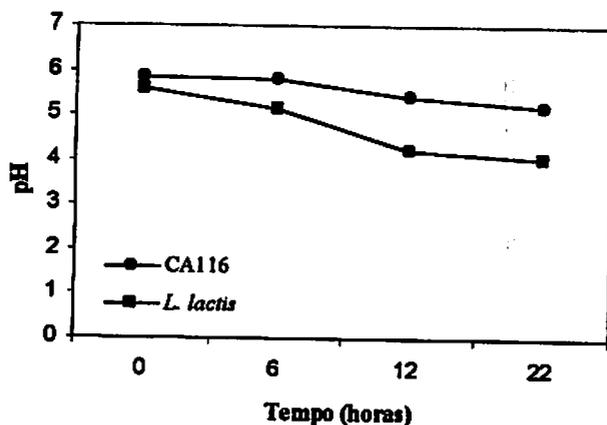


FIGURA 11 Variação do pH durante o crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* em caldo de cana 5°B, acrescido de 1% e 0,1% de extrato de levedura, respectivamente.

4.4 Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação da cachaça artesanal

4.4.1 Avaliação do crescimento

A linhagem de *S. cerevisiae* (CA116) apresentou tendências similares no crescimento log (n° células/mL) e concentração de sólidos solúveis (°Brix) durante as 26 horas de incubação, ao ser inoculada isoladamente ou co-incubada com *L. lactis* em frascos Erlenmeyers com caldo de cana a 14,4°B. O número de células aumentou de aproximadamente 8,5 para 10 ciclos log (n° células/mL) e o °Brix decresceu de aproximadamente 14,5 para 7,1, para ambos os tratamentos durante as 26 horas de incubação (Figura 12).

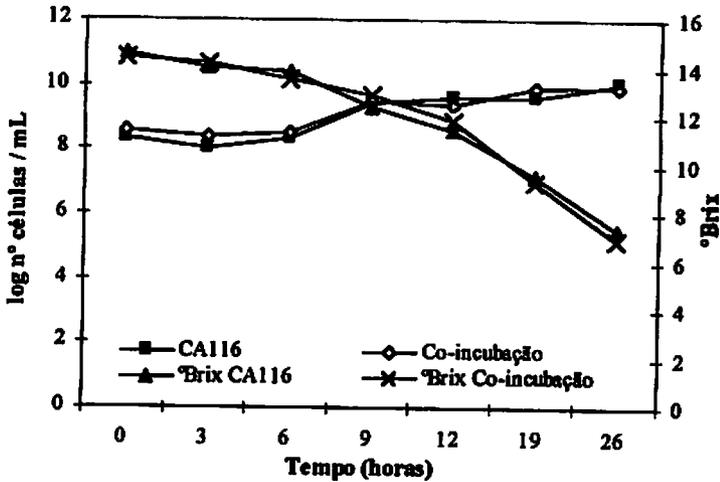


FIGURA 12 Avaliação da concentração de sólidos solúveis (°Brix) e do crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) inoculada isoladamente e co-incubada com *L. lactis* em frascos com caldo de cana 14,5°B a 30°C

O caldo de cana a 14,5°B não apresentou variação no °Brix quando *L. lactis* foi inoculado isoladamente e incubado a 30°C. Já quando a bactéria foi co-incubada com *S. cerevisiae* (CA116), o °Brix variou de 14,6 para 7,33 em 26 horas de incubação. Durante o período de incubação da cultura de bactéria, o crescimento variou de 5,17 para 7,63 log (n° células/mL) e, quando co-incubada decresceu de 5,00 para valores abaixo de 4,00 log (n° células/mL) (Figura 13).

Os resultados obtidos (Figura 12) demonstram que, durante a co-incubação, a bactéria *L. lactis* não influenciou o crescimento da levedura CA116. Entretanto, o crescimento de *L. lactis* foi reprimido pelas leveduras, ocorrendo morte celular, principalmente após 19 horas de incubação (Figura 13).

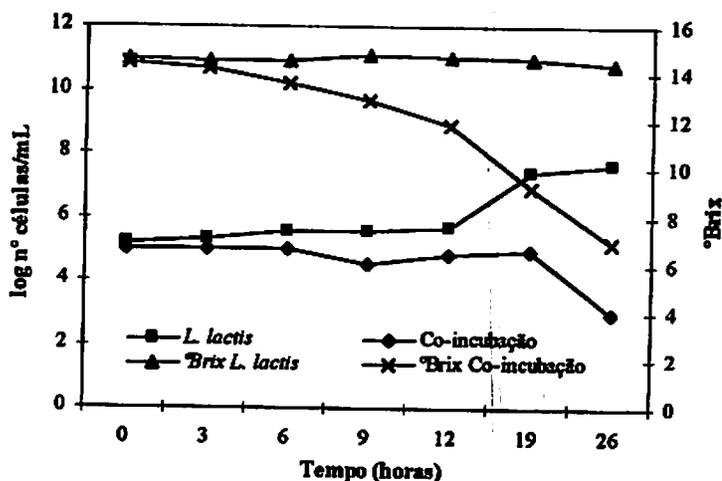


FIGURA 13 Avaliação da concentração de sólidos solúveis (°Brix) e do crescimento de *L. lactis* inoculado isoladamente e co-incubado com *S. cerevisiae* em frascos com caldo de cana 14,5°B a 30°C

A Figura 14 é referente ao número de células de leveduras presentes nas dornas no início e no final da fermentação, após quatro bateladas. As amostras do início e término foram coletadas após o enchimento da dorna e envio do vinho ao alambique, respectivamente. Não foi possível determinar com precisão o número de células, devido à floculação desta levedura, o que dificultou a coleta de amostras homogêneas para contagem. O número de células presentes no término de uma batelada deve ser semelhante ao início da batelada seguinte, o que não ocorreu durante o processo fermentativo neste experimento. O número aproximado de células no interior da dorna de fermentação para o processo fermentativo somente com leveduras oscilou, no tempo inicial, entre 13 e 14 log (nº células) e, no tempo final, entre 16 e 18 log (nº células).

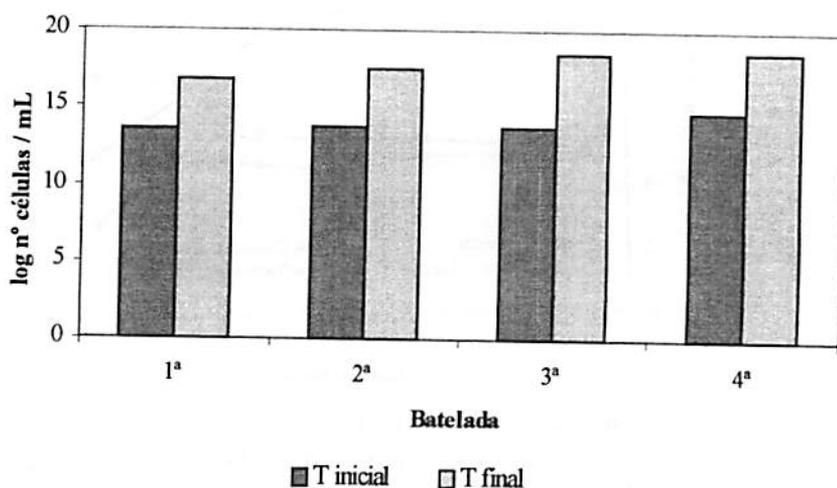


FIGURA 14 Avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) durante o processo fermentativo em dornas em quatro bateladas nos tempos inicial do preenchimento da dorna (T inicial) e final da fermentação (T final)

Na Figura 15, pode-se observar que, para as leveduras, houve o mesmo problema de coleta de amostras apresentado na Figura 14. O tempo final é sempre superior ao tempo inicial, devido à difícil homogeneização do mosto com leveduras flocculantes. A população de leveduras oscilou, no tempo inicial, entre 15 e 16 log (nº células) e, no tempo final entre 18 e 19 log (nº células).

Durante as quatro bateladas sucessivas da co-incubação, o microrganismo *L. lactis* inoculado (diplococo) predominou somente na 1ª batelada, tendo a sua população apresentado redução no final desta batelada. A população de *L. lactis* continuou a diminuir nas bateladas seguintes, tendo outras bactérias, em forma de bacilos, começado a ser encontradas no mosto. Na última batelada, a bactéria predominante foi a que se apresentou em forma de bacilo. A população bacteriana presente nas dornas durante a co-incubação aparentemente se manteve constante, mas o número de células não foi referente somente à bactéria inoculada (Figura 15). Tanto na co-incubação realizada em frascos como em dornas, o *L. lactis* não foi capaz de persistir durante o processo fermentativo.

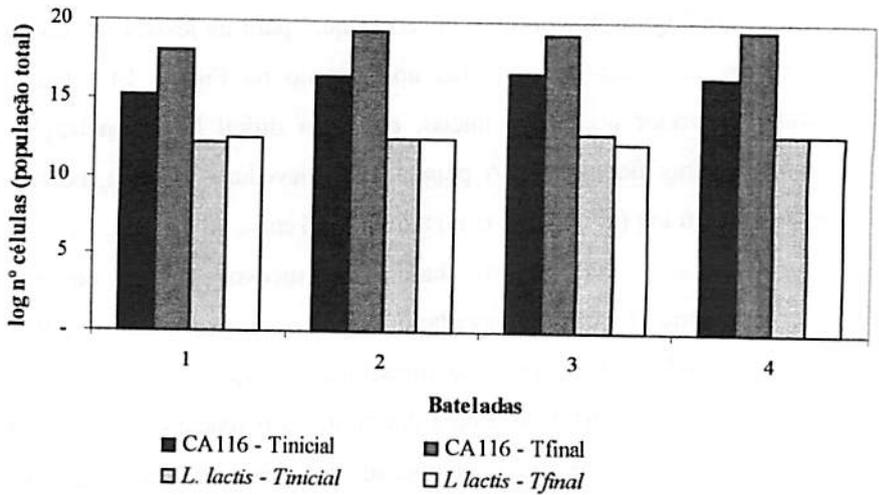


FIGURA 15 Avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* (co-incubados) durante o processo fermentativo em dornas em quatro bateladas nos tempos inicial do preenchimento da dorna (T inicial) e final da fermentação (T final)

A redução da população bacteriana durante a co-incubação com leveduras também foi constatada por Narendranath et al. (1997). Estes autores avaliaram o comportamento de diferentes concentrações de cinco bactérias do gênero *Lactobacillus* ($\sim 10^5$; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 ; 10^9 UFC/mL) co-incubadas com leveduras ($\sim 10^7$ UFC/mL) em mosto de trigo a 30°C. Quando as bactérias foram crescidas na ausência de células de leveduras, elas permaneceram viáveis. Já em cultura mista, as bactérias morriam no final da fermentação. Isto sugere que o etanol age sinergisticamente com o ácido lático, matando as bactérias e que a toxicidade do etanol é aumentada pelo decréscimo do pH causado pelo ácido lático no meio de mosto de trigo. Durante a fermentação, a concentração de ácido lático aumentou de acordo com o aumento do número de células de bactéria.

Rodarte et al. (2003) utilizaram a mesma bactéria deste experimento (*L. lactis*) em co-incubação com os isolados de *S. cerevisiae* (CA1162 e CA1183). Durante o processo fermentativo, a população celular dos dois isolados de

leveduras, puro e co-incubados, manteve-se constante em torno de 10^8 UFC/mL. A bactéria láctica cultivada isoladamente apresentou crescimento de 10^6 até 10^8 UFC/mL. Já para a bactéria em associação com CA1162, a população manteve-se constante em 10^6 UFC/mL. Quando *L. lactis* foi co-incubada com CA1183, houve um decréscimo na população de 10^6 para 10^4 UFC/mL. Estes resultados sugerem que, dependendo do isolado de *S. cerevisiae* utilizado na co-incubação, pode haver uma inibição do crescimento ou morte celular de *L. lactis*.

O isolado de *S. cerevisiae* (CA116) utilizado neste experimento foi isolado de dornas de fermentação e foi selecionado em experimentos prévios para a produção de cachaça por proporcionar elevado rendimento, persistir durante o processo fermentativo e apresentar capacidade de floculação no final da fermentação (Mendonça, 1999; Fialho, 2000; Campos, 2003). Provavelmente, a não permanência de *L. lactis* durante a co-incubação foi devido à elevada capacidade de competição do isolado CA116.

4.4.2 Avaliação do teor de açúcares redutores

A Figura 16 apresenta a concentração de açúcares redutores no decorrer do processo fermentativo em frascos. A bactéria praticamente não consumiu açúcares redutores quando cultivada isoladamente, visto que estes açúcares não são a fonte principal de carboidratos assimilados pelas bactérias. O mesmo comportamento foi encontrado para *L. plantarum* quando inoculado isoladamente com 10^7 UFC/mL. Esta bactéria não consumiu mais que 1 g por 100 mL de sólidos dissolvidos no mosto (carboidratos fermentescíveis) para crescimento e metabolismo. Tendências similares também foram observadas para *L. paracasei*, *Lactobacillus* #3, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* (Narendranath et al., 1997).

A levedura inoculada isoladamente apresentou o mesmo comportamento em relação ao consumo de açúcares redutores quando co-incubada com *L. lactis*.

Inicialmente, o teor de açúcares redutores foi de aproximadamente 3,6 g/L, atingindo um pico de aproximadamente 15 g/L, em 12 horas de incubação. O aumento na concentração de açúcares redutores se deve à quebra da sacarose em glicose e frutose por meio da ação da enzima invertase liberada pelas leveduras (Figura 16).

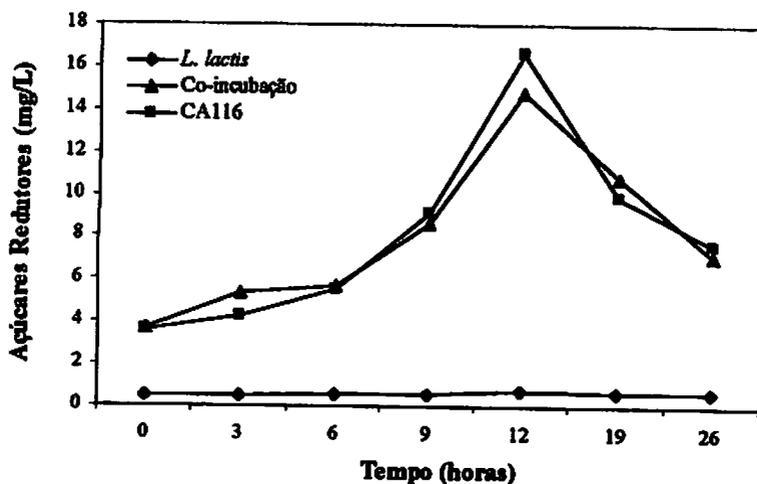


FIGURA 16 Avaliação do teor de açúcares redutores durante o processo fermentativo em frascos com a linhagem *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* inoculados isoladamente (controles) e co-incubados (CA116 + *L. lactis*) em caldo de cana a 14,5°B.

A Figura 17 apresenta a variação do teor de açúcares redutores no decorrer do processo fermentativo em dornas. O consumo de açúcares redutores (tempo inicial - t final) foi semelhante para as fermentações conduzidas com levedura isolada (CA116) e co-incubada com *L. lactis*. Durante o processo fermentativo somente com levedura, o consumo de açúcares em g/L foi de 2,51; 2,64; 2,42 e 1,57 durante as 4 bateladas. Já para a co-incubação, o consumo de açúcares em g/L foi de 2,16; 1,62; 1,32 e 2,10. A variação do teor de açúcares redutores encontrada nas bateladas se deve a pequenas oscilações no volume final da dorna.

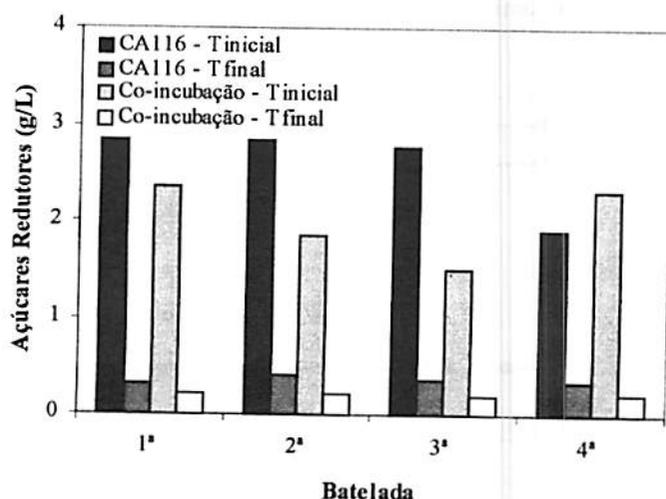


FIGURA 17 Avaliação do teor de açúcares redutores durante o processo fermentativo em dornas com *S. cerevisiae* (CA116) isoladamente e co-incubada com *L. lactis* em caldo de cana a 14,5°B.

Narendranath et al. (1997) relataram que quando dois microrganismos crescem juntos em dois meios, pode haver uma competição por certos nutrientes. No caso de co-incubação da levedura CA116 e *L. lactis*, parece que a competição não ocorreu por açúcares redutores.

4.4.3 Avaliação do pH

O valor de pH do meio, quando cultivado com bactéria e levedura isoladamente em frascos, variou 1,4 e 1,05, respectivamente, em 26 horas de incubação. Quando os dois microrganismos se encontravam em cultivo misto, houve uma variação similar à levedura cultivada isoladamente (1,1) (Figura 18).

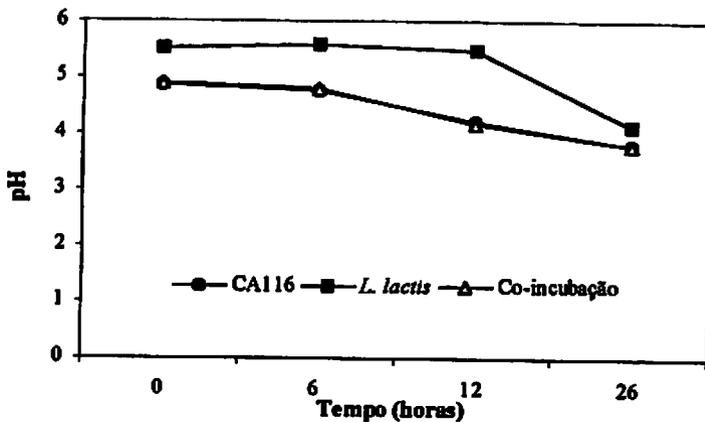


FIGURA 18 Avaliação do pH durante o processo fermentativo em frascos com *S. cerevisiae* (CA116) e *L. lactis* inoculados isoladamente (controles) e cultura mista (CA116 + *L. lactis*) em caldo de cana 14,5°B

A Figura 19 apresenta a variação do pH (tempo inicial e final) para os experimentos de fermentação com *S. cerevisiae* (CA116) isolada e co-incubada com *L. lactis* em dornas, durante 4 bateladas sucessivas. A variação de pH

(tempo final – tempo inicial) no mosto inoculado com a linhagem CA116 isoladamente foi de 0,12; 0,16; 0,15 e 0,11. Já para a co-incubação (CA116 + *L. lactis*), foi de 0,24; 0,13; 0,04 e 0,18. As variações de pH são referentes às 4 bateladas, respectivamente.

As variações de pH para o cultivo da levedura isoladamente mantiveram-se praticamente estáveis durante as 4 bateladas e, durante a co-incubação, houve oscilação.

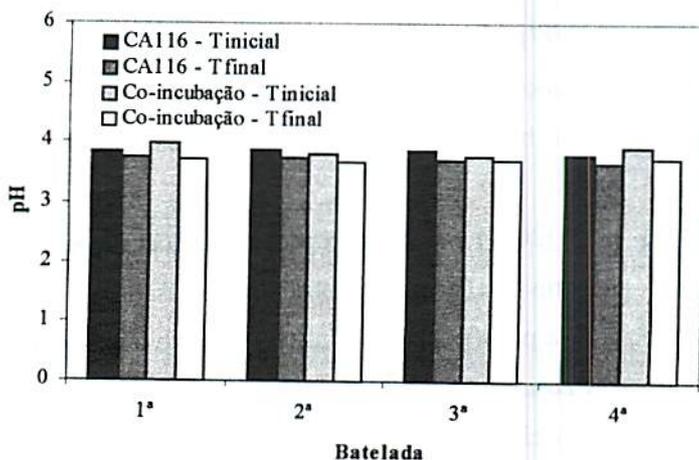


FIGURA 19 Avaliação do pH durante o processo fermentativo em dornas com *S. cerevisiae* (CA116) isoladamente e co-incubada com *L. lactis* em caldo de cana

4.4.4 Análise físico-química e cromatográfica da cachaça

As Tabelas 4A e 4B apresentam os resultados das análises físico-químicas das bebidas produzidas durante a fermentação com o isolado CA116 e co-incubação com *L. lactis*. A maior parte dos resultados das análises realizadas para a cachaça se encontra dentro dos padrões da legislação, exceto o grau alcoólico e álcoois superiores.

O grau alcoólico ficou abaixo do mínimo estabelecido pela legislação, na primeira batelada das fermentações conduzidas somente com levedura e na co-incubação (Brasil, 1997).

O teor de álcoois superiores ultrapassou o limite máximo estabelecido pela legislação em seis bateladas, tendo, nas outras duas, ficado bem próximo do limite (Brasil, 1997).

Pereira et al. (2002) encontraram problemas com álcoois superiores em 15,6 % de 45 amostras avaliadas de cachaça. O excesso de álcoois superiores pode ser devido a uma proliferação de bactérias durante o processo fermentativo ou durante o armazenamento da cana antes da moagem, o que favorece a degradação de aminoácidos ou devido a condições assépticas inadequadas da fermentação.

A quantidade de álcoois superiores nos vinhos varia segundo as cepas de leveduras, a temperatura de fermentação, a aeração e a quantidade de nutrientes (Ough, 1996).

A acidez das cachaças provenientes das fermentações com co-incubação apresentou-se um pouco mais elevada que a de fermentação somente com leveduras na 2ª, 3ª e 4ª bateladas. A acidez da 1ª batelada das duas fermentações (CA116 e co-incubação) foi muito semelhante, porém, foi a mais elevada entre as bateladas. O teor de acidez volátil ficou muito abaixo do máximo permitido pela legislação.

TABELA 4 Resultados de análise físico-química de cachaça produzida com (A) *S. cerevisiae* CA116; (B) co-incubação (*S. cerevisiae* CA116 e *L. lactis*).

(A)

Itens Analisados	Limite		Batelada			
	Mínimo	Máximo	1ª	2ª	3ª	4ª
Exame organoléptico	-x-	-x-	Normal	Normal	Normal	Normal
Densidade relativa (20/20 °C)	-x-	-x-	0,9594	0,9456	0,9456	0,9456
Cobre (mg/mL)	-x-	5	3,11	3,03	2,83	2,86
Extrato seco a 100 °C (g/L)	-x-	-x-	0	0	0	0
Grau alcoólico real a 20 °C (%V/V)	38	54	33,5	42,5	42	42
Acidez volátil em ácido Acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	150	22,84	14,4	16,39	16,39
Álcool superior (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	300	300,57	349,7	303,78	280,78
Furfural (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	5	-x-	-x-	-x-	-x-
Aldeídos em aldeído acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	30	4,75	6,56	6,22	7
Ésteres em acetato de etila (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	200	39	31,98	33,19	34,43
Soma dos componentes secundários (mg/100 mL de álcool anidro)	200	-x-	367,16	402,63	359,58	338,61
Álcool metílico (mL/100 mL de álcool anidro)	-x-	0,25	0,015	0,026	0,003	0,005
Açúcares totais (g/L em sacarose) - aguardente simples	-x-	≤ 6	-x-	-x-	-x-	-x-
Açúcares totais (g/L em sacarose) - aguardente adoçada	> 6,0	≤ 30	-x-	-x-	-x-	-x-

(B)

Itens Analisados	Limite		Batelada			
	Mínimo	Máximo	1ª	2ª	3ª	4ª
Exame organoléptico	-x-	-x-	Normal	Normal	Normal	Normal
Densidade relativa (20/20 °C)	-x-	-x-	0,9559	0,9481	0,9481	0,9489
Cobre (mg/mL)	-x-	5	3,73	3,68	3,74	3,48
Extrato seco a 100 °C (g/L)	-x-	-x-	0	0	0	0
Grau alcoólico real a 20 °C (%V/V)	38	54	36	41	39,5	40,5
Acidez volátil em ácido Acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	150	21,25	18,66	19,37	18,89
Álcool superior (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	300	362,07	311,19	303,8	296,3
Furfural (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	5	-x-	-x-	-x-	-x-
Aldeídos em aldeído acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	30	7,44	4,94	5,68	5,65
Ésteres em acetato de etila (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	200	37,75	34	39,7	34,42
Soma dos componentes secundários (mg/100 mL de álcool anidro)	200	-x-	428,51	368,78	368,54	355,25
Álcool metílico (mL/100 mL de álcool anidro)	-x-	0,25	0,015	0,003	0,036	0,029
Açúcares totais (g/L em sacarose) - aguardente simples	-x-	≤ 6	-x-	-x-	-x-	-x-
Açúcares totais (g/L em sacarose) - aguardente adoçada	> 6,0	≤ 30	-x-	-x-	-x-	-x-

O teor de cobre encontrado na cachaça, em torno de 3 mg/mL, ficou abaixo do estabelecido pela legislação, que é de 5 mg/mL. Com as várias destilações e limpeza constante do alambique, a concentração de cobre foi reduzindo-se no decorrer das bateladas. O elevado teor inicial de cobre pode ser justificado pelo pouco uso deste alambique, que é destinado apenas à realização de experimentos.

A concentração de metanol foi encontrada em baixíssimas quantidades, o que mostrou que o volume de fração cabeça colhido neste experimento foi adequado para a retirada desta substância.

Na Tabela 5 encontra-se a concentração dos álcoois superiores encontrados por meio da análise cromatográfica dos destilados provenientes da 4ª batelada do experimento de fermentação somente com leveduras e o da 1ª e 4ª bateladas da co-incubação.

O metanol foi determinado apenas qualitativamente e detectado nas frações cabeça de todas as bateladas analisadas.

TABELA 5 Concentração de álcoois superiores nas frações cabeça, coração e cauda de amostras de destilados provenientes de diferentes tratamentos

Álcoois superiores	Concentração na cachaça (mg.L ⁻¹)			
	Frações	A ¹	B ²	B
		4ª Batelada	1ª Batelada	4ª Batelada
2-butanol	Cabeça			
	Coração	nd ³	nd	nd
	Cauda			
Propanol	Cabeça	208,6	475,96	640,97
	Coração	323,69	278,07	393,67
	Cauda	nq ⁴	195,12	183,97
Isobutanol	Cabeça	166,92	576,66	514,97
	Coração	173,73	206,78	188,44
	Cauda	nq	62,83	nq
Butanol	Cabeça			
	Coração	nd	nd	nd
	Cauda			
Álcool isoamílico	Cabeça	28247,02	72562,02	81021,02
	Coração	26145,52	24526,52	26652,52
	Cauda	1245,02	7483,52	3191,02
Álcool amílico	Cabeça			
	Coração	nd	nd	nd
	Cauda			
Hexanol	Cabeça			
	Coração	nd	nd	nd
	Cauda			

¹ A – Fermentação com *S. cerevisiae* (CA116)

² B – Co-incubação (*S. cerevisiae* - CA116 + *L. lactis*)

³ nd – não determinado

⁴ nq – não quantificado

4.4.5 Análise sensorial da cachaça

A análise sensorial foi realizada após a análise química da bebida para verificar a sua aceitação junto ao público. A avaliação da cachaça foi realizada com 37 provadores não treinados, por meio da escala hedônica de 9 pontos.

A Tabela 6 apresenta os valores médios das notas para os atributos aparência, aroma, sabor e aspectos gerais. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se verificar que não houve diferença entre as bebidas para todos os atributos avaliados ($p > 0,05$).

TABELA 6 Valores médios das notas para cada atributo de análise sensorial avaliado.

Bebidas	Atributos			
	Aparência	Aroma	Sabor	Aspectos gerais
CA116	6,62 a	6,70 a	6,59 a	6,68 a
CA116 + <i>L. lactis</i>	6,49 a	6,51 a	6,24 a	6,41 a
CA116 + outras bactérias	6,57 a	6,49 a	6,22 a	6,32 a

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

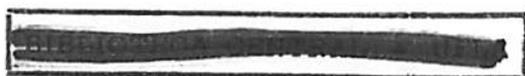
A Tabela 7 apresenta a porcentagem de aceite e recusa da bebida em relação às notas atribuídas na escala hedônica. A aparência das bebidas foi semelhante para todas as amostras, apresentando 75% de aceitação. O melhor aroma foi encontrado para a co-incubação com bactérias contaminantes (81,1%) e o sabor mais agradável foi indicado para as cachaças provenientes de leveduras e co-incubação com bactérias contaminantes (75,7 %). Em relação aos aspectos gerais, a bebida mais aceita foi a proveniente da fermentação com a levedura CA116. A cachaça proveniente da co-incubação de CA116 com *L. lactis* apresentou porcentagem de aceite menor em relação ao aroma e sabor que as outras cachaças. A cachaça poderia ter apresentado melhores resultados na análise sensorial se tivesse sido envelhecida em tonéis de carvalho.

TABELA 7 Porcentagem de aceite (6-9) e recusa (1-4) das bebidas conforme análise de escala hedônica de 9 pontos respondida por 37 provadores não treinados

Atributo	Bebida	(1-4)	(8-9)
Aparência	CA116	10,8%	75,7%
	CA116 + <i>L. lactis</i>	16,2%	75,7%
	CA116 + outras bactérias	13,5%	81,1%
Aroma	CA116	10,8%	73,0%
	CA116 + <i>L. lactis</i>	16,2%	67,6%
	CA116 + outras bactérias	10,8%	81,1%
Aspectos Gerais	CA116	5,4%	83,8%
	CA116 + <i>L. lactis</i>	16,2%	73,0%
	CA116 + outras bactérias	10,8%	75,7%
Sabor	CA116	8,1%	75,7%
	CA116 + <i>L. lactis</i>	16,2%	67,6%
	CA116 + outras bactérias	16,2%	75,7%

(1-4) Recusa

(6-9) Aceitação



A aceitação das bebidas também foi constatada por meio da aplicação de um teste não paramétrico, denominado faces de Chernoff, que utiliza um reconhecimento visual, não numérico (Figura 20).

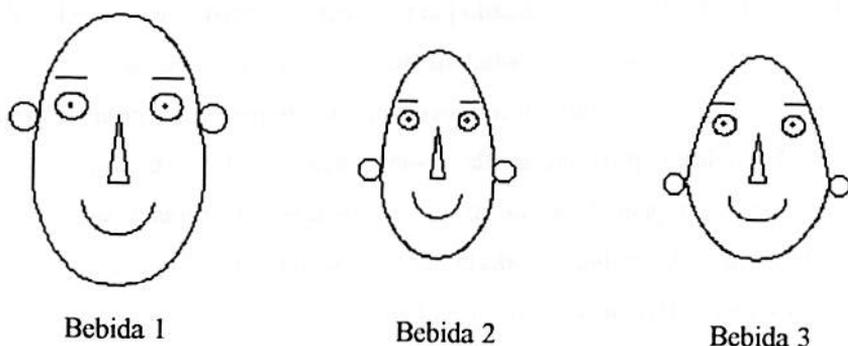


FIGURA 20 Representação da aceitação das bebidas por meio das faces de Chernoff, em que; largura da face = aparência; altura da face = aspectos gerais; curvatura da boca = sabor; largura do nariz = aroma. As bebidas 1, 2 e 3 são cachaças provenientes da fermentação com *S. cerevisiae* (CA116), *S. cerevisiae* (CA116) + *L. lactis* e *S. cerevisiae* (CA116) + outras bactérias, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

O meio caldo de cana 5°B, acrescido de 1% de extrato de levedura, foi tão eficiente para o crescimento da linhagem de *S. cerevisiae* (CA116) quanto o meio YEPG.

O melhor crescimento de *L. lactis* foi constatado no meio caldo de cana 5°B, acrescido de 1% de extrato de levedura.

A bactéria *L. lactis* cresceu em meios contendo sacarose e extrato de levedura como fonte principal de nutrientes, porém, não cresceu quando as fontes foram glicose e frutose.

A co-incubação com *L. lactis* não influenciou o crescimento da levedura *S. cerevisiae* (CA116).

As leveduras reprimiram o crescimento de *L. lactis* durante a co-incubação, ocasionando morte celular.

As bactérias não competiram com as leveduras pelo consumo de açúcares redutores.

A presença da população bacteriana não contribuiu para o abaixamento do pH durante a co-incubação.

A presença de *L. lactis* durante a fermentação alcoólica não contribuiu e nem interferiu na qualidade da cachaça.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. 1996. 69 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). Produção de aguardente de cana-de-açúcar. Lavras: UFLA, 2001. p. 19-50.
- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords). 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 analyses of the Association of Official Analytical Chemistry. 10. ed. Washington, 1965. p. 744-745.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemistry. 15. ed. Washington, 1990. v. 2, cap. 37, p. 915 e 922.
- BRASIL. Decreto nº 2314 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 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento.
- CALDWELL. D. R. Microbial physiology e metabolism. 2. ed. Philadelphia: William C. Brown Publishers, 1995. 353 p.

- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.
- CAMPELO, E. A. P. Agronegócio da cachaça de alambique de Minas Gerais: panorama econômico e social. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 7-18, 2002.
- CAMPOS, C. R. **Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça**. 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 89-96.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. ed. California: Academia Press, 2001. 558 p.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 123 p. Dissertação (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- CRUEGER, W.; CRUEGER A. **Biotechnología: manual de biotecnología industrial**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993, 413 p. Traducido por: Paloma Liras Padin Cadedrática de Microbiología Universidade de Leon.
- DANKOVITSEV, A. V.; VOSTRIKOV, S. V.; MARKINA, N. S. Fermentation Studies on the Tradicional Russian Drink "Sourish Shchi". **Journal Institute Brewing**, London, v. 108, n. 4, p. 474-477, 2002.
- ESTANISLAU, M. L. L.; JÚNIOR, F. L. C.; PAIVA, B. M. Mercado atual e potencial da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 19-24, 2002.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de Análise Estatística**. Lavras: UFLA, 1999.
- 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) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, Sidney, v. 50, n. 1/2, p. 101-117, Sept. 1999.

GOMES, F. C. O. Estudo comparativo de duas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras da fermentação para a produção da cachaça artesanal. 2002. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, p. 27.

KAJI, D. A. Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. 1989. 136 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

LEE, B. H. *Fundamentals of Food Biotechnology*. New York: VCH Publishers, 1996. 431 p.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Ed.). *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 79-107. (Série Biotecnologia Industrial).

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

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

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: Unicamp, 1993. 93 p. (Série Manuais).

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Saskatchewan, v. 63, n. 11, p. 4158-416, Nov. 1997.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to fermentation and flavor compounds in wines from cv. Kalecik karasi grape. **Journal Institute Brewing**, London, v. 108, n. 1, p. 68-72, 2002.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990. 207 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135 p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

OLSEN, A.; HALM, M.; JAKOBSEN, M. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. **Journal Applied Bacteriology**, Copenhagen, v. 79, n. 5, p. 506-512, Nov. 1995.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Traducción: Marchena. C. L.; Ibañez, M. D. C. Zazagoza: Acribia, 1996. 294 p. Do original: Winemaking Basics.

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.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.; Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 104-108, 1998.

- PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S. M.; RIBEIRO, C. F. S.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em aguardentes de cana-de-açúcar analisadas no LAFQA da Universidade Federal de Lavras (UFLA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. Resumos... Porto Alegre, RS, 2002. p. 860-863.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. *Yeast technology*. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. Cap. 4, 5. 454 p.
- RODARTE, M. P.; AMARAL, A. K.; CARVALHO, F. P.; SCHWAN, R. F. Avaliação do crescimento microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* em co-incubação na fermentação de caldo de cana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. Resumos... Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.
- ROMEIRO, R. S. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: Editora UFV, 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).
- SALES, A. C. Registro de estabelecimento, equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de aguardente. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). *Produção artesanal de aguardente*. Lavras: Editora UFLA, 2001.
- 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. S.; SILVA, J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek International Joournal of General and Molecular Microbiology*, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.
- 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 de Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 25-32, 2002.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkens, 1993. 787 p.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. *Principles of fermentation technology*. 2. ed. Great Britain: BCP Wheatons, 1994. Cap. 1, 357 p.

STASOFT Inc, 1995). *Statistica*.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

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

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931 p.

WALKER, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: John Wiley, 1998. 350 p.

WATSON, D. C. Yeast in distilled alcoholic-beverage production. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). *The yeasts*. 2. ed. London: Academic Press, 1977. v. 5, cap. 6. (*Yeast Technology*)

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, London, v. 57, p. 508-514, 1954.

ANEXOS

ANEXO A

Página

FIGURA 1A	Ficha modelo para avaliação sensorial de aceitação de cachaça em relação ao aroma, ao sabor e à aparência da bebida.....	75
FIGURA 2A	Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global da cachaça	76

Nome: _____

Idade: _____ anos

Sexo: M (); F ()

Data: / /

Nº da amostra: _____

Você vai provar 1 (uma) amostra de cachaça. Assinale, na escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou do produto, em relação aos seguintes atributos:

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente
<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito
<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei	<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei	<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente

Descreva o que você mais gostou e o que você menos gostou na amostra:

Mais gostei:

Menos gostei:

FIGURA 1 A Ficha modelo para avaliação sensorial de aceitação de cachaça em relação ao aroma, ao sabor e à aparência da bebida.

Nome: _____
Idade: _____ anos.
Sexo: M (); F ().
Data: / /
Nº da amostra: _____

Por favor, prove a amostra codificada de cachaça e indique, na escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da amostra.

- () Gostei extremamente
- () Gostei muito
- () Gostei moderadamente
- () Gostei ligeiramente
- () Não gostei, nem desgostei
- () Desgostei ligeiramente
- () Desgostei moderadamente
- () Desgostei muito
- () Desgostei extremamente

Descreva o que você mais gostou e o que você menos gostou na amostra:

Mais gostei:

Menos gostei:

FIGURA 2 A Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global de cachaça.