



**USO DE CEPAS SELECIONADAS DE  
*Saccharomyces cerevisiae* NA PRODUÇÃO DE  
CACHAÇA**

**CÁSSIA ROBERTA CAMPOS**

**2003**



55502  
UF 1047415

CÁSSIA ROBERTA CAMPOS

**USO DE CEPAS SELECIONADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* NA  
PRODUÇÃO DE CACHACA**

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

Orientador

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

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

Campos, Cássia Roberta

Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de  
cachaça / Cássia Roberta Campos. -- Lavras : UFLA, 2003.

105 p. : il.

Orientador: Rosane Freitas Schawan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Fermentação alcoólica. 4.  
Aguardente. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.53

**CÁSSIA ROBERTA CAMPOS**

**USO DE CEPAS SELECIONADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* NA  
PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

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

**APROVADA em 27 de fevereiro de 2003**

**Prof. Eustáquio Sousa Dias**

**UFLA**

**Prof Hilário Antônio de Castro**

**UFLA**



**Profª Dra Rosane Freitas Schwan  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003**

**Aos meus pais, Sr. José Dias Campos e a Sra.  
Terezinha Garcia Zica Dias Campos; aos meus irmãos Alisson  
e Leticia; ao Guilherme; à professora Rosane Freitas Schwan;  
ao Sr. Antônio Clartet Sales e aos produtores de Cachaça.**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À toda minha família meus pais, irmãos, minha avó, tios, primos pelo apoio e ao Guilherme pelo incentivo.

À Srta. Éster Garcia Zica pela confiança e companheirismo.

À família do Sr. Rafael de Souza Teixeira pela credibilidade.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan pela amizade e transmissão de conhecimentos, extensivo aos filhos.

Aos professores Romildo e Eustáquio por terem cedido o Laboratório para realização do experimento, como também pela ajuda na condução do experimento.

À UFLA pela oportunidade de cursar a pós graduação em nível de Mestrado.

Aos colegas de laboratório Cidinha, Cláudia Eugênia, Cláudia Labory, Claudinha, Raquel, Cristina, Evânia, Aramália, Fernanda, Marise, Claudinelli, Sílvia, Alexandre, Leidiane, Rogério, Celso, Gabriel, José Luiz, Leonardo Ivani, Érica, pelo carinho e amizade

Ao Sr. Pascoal Júnior pela disponibilidade e pelas viagens

Às colegas, Luana e Márcia pela presença.

Ao Vinícius pelo tempo que convivemos, obrigado amigo, por não me deixar sozinha, à noite, como também nos finais de semana, no Laboratório de Fungos Medicinais e Comestíveis.

Às secretárias Alcimara, Magda e Giselda, pelo suporte.

Aos colegas, Guimarães, Anete, Cleusa, Vanize e Lamartine, por terem ajudado nas análises.

À s meninas da república, Bianca, Camila, Gislene, Emilia e Priscila, pelo agradável convívio.

A CNPq pela bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Ao Sr. Antônio Claret Sales, familiares e auxiliares, pelo caldo de cana, como também pelo suporte dado ao experimento.

À FAEPE por ter concedido o alambique.

Ao Prof. Disney Ribeiro Dias (UNILAVRAS) agradeço pelas instruções a mim concedidas.

Ao corpo docente, extensivo a todos os funcionários dos departamentos de Ciência dos Alimentos e Biologia pela dedicação.

A Bety pelo apoio e a Duceli pela descontração.

Ao amigos João Álisson, Jaqueline e Rita por ter compartilhado comigo do meu sonho.

De modo geral a todos que participaram direta ou indiretamente da realização do meu experimento.

Vou, mas permanecerá comigo para sempre as qualidades de cada um de vocês, a sabedoria. aqui adquirida, e a conquista através da concretização do meu sonho; de ser “ Mestre”.

**OBRIGADA.**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Leveduras utilizadas e preparo do inóculo.....	39
3.2 Sistema de produção de cachaça.....	40
3.3 Coleta de amostras.....	41
3.4 Potencial hidrogeniônico (pH).....	42
3.5 Teor de sólidos solúveis totais (Brix).....	42
3.6 Processo fermentativo.....	43
3.7 Análise microbiológica.....	44
3.8 Caracterização das células.....	45
3.9 purificação e manutenção dos isolados de leveduras.....	45
3.10 Cariotipagem (PFGE- pulse field gel electrophoresis).....	46
3.11 Destilação.....	47
3.12 Análise química da cachaça.....	49
3.13 Análises cromatográficas.....	49
3.14 Envelhecimento da cachaça.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Processos fermentativos em bateladas sucessivas.....	51
4.2 População microbiana.....	63
4.3 Análise química das bebidas produzidas.....	78
4.4 Alcoois superiores e Ácidos produzidos durante a fermentação.....	87
4.5 Comparação dos processos fermentativos.....	91
5 CONCLUSÕES.....	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## RESUMO

CAMPOS, Cássia Roberta. **Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de Cachaça.** 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*

A cachaça, bebida fermento-destilada, produzida a partir do caldo de cana-de-açúcar, vem expandindo seu mercado de consumo sendo encontrada nas grandes adegas nacionais, como também no exterior. O processo de produção é natural e espontâneo e a fermentação é o ponto crítico da produção desta bebida, devido à presença de microrganismos contaminantes que podem interferir no processo prejudicando a qualidade. O emprego de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* que persistem e dominam a fermentação é imprescindível para que esta qualidade seja de fato alcançada. Foram utilizadas três cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça, sendo avaliadas quanto a fermentação e destilação na quantificação de componentes secundários. A cepa RL11 apresentou o menor período fermentativo, porém teve o menor rendimento em destilado. As fermentações realizadas com a cepa RL 11 apresentaram maior número de microrganismos contaminantes. A *S. cerevisiae* CA116 foi capaz de persistir e dominar a fermentação e apresentou o maior rendimento em destilado. Dentre os compostos analisados por cromatografia gasosa, apresentou o maior teor alcoólico em etanol (43%), como também os maiores valores de álcool 1-propanol , acetato de etila e amílico em fermentados e em destilado a maior concentração de 1-propanol. A cepa FC9 dominou o período fermentativo, porém devido ao período fermentativo extenso, torna-se inviável para produção de Cachaça. De modo geral, apresentou os menores valores quantificados nos 10 compostos analisados por cromatografia gasosa. Dos isolados de leveduras de todas as bateladas do experimento foi observado que morfotipos de colônias diferentes não necessariamente indicam que sejam células de cepas diferentes, o que deve ser confirmado por técnica molecular.

---

Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientadora), Eustáquio Souza Dias- UFLA e Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

## ABSTRACT

CAMPOS, Cássia Roberta. **Utilization of selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Cachaça.** 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Cachaça is a fermented distilled beverage produced from sugar cane juice, which is expanding the national and international consumption. The production process is natural and the fermentation step is the critical point to deal with due to microbial contamination which may interfere with the quality of final product. The utilization of selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* which can persist and dominate the fermentation process is necessary to reach the final quality required for consumers. It was used three different Stearns of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of cachaça in relation to fermentation ability and secondary products formed during fermentation and distillation. The strain RL11 showed the smaller period of fermentation, however had the lowest yield for the final distilled beverage. The fermentations done with the strain RL 11 showed great number of contaminant microorganisms. *S. cerevisiae* CA116 was able to persist and dominate the fermentation despite the wild species and showed the highest production yield. Among the compound analyzed by gas chromatography, the fermentations done with CA116 showed the highest ethanol concentration (43% v/v). In those samples it was also presented the highest values for 1-propanol, ethyl acetate e amyl. The strain FC9 dominate the fermentation period, but due to longer period of time required to finish the fermentation, it is not recommended for cachaça production. Generally the compounds produced by FC9 were less than the ones produced by others strains. It was also observed that the difference in colonies morfotypes not necessarily indicate that they are from different strains which should be confirmed by molecular technique.

---

Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor),  
Eustáquio Souza Dias - UFLA and Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

# 1 INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar no Brasil teve início em meados do século XVI, destinando-se principalmente à obtenção de açúcar mascavo e rapadura. Neste período, apenas uma pequena parte desta produção era reservada à manufatura de aguardente, a qual era consumida em grande escala nas zonas rurais e, posteriormente, nas periferias das grandes cidades. Atualmente a aguardente encontra-se presente em todos os segmentos da sociedade brasileira, (Pataro et al., 2002).

A aguardente de cana é manufaturada artesanalmente por milhares de produtores de diferentes estados brasileiros. Minas Gerais destaca-se como um dos grandes centros produtores de cachaça artesanal, cuja produção encontra-se em constante ascensão. O número de alambiques neste estado, nos últimos 14 anos, teve um aumento de 1,5 mil para 8466 unidades, com uma estimativa de produção anual de 120 milhões de litros e um consumo de 170 milhões de litros. Estima-se que, anualmente, são produzidos 1,5 bilhões de litros de aguardente no Brasil, o que corresponde a um consumo de 30 garrafas por segundo ou 10 litros/habitante/ano (Sebrae, 2001).

A cachaça brasileira também tem buscado a melhoria da qualidade com vistas ao comércio interno e à exportação. Vários processos estão envolvidos para que esta qualidade seja atingida, entre os quais se relacionam o cultivo da cana, o alambique e o tipo de fermentação. A este último relacionam-se outros fatores de grande importância, como composição do mosto, o processo fermentativo envolvido (batelada simples; alimentada, etc) e a condução do mesmo e a recuperação do produto (destilação para obtenção da aguardente). No processo fermentativo, a levedura utilizada é a principal responsável pela qualidade do produto final (Cleto, 1995). Este microrganismo pode ter pelo

menos duas origens distintas: selvagem (presente na microbiota da cana/alambique) ou introduzida (selecionada de fermentações anteriores ou de inóculo comercial). Através de trabalhos realizados na seleção e identificação de microrganismos biotecnologicamente voltados para a produção de cachaça, isolados que predominaram numa fermentação podem ser, então, repassados a outros produtores que buscam um inóculo que lhes traga resultados eficazes, e que responda aos interesses almejados pelos produtores da mesma, como boa adaptação ao mosto com teores elevados de álcool e açúcar; dominar a fermentação; não produzir espuma excessiva; boa rentabilidade em etanol e fermentar completamente os açúcares (Schwan et al., 2001).

A seleção de microrganismos vem sendo utilizada com o objetivo de intensificar a produção de determinado produto, enfatizando as características desejáveis do mesmo, para uma possível definição de um inóculo voltado para produção de cachaça.

O uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça tem como objetivo acelerar a etapa de multiplicação celular bem como elevar e garantir a qualidade da bebida. Este estudo teve como objetivo avaliar, dentre três cepas de leveduras, a que melhor se adaptou na produção desta bebida, destacando a persistência e dominância da cepa inoculada na presença de microrganismos contaminantes. Foi também avaliada a proporção de compostos obtidos da destilação do vinho, metabolizado por cada cepa.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### Bebidas alcóolicas

Não se sabe ao certo quando teve início o processo de fabricação de bebidas alcóolicas. Quanto ao álcool, dados relatam que os árabes foram os seus descobridores, uma vez que foram autores de descrições mais precisas em meados do século X, supondo que eles criaram os termos álcool e alambique. Desde os antigos egípcios, caldeus, gregos e chineses, antes da era Cristã, a destilação já era realizada. As primeiras menções sobre álcool na Europa datam do século XII (Pataro et al., 2002).

A produção de aguardente deve ter começado em vinícolas nas regiões produtoras de bebidas fermentadas a partir de produtos amiláceos. Aparentemente sua origem remonta ao século VII, quando Marcus Grecus teria destilado vinho tinto e condensado os vapores num elmo, denominado "alembikos". O nome dado ao produto fermentado era "água-da-vida", *acquavite* em italiano, *eau-de-vie* em francês e *uisgebeatha* em gaélico. Posteriormente os alquimistas levaram a fórmula para a França. Ao mesmo tempo, por força da expansão romana, os árabes, habitantes da Península Sul da Ásia, apossaram-se da fórmula. Foram eles que descobriram os equipamentos para a destilação, semelhantes aos que conhecemos hoje. Eles não usavam a palavra *alkuhul*, e sim *al raga*, originando a palavra *arak*, uma aguardente misturada com licores de anis. Daí espalhou para toda a Europa e Ásia. Da França foi para a Itália. O destilado de uva ficou conhecido como *grappa*. Depois entrou em terras germânicas, onde a partir da cereja se destilava o *kirsh*. Subiu para a Escócia, onde se tornou popular o *uisque*, destilado da cevada sacrificada. Do Oriente Médio para o Extremo Oriente a aguardente servia para esquentar o frio das populações onde não se fabricava o vinho. Na Rússia, a *vodka* de centeio; na

China e no Japão, a fórmula de destilação beneficia o arroz, surgindo o sakê. O processo de fabricação foi também para Portugal, que utiliza para destilação seu produto nobre: a uva. Nasce aí a bagaceira (Pataro et al., 2002). Em sua sede de exploração e na tentativa de tomar posse das terras recém-descobertas, traz ao Brasil a cana-de-açúcar, originária da Ásia Meridional. Assim, surgiram os núcleos de povoamento e agricultura.

Na América do Sul os índios brasileiros já utilizavam bebidas alcólicas antes da chegada dos portugueses. Sabe-se que os ameríndios desconheciam o processo de destilação e que as bebidas por eles usadas eram produzidas a partir da fermentação de mostos de caju, mandioca, banana-da-terra, milho, ananás, batata, jenipapo e mel de abelha. De acordo com certos cronistas portugueses e alemães dos séculos XVI e XVII, o preparo destas bebidas não diferia muito de uma tribo para outra, sendo comum a utilização de uma técnica conhecida como 'cauinagem'. Tal processo é utilizado na ativação ou iniciação do processo de fermentação, consistindo, basicamente, na mastigação prévia dos frutos ou raízes usados como matéria prima (Casculo, 1983; Ihde, 1984).

Com a introdução da cana-de-açúcar no Brasil por Martin Afonso de Sousa, em 1522, juntamente com a construção dos primeiros engenhos na década de trinta desse mesmo século, tornou-se possível a obtenção, a partir da borra do caldo de cana (garapa), uma bebida que foi inicialmente destinada aos escravos. Com o aperfeiçoamento das técnicas de destilação, ocorreu a vulgarização da Cachaça e outras bebidas destiladas na Europa (Carvalho & Silva, 1988).

De acordo com a legislação brasileira, a bebida alcoólica é definida como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa, exigindo que o produto destilado-retificado obtido de mosto fermentado seja o álcool etílico (Aquarone, 2001).

As bebidas alcóolicas são classificadas em dois grupos: fermentadas e destiladas, sendo que nas últimas o mosto após a fermentação sofre algum processo de destilação.

As bebidas fermentadas são preparadas por fermentação e operações posteriores de clarificação e acabamento; entre elas encontram-se o vinho, obtido de uvas e outras frutas, os fermentados obtidos de grãos e de outras partes vegetais, fermentados de seiva e fermentados de mel.

Em bebidas alcóolicas o álcool em maior concentração é o etílico ou etanol, um líquido incolor, límpido, de cheiro cáustico e ardente, miscível em água, peso específico 0,7932 a 15 °C, massa específica 0,7830 g/L a 20 °C, temperatura de ebulição 78,35 °C, temperatura de solidificação -135 °C, inflamável, bactericida, solvente de diversos compostos orgânicos e inorgânicos (Bourgeais, 1995).

Bebidas alcóolicas possuem características próprias de aroma e sabor conferidas pela presença de diversos constituintes do processo fermentativo. Além do etanol, muitos compostos orgânicos, como álcoois superiores, ácidos orgânicos e ésteres podem estar presentes. Do ponto de vista microbiológico, a variação qualitativa e quantitativa destes produtos é devida à estirpe de levedura utilizada (Mendonça, 1999). De acordo com Demain (2000), todas as bebidas alcóolicas são produzidas por fermentação, sendo que algumas podem sofrer destilação após o processo fermentativo.

### **Bebida destilada: Cachaça**

O aparecimento das bebidas destiladas está relacionado com o surgimento dos alambiques, cujo princípio era separar as substâncias voláteis entre as fases líquida e vapor de um produto quente, no qual permite recolher o álcool e os compostos aromáticos dos produtos vegetais fermentados.

A destilação pode acentuar intermediários indesejáveis na obtenção da bebida. Este inconveniente pode ser evitado através de um controle rígido de variáveis como pH, °Brix, temperatura e higiene, durante toda a fabricação, somando-se a isto uma matéria-prima de boa qualidade.

A história da cachaça se confunde com a própria história do Brasil. Antigamente era considerada ‘Aguardente’ a bebida alcoólica fermentada a partir do caldo de cana, e ‘cachaça’ a bebida produzida a partir do melaço de cana. Hoje, a bebida produzida tanto a partir do melaço quanto do caldo proveniente de cana-de-açúcar de modo artesanal é denominada de cachaça e aguardente, chamada a bebida alcoólica derivada do caldo de cana através de produção industrial (Cardoso, 2001). Atualmente, existem em Minas Gerais 8466 produtores, caracterizados por uma produção essencialmente artesanal. Em várias regiões as práticas tradicionais de fermentação, provenientes dos séculos XVIII e XIX, ainda são utilizadas.

### **Matéria-prima**

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à classe das Monocotiledôneas, família Poaceae (Gramíneas), do gênero *Saccharum*. Tem a característica de adaptar-se perfeitamente a climas tropicais e subtropicais (Andrade, 2001)

O Brasil tem uma área plantada com cana-de-açúcar de aproximadamente 4,3 milhões de ha, sendo o maior produtor mundial de cana (cerca de 275 milhões de t/ano, 30% da produção mundial). O Estado de São Paulo é o principal produtor (135 milhões de t/ano, aproximadamente 50% da produção nacional), enquanto que Minas Gerais é o quarto maior produtor (cerca de 18 milhões de t/ano, 7% da produção nacional) (Andrade, 2001).

A cana durante seu ciclo vegetativo atravessa normalmente dois períodos distintos com relação à formação de sacarose. O período inicial é marcado pelo

crescimento vegetativo intenso, acompanhado por uma gradual formação de sacarose nos internódios adultos. E no período seguinte, ocorre uma predominante formação de sacarose, ocasionado pela escassez dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento vegetativo que são a umidade e o calor (Andrade, 2001).

De maneira geral, a composição química da cana é resultante da interação de vários fatores, divergindo dentro de uma mesma região, as condições climáticas, as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, com o tipo de cultivo empregado, com a variedade e a idade da cana, irrigação, intensidade de desponete, estágio de maturação, condições e tempo de armazenamento. Da composição da cana-de-açúcar, 99% são devidos aos elementos hidrogênio, oxigênio e carbono. Sua distribuição no colmo, em média, é de 74,5% de água, 25% de matéria orgânica e 0,5% em matéria mineral.

### Inóculo

A cachaça é obtida a partir de uma fermentação natural de caldo de cana-de-açúcar recém cortada e moída. A inoculação de microrganismos selvagens é oriunda dos materiais e substratos utilizados para o preparo do inóculo ou pé-de-cuba. Este inóculo selvagem geralmente é obtido através do caldo de cana não diluído acrescido de arroz, farinha de milho, biscoito de sal e suco de limão ou laranja azeda. Este processo propicia condições para que leveduras selvagens se multipliquem garantindo a dominância na fermentação (Schwan et al., 2001). Durante aproximadamente 7 dias é acrescentado caldo de cana até que o mesmo atinja 20% do volume da dorna principal, onde será inoculado e adicionado caldo de cana até completar o seu volume total. O inóculo inicial consiste de uma população mista de leveduras em torno de  $3,6 \times 10^9$  UFC/mL, e de  $3,6 \times 10^4$  UFC/mL de bactérias (Schwan et al., 2001).

A população microbiana desenvolvida no fermento selvagem é geralmente dominada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Outras espécies de leveduras também já foram encontradas em baixas concentrações. Em função da variação na microbiota, a cachaça produzida pode apresentar alterações na qualidade ao longo da safra e entre safras diferentes. Desta maneira a utilização de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas da fermentação da cachaça na preparação do fermento iniciador, torna possível o processo fermentativo, evitando problemas com contaminações (Pataro et al., 2002).

Atualmente obtêm-se, em laboratório, leveduras selecionadas que têm demonstrado uma boa eficiência, as quais são acrescentadas em caldo diluído e, em torno de três dias, o produtor terá o volume correspondente à dorna principal, para posterior fermentação. Sendo um fermento definido, a contaminação por bactérias e/ou outras leveduras competidoras de substrato é menos propícia. As leveduras para este tipo de inoculação são obtidas de isolamentos de cepas que apresentaram sucesso em fermentações anteriores, as quais são colecionadas em laboratório (Pataro et al., 2002).

### Fermentação

A fermentação é um processo espontâneo, obtido através da contaminação de microrganismos em substratos. Foi considerada um processo metabólico exclusivo de microrganismos, ocorrendo na ausência de oxigênio. Atualmente é considerada um processo no qual a fosforilação ocorre em presença de substrato (Caldwell, 1995).

Nas destilarias de cachaça, a produção da bebida inicia-se com a obtenção do caldo de cana através da prensagem da cana nas moendas. Este caldo é filtrado e clarificado por decantação, a qual retira parte das impurezas em suspensão. O caldo obtido pela moagem de cana-de-açúcar é constituído de água entre 78 e 86%, sacarose entre 11 e 18%, açúcares redutores entre 0,2 e 1,0%, cinzas entre 0,3 e 0,5% e compostos nitrogenados entre 0,5 e 1,0%

(Aquarone, 2001). O caldo de cana-de-açúcar a ser fermentado apresenta normalmente valores de pH entre 5,2 e 5,8. A fermentação ideal ocorre com o caldo de cana numa concentração de açúcar entre 14 e 16 °Brix.

De acordo com Caldwell (1995), na área da biotecnologia o principal aspecto da fermentação são quais os produtos que poderão ser obtidos a partir da mesma. O processo de fermentação ocorre graças à ação de enzimas provenientes de certos microrganismos, tais como as leveduras, que transformam os açúcares, susceptíveis à fermentação, presentes no mosto, em etanol, metanol, gás carbônico, glicerina, ácido succínico e outros produtos formados em quantidades menos relevantes, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e hidrocarbonetos superiores (Aquarone et al., 1983; Piggott et al., 1989).

Vários são os produtos derivados de fermentações, que diferem de acordo com os microrganismos, substratos e das enzimas que estão presentes e ativas. A Tabela 1 relaciona os microrganismos com seus respectivos produtos finais da fermentação.

**TABELA 1** Produtos finais de várias fermentações microbianas.

Microrganismos	Produtos finais da fermentação
<i>Streptococcus, Lactobacillus</i>	Ácido láctico
<i>Saccharomyces</i>	Etanol e CO <sub>2</sub>
<i>Propionibacterium</i>	Ácido propiônico, ácido acético, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O
<i>Clostridium</i>	Ácido butírico, butanol, acetona, álcool isopropílico e CO <sub>2</sub>
<i>Escherichia, Salmonella</i>	Etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O
<i>Enterobacter</i>	Etanol, ácido láctico, ácido fórmico, butanodiol, acetoina, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O

Fonte: Tortora (2000).

A grande maioria dos organismos fermentadores tem em comum o fato de metabolizar a fonte de carbono até o piruvato, e deste sintetizar outros compostos orgânicos retentores de energia, como o ácido lático (fermentação láctica), ácido acético (fermentação acética), etanol (fermentação alcoólica), ácido propiônico e outros (Lehninger et al., 2000).

A fermentação do caldo de cana é completada em aproximadamente 24 horas, quando as leveduras decantam no fundo da dorna, e depois de retirada do sobrenadante, serão recicladas com adição de novo caldo, diluído em torno de 16 °Brix a uma temperatura de 30 °C. A diluição do caldo de cana é realizada, uma vez que o alto teor de °Brix é limitante para a célula, que convertendo muito açúcar em etanol, logo no início da fermentação sofrerá estresse pela grande quantidade final do mesmo; devendo ser controlado de tal forma que caia 1°Brix/h e no final da fermentação esteja zerado, demonstrando boa fermentação, (Schwan et al, 2001).

Os três principais sistemas industriais utilizados atualmente são: a batelada simples (sistema descontínuo), a batelada alimentada (sistema semicontínuo) e o sistema contínuo (Borzani, 1975; Doin, 1975; Cruger, 1993). Outros dois processos foram desenvolvidos por Andrieta & Stupiello (1990), para a produção de álcool combustível, o contínuo em múltiplo estágio e a batelada contínua.

O sistema de fermentação mais utilizado por produtores de cachaça artesanal é o de batelada simples com reciclagem do inóculo. Este método consiste na inoculação de uma dorna com o pé-de-cuba. Quando na multiplicação celular esta dorna é completada em seu volume final, passa-se a metade do conteúdo para uma dorna vazia (corte de dorna) e, em seguida, completa-se o volume das duas dornas com o caldo a ser fermentado (Pataro et al., 2002). Esta fermentação consiste de três fases: fermentação inicial ou pré-



fermentação; fermentação principal ou tumultuosa; fermentação final, lenta ou pós-fermentação.

Na fermentação inicial, o mosto definitivo apresenta uma quantidade de  $O_2$  necessário para a multiplicação inicial das leveduras caracterizando esta fase, na qual se observa somente o crescimento da colônia de levedura. A fermentação principal é iniciada quando o  $O_2$  do mosto termina, caracterizando-se pela paralisação da produção das leveduras que passam a elaborar a enzima, que ataca os açúcares transformando-os em álcool e gás carbônico. Com o desprendimento de gás carbônico haverá a formação de bolhas no mosto. Observa-se, ainda um aroma característico, semelhante ao de maçãs maduras, um aumento acentuado da temperatura e haverá normalmente uma queda do  $^{\circ}$ Brix e um aumento do grau alcóolico do mosto. Já na fermentação final as bolhas começam a diminuir, a temperatura cai vagarosamente, porém ainda há um pequeno desprendimento de gás carbônico. Esta fase final termina quando ocorre uma paralisação total do desprendimento de gás carbônico, o desaparecimento das bolhas e a volta da temperatura ambiente (Lima et al, 1983).

Da mesma maneira pH e temperatura do mosto em fermentação deve ser controlado para não permitir desenvolvimento de microrganismos contaminantes. De acordo com Schwan et al. (2001), em valores de pH próximos a 4 e temperatura acima de  $32^{\circ}C$ , as contaminações podem ocorrer.

Alguns estudos cromatográficos mostraram a ausência de sacarose nas dornas de fermentação, visto que em função do aumento da temperatura do mosto, esse açúcar sofre hidrólise espontânea em glicose e frutose, assim com grande quantidade de invertase na base da dorna de fermentação a enzima hidrolisa o substrato fresco conforme ele chega lentamente (Schwan et al., 2001). A glicose é rapidamente convertida em etanol devido à sua fácil permeabilidade na membrana celular, enquanto que a frutose permanece por um

período de tempo maior, devido ao fato de que há grande quantidade de etanol no meio, pois toda a glicose já foi convertida, o que dificulta a absorção desse açúcar (Leão et al., 1982, 1985). Entretanto, de acordo com Iglesias et al. (1991), há algumas evidências de que o transporte da frutose não é severamente afetado pelo etanol.

### Destilação

Após a fermentação, o mosto fermentado é enviado ao alambique e será aquecido, emitindo vapores com composição química mais rica em componentes voláteis do que a fração líquida remanescente, obtendo, desta maneira, uma cachaça de 38 a 48% de teor alcoólico, medida que expressa a concentração de álcool em bebidas destiladas, a partir do vinho cuja concentração em álcool é apenas de 7 à 8.

No alambique, por ebulição, serão separados os compostos resultantes da fermentação, de acordo com ponto de ebulição característico de cada substância. Sabe-se que nas primeiras porções da destilação, chamada de cabeça, os produtos são mais voláteis que o álcool e saem na primeira destilação, na qual a maior concentração é de metanol, constituindo metabólitos indesejáveis; o álcool etílico, que apresenta ponto de ebulição de 78,5°C, constitui a segunda porção da destilação, também chamada de coração, o qual resulta na cachaça com teor alcoólico entre 38 e 48°. Os produtos menos voláteis que o álcool etílico são obtidos na última porção de destilação, chamada de cauda, composta de ácidos voláteis e álcoois superiores, os quais devem permanecer no vinhoto, ou serem transferidos em porções discretas e suficientes ao coração para a caracterização da bebida.

Os açúcares residuais e os compostos sulfurados podem sofrer transformações químicas durante o aquecimento do vinho, no alambique, afetando a qualidade da bebida. A presença de açúcares residuais ou bagacilho,

no vinho poderá formar compostos indesejáveis, catalisados pelo aumento da temperatura e pelo pH ácido do vinho, desidratando os açúcares e hidrolisando celulose, hemicelulose e pectina, como também outros polissacarídeos do bagacilho, seguido da desidratação dos monômeros de hexoses e pentoses, originando hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente (Maia, 1994).

Os compostos sulfurados encontrados nos vinhos são provenientes da degradação de aminoácidos como metionina, cisteína, cistina e outros compostos; os que contêm enxofre na forma de sulfato ou pontes de dissulfetos, representam a maior proporção e são geralmente não-voláteis; enquanto uma pequena fração corresponde ao gás sulfídrico e mercaptanas. Durante a destilação o gás sulfídrico é eliminado. A presença de cobre no alambique é considerado favorável, uma vez que o íon catalisa a oxidação das mercaptanas (líquidos voláteis que, presentes mesmo em níveis de partes por bilhão conferem aroma desagradável a cachaça) convertendo-os em sulfetos e dissulfetos e minimizando sua ocorrência na bebida destilada.

Em bebidas destiladas os componentes orgânicos retentores de energia consistem principalmente de etanol; entretanto, há a formação de outras substâncias, denominadas compostos secundários, os quais, que devido à sua volatilização, são destilados juntamente com o etanol, conferindo nas diferentes aguardentes suas características peculiares, definido como o “flavor” da bebida. A natureza e a proporção desses compostos secundários são definidos pela característica da matéria-prima da fermentação, na qual a cepa de levedura exercerá grande influência na destilação e no envelhecimento (Cleto, 1997).

### **Produtos oriundos da fermentação e destilação**

A fermentação ocorre, quando sob condições anaeróbicas, as leveduras cessam sua multiplicação e reverterem seu metabolismo para a formação de compostos orgânicos passíveis de armazenamento de energia. A indução da

formação de alguns destes compostos é a base da biotecnologia para a obtenção de produtos de interesse industrial. No caso de bebidas alcoólicas, não só o etanol, mas substâncias como glicerol, ésteres, álcoois, entre outros, são responsáveis pela formação do aroma que caracterizam o produto final (Lehtonen & Suomalainen, 1977; Watson, 1993; Lurton et al., 1995).

A cachaça apresenta em sua composição substâncias inorgânicas como metais e outros, e substâncias orgânicas como componentes primários e secundários resultantes da atividade de microrganismos. O etanol é um dos principais metabólitos primários formado durante o processo; este composto é formado a partir da clássica via de Embden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica, sob condições de anaerobiose. A partir de monossacarídeos (glicose, frutose, manose), basicamente, as células produzem piruvato sob a ação de várias enzimas em várias reações (Rose, 1977; Berry & Brown, 1987).

Os componentes da cachaça classificados como secundários constituem um grupo de produtos hidrocarbonetos carbonilados superiores, isto é, com três ou mais átomos de carbono. Esses compostos, especialmente os ésteres e aldeídos, são responsáveis pelo aroma e sabor dos destilados em geral (Valsechi, 1960; Aquarone et al., 1983). Para que a bebida apresente um agradável e característico “bouquet”, a fermentação deve ser direcionada de modo a formar uma proporção harmônica de produtos secundários.

Os principais componentes secundários formados durante a fermentação alcoólica são os aldeídos, álcoois e ésteres. Em menores proporções formam-se também cetonas, compostos fenólicos, ésteres, aminas, mercaptanas. Outros compostos presentes na fermentação contêm mais de um grupo funcional correspondentes a diferentes classes, como no caso de glicerol, 2,3-butanodiol, acetoina, ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido succínico, etc (Maia, 1994).

Furtado (1995) identificou 10 componentes em cachaça recém-destilada por cromatografia gasosa, e encontrou os seguintes compostos: acetaldeído,

acetato de etila, metanol, etanol, n-propanol, 2-butanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico e ácido acético. Boza & Horii (1998), também identificaram, em amostras de aguardente industrial por cromatografia gasosa, aldeído acético, acetona, acetato de etila, n-propanol, metanol, dentre outros.

Nonato (1999) identificou 38 compostos através da micro extração em fase sólida em uma das amostras de Cachaça produzida por fermentação espontânea, analisando a bebida envelhecida. Gomes (2002), utilizando a mesma técnica porém com cachaças recém-distiladas e não submetidas ao envelhecimento, identificou entre 13-14 compostos.

Cachaças classificadas por suas características organolépticas, como de boa qualidade, apresentam somente os álcoois n-propanol, isobutanol e isoamílico, Almeida & Barreto (1972). Faria (1996) descreveu que entre os compostos quantificados, apenas o propanol apresentou correlação estatisticamente significativa com os atributos de sabor e de impressão global. Boza & Horii (1998) verificaram que a qualidade sensorial era diretamente proporcional à concentração de álcoois superiores e inversamente proporcional aos teores de n-propanol e de acidez. Oliveira (2001) verificou que a adição de fubá de milho no processo fermentativo, além de reduzir a concentração do n-propanol, diminui também a acidez total da cachaça.

A legislação brasileira atual diz que as quantidades de impurezas totais, excluindo-se o etanol, em aguardentes de cana-de-açúcar devem estar dentro dos limites de 200 mg a 650 mg de impureza para cada 100 mL de álcool anidro. O teor de glicerol na bebida pode chegar a 10% da concentração de etanol, e os demais compostos secundários estão geralmente inferiores a 0,1% dessa concentração. A soma dos componentes voláteis (aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e álcoois superiores) não pode ser inferior a 200mg/100mL de álcool anidro (Cardoso, 2001).

Os métodos analíticos usuais não identificam separadamente cada substância, mas o peso total do conjunto de substâncias pertencentes a determinada classe funcional; desta maneira todos os aldeídos presentes são dosados pelo teor equivalente em acetaldeído, ácidos em ácido acético e os ésteres presentes em acetato de etila. Porém os álcoois têm dosagens específicas, analisando separadamente metanol e álcoois superiores cujo teor equivalente é expresso em álcool isoamílico, analisando, também separadamente, entre os aldeídos, o conteúdo de furfural (Suomalainen, 1979).

### Álcoois superiores

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo oxidativo são vulgarmente conhecidos como óleo fusel. São provenientes, geralmente, de reações de degradação de aminoácidos que ocorrem durante o processo de fermentação, ou pelas vias de degradação do próprio açúcar, dentro das leveduras.

A formação dos álcoois superiores também pode ser influenciada por variáveis, tais como: concentração de aminoácidos e pH do meio reacional, geralmente abaixo de 4,0, chegam a aumentar a produção de álcoois superiores em até 80%; temperatura muito alta de fermentação pode aumentar a produção de óleo fusel em até 40%; como também o nível de inoculação e intervalo de tempo entre a fermentação e a destilação (Crowell et al., 1961; Ayrapaa, 1970; Engan, 1970). Um outro fator que contribui com o aumento desses álcoois se refere ao armazenamento de cana para posteriormente ser moída, como também a utilização da ponta da cana que é rica em aminoácidos, os quais aumentam a produção de álcoois superiores.

Álcoois superiores contendo três a cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos, freqüentemente, encontrados em bebidas destiladas, como: butanol, glicerol, isopropanol, 3-metil-propanol, 2,3-butanodiol, álcool

amilico, álcool isoamilico. Os álcoois amilico, propílico e respectivos isômeros originam o odor da bebida, possuindo aromas característicos.

Os álcoois com mais de cinco átomos de carbono geralmente apresentam um aspecto oleoso, alguns deles com odores similares aos encontrados nas flores. O isopropanol não é produzido por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ocorrer no mosto como produto da ação de bactérias contaminantes, tal como o *Clostridium* (Novaes et al., 1974; Borzani et al., 1975 e Piggott et al., 1989).

O metanol é um álcool indesejável em bebidas alcoólicas. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, em longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte. Durante o processo de produção de cachaça o metanol pode ser formado pela degradação da pectina ou pela atividade microbiana (Cardoso, 1998).

### Glicerol

O glicerol é um poliálcool formado na via glicolítica, pela grande maioria dos microrganismos fermentadores. De maneira geral, a molécula de glicerol resulta da redução e desfosforilação da diidroxiketona-fosfato, originada da cisão da molécula de frutose 1,6-bifosfato pela enzima aldolase (Rose, 1978; Vogt et al., 1984; Berry & Brown, 1987; Lehninger et al., 2000).

Um dos aspectos interessantes da produção de glicerol é que ele está envolvido com a regulação da produção de etanol. Em condições normais de crescimento, a maioria da glicose assimilada por *Saccharomyces cerevisiae* é convertida em etanol. Nesse processo, o  $\text{NAD}^+$  é primeiramente reduzido a NADH, que será reoxidado durante a redução do acetaldeído para formação de etanol. Uma pequena porção de NADH é desviada e usada na redução da diidroxiketona-fosfato a glicerol-fosfato, o qual é desfosforilado e gera glicerol. Por um mecanismo de retroalimentação, devido ao excesso de etanol, pode

haver um desvio de rota e o NADH formado será utilizado para formação de glicerol, ao invés de etanol (Spencer & Spencer, 1978; Berry & Brown, 1987; Myers et al., 1997; Flikweert et al., 1997; Remize et al., 1999).

Uma característica importante do glicerol é sua capacidade de agir como um metabólito osmoregulador no meio fermentativo, pois, em meio com baixa atividade de água, a sua produção sofre um aumento determinado pela presença de sais e açúcares. Essa propriedade aumenta a capacidade da levedura de resistir às taxas mais elevadas de solutos (Jovall et al., 1990; Tokuoka, 1993).

### Aldeídos

Os aldeídos são compostos muito voláteis, de odor penetrante, que afetam o aroma das bebidas alcoólicas, são intermediários da formação dos álcoois formados pela descarboxilação de oxiácidos, ou então, pela oxidação destes álcoois.

Os aldeídos de até oito átomos de carbono têm aromas penetrantes, geralmente enjoativos e são considerados indesejáveis em bebidas destiladas; porém os aldeídos com mais de dez átomos de carbono apresentam aroma agradável (Maia, 1994). Durante a destilação, uma grande parte dos aldeídos presentes no vinho é separado como composto integrante da porção cabeça.

O principal aldeído associado à fermentação alcoólica é o acetaldeído. Em fermentações, normalmente, esse composto é resultado da ação de leveduras durante estágios preliminares desse processo, aparecendo durante as primeiras horas, mas tende a diminuir, podendo praticamente desaparecer no estágio final da fermentação, quando a aeração do mosto nas últimas horas de fermentação é minimizada (Cleto, 1997) ocorrendo a oxidação a ácido acético (Cardoso, 2001).

Os demais aldeídos são obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de álcoois superiores provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas. Embora alguns deles possam ter aroma agradável, não é

conveniente favorecer tal degradação, pois ela é geralmente acompanhada de reações que propiciam a formação de mercaptanas pela degradação dos aminoácidos cistina e cisteína, possuindo aroma extremamente desagradável (Cleto, 1997).

O furfural e o hidroximetilfurfural não são formados durante a fermentação, esses aldeídos podem estar presentes no caldo de cana quando a colheita é precedida da queima da folhagem, o que acarreta a desidratação parcial de pequena fração dos açúcares presentes na cana-de-açúcar. Quando nesse processo estão envolvidas as pentoses (presentes na hemicelulose oriunda do bagaço de cana) sua desidratação parcial leva a produção do 2-furfuraldeído ou furfural; se a desidratação ocorre sobre moléculas de hexoses, tais como a glicose, que estão presentes na forma livre ou ligada no caldo de cana, forma o composto 5-hidroximetil-2-furfuraldeído ou hidroximetilfurfural (Cleto, 1997).

### Ésteres

Os ésteres, geralmente, são formados através de reações de esterificação entre os álcoois e ácidos carboxílicos, formados durante o processo oxidativo. O acetato de etila é o principal éster encontrado na cachaça, formado quando uma pequena parte do etanol reage intracelularmente com o ácido acético; da mesma maneira, outros álcoois produzidos intracelularmente reagem, em parte, com o ácido acético, formando outros ésteres (Maia, 1994).

O acetato de etila corresponde a cerca de 89% do conteúdo total de ésteres de Cachaça, e é responsável, quando presente em pequenas porções na bebida, pela incorporação de um aroma agradável de frutas, desejável em bebidas destiladas. Entretanto, em grandes quantidades esse composto confere à Cachaça um sabor enjoativo e indesejado (Cardoso, 1998).

De acordo com Maia (1994), o aroma de ésteres é mais acentuado quando o álcool que os compõe é de baixo peso molecular. Além disso, cada

éster tem seu aroma peculiar. Os acetatos de etila e de butila apresentam aroma frutado, acetato de isoamila e o butirato de amila têm aroma de banana, enquanto que os acetatos de álcoois maiores têm aroma cítrico, só que menos pungente do que os ésteres de álcoois menores.

Reações de esterificação também podem ocorrer durante o envelhecimento da bebida, porém em uma velocidade bem menor, requerendo de vários meses a anos, para equiparar-se ao teor produzido intracelularmente (Maia, 1994).

### Ácidos

Os ácidos fórmico, acético e láctico, oriundos do metabolismo microbiano contaminante durante o processo fermentativo do caldo de cana-de-açúcar, podem provocar a formação de sabores indesejáveis no produto final resultantes das atividades microbianas.

O ácido láctico se forma devido à presença de bactérias formadoras do ácido láctico, que atacam os açúcares e os álcoois superiores. O ácido acético, que também se forma ao lado do aldeído acético, tem sua origem na atividade vital das células de certos microrganismos. Segundo Maia (1994), o ácido acético é um co-produto normal da fermentação alcoólica realizada pela *Saccharomyces cerevisiae*, sendo favorecida sob condições rigorosas de assepsia, durante um período de tempo prolongado. Na presença de oxigênio, podem-se converter até 30% do açúcar em ácido acético; na ausência do mesmo, *Saccharomyces cerevisiae* produz apenas pequenas quantidades de ácido acético.

Mesmo nas melhores fermentações, uma pequena parte do açúcar se converte em ácido acético, que pode aparecer no mosto fermentado em níveis de até 0,8 g de ácido acético por litro, ou um pouco mais. A aeração do mosto durante a fermentação pode acarretar conversão de até 30% do açúcar em ácido acético, mesmo que não haja contaminação por bactérias acéticas (Maia, 1994).

Segundo Faria (1989), além do ácido acético podemos observar, também, a formação de vários outros ácidos carboxílicos mais pesados, formados pela oxidação dos componentes secundários da cabeça (álcoois e aldeídos superiores), tais como ácido cítrico, pirúvico, málico, maléico, oxalacético e outros, associados à degradação de açúcar. A grande maioria destes ácidos fica, geralmente, retida no vinhoto durante a etapa de destilação. Existem ainda os ácidos graxos que são produzidos durante o período de aeração do pé-de-cuba, onde as leveduras iniciam uma intensa produção destes, que serão destinados à sua reprodução celular.

Em proporções bem menores formam-se os ácidos butirico, capríco, caprílico e cáprico, associados à mudança do mosto da fase de propagação para a fase de fermentação, os quais, durante a fermentação, têm efeito tóxico, sendo um dos motivos da perda de viabilidade celular (Maia, 1994).

### Metais

Os metais que se encontram presentes na bebida são o lítio, sódio, potássio, magnésio, alumínio, manganês, ferro, cobre, cromo, níquel, zinco, cádmio, mercúrio, chumbo e o cobalto; como também os ácidos minerais sulfúrico, clorídrico e 'azinhavre' ( $\text{Cu CO}_3$ ,  $\text{Cu (OH)}_2$ ), sendo que a concentração média destes metais, segundo a legislação brasileira, é de no máximo 5 mg/L.

A quantificação de metais em cachaça é efetuada com diversas finalidades, sendo a mais importante a verificação da presença de espécies metálicas em níveis tóxicos, atendendo às especificações exigidas pela legislação. A presença de cátions, tais como os dos metais Cu, Fe e outros, sob condições favoráveis, podem precipitar na forma de sais, tornando o destilado turvo, que deprecia economicamente o produto em questão (Rose & Harrison, 1970).

O cobre é um elemento encontrado na constituição do material utilizado na construção de alambiques. Este metal contribui na eliminação de determinados odores desagradáveis, observados em cachaça destilada em alambique confeccionado com materiais onde não está presente este metal, tal como aço inox. Este elemento, de acordo com a legislação competente, pode estar presente na cachaça na quantidade de 5 mg/L. Normalmente a cachaça apresenta teores de cobre maior do que aqueles encontrados nos vinhos, já que este metal provém dos destiladores. O cobre também ocorre nos solos, mas apenas, em pequenas quantidades, podendo ocorrer contaminação pelo uso incorreto de agrotóxicos cúpricos (Faria, 1989).

A contaminação da bebida pelo cobre se deve à formação de carbonato de cobre na superfície do metal, que é solubilizado pelos vapores ácidos produzidos durante a destilação e, por arraste, conduz à contaminação do produto final por íons de cobre (Cardoso, 2001).

### **Envelhecimento**

O envelhecimento da cachaça é feito em barril de madeira, cujas características naturais proporcionarão uma bebida de melhor qualidade, através do enobrecimento do produto. A madeira é composta por inúmeros polímeros que são originados de um monômero básico que é a glicose, dentre eles estão celulose, hemicelulose e lignina; esses polímeros complexos serão entrelaçados, formando a parede celular da madeira. A deposição de taninos, gorduras, resinas e carboidratos formará o cerne. Estas substâncias determinarão a qualidade da madeira, resultando em sua melhor utilização ou uso final, tanto no envelhecimento, quanto na construção de barris (Mendes et al., 2001).

A cachaça recém destilada é transparente e etérea, porém adquire uma tonalidade vanilada após envelhecimento em barril de madeira, na qual, de um a dois anos, pode-se perceber o odor típico de madeira e tonalidade acentuada,

embora o paladar torna-se mais adstringente devido aos taninos provenientes da madeira. De acordo com Maia (1994) com três anos de envelhecimento o odor desta bebida torna-se harmonioso e arredondado.

Para que ocorram as transformações químicas associadas ao processo de maturação e envelhecimento, a cachaça deve passar por alguns processos como: reações entre os compostos secundários provenientes da destilação; extração direta de componentes da madeira; decomposição de macromoléculas da madeira como: lignina, celulose, hemicelulose e sua incorporação na bebida; transformações dos materiais extraídos da madeira; reações de compostos voláteis através da madeira do barril e formação de complexos moleculares estáveis entre os compostos secundários e água e/ou etanol (Piggott, 1989).

Devido à evaporação de água e etanol durante o envelhecimento, que pode representar de 1 a 3% do volume armazenado, pode-se observar um aumento global no teor de componentes secundários. Uma fração do etanol é oxidada a acetaldeído, conduzindo a formação de ácido acético que, por sua vez, juntamente com o etanol, leva à formação de acetato de etila, correspondendo a 80% do total de ésteres encontrados na bebida, seguido de outros que podem aumentar durante o envelhecimento, como caprilato, caprato e laurato de etila (Puech, 1983; Rigott, 1989).

Durante o envelhecimento, segundo Mendes et al. (2001), observa-se que a acidez fixa varia pouco, como também os teores de álcoois superiores mantêm-se praticamente estáveis; porém, os teores de aldeídos voláteis diminuem com o tempo, uma vez que o arredondamento do aroma da cachaça deve-se à oxidação de aldeídos a ácidos e reações entre ácidos e álcoois, formando os ésteres.

Em bebidas armazenadas em barril de madeira ocorre um aumento progressivo no teor de extrato seco, observando que taninos e compostos fenólicos provenientes da lignina chegam a representar 40%. Em barril de

carvalho, segundo Maia (1994), foram identificados vários aldeídos e ácidos fenólicos como vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, gálico, potocatéquico, p-hidroxi-benzóico, p-cumárico, cinâmico, siringico e vanílico. Os ácidos vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, são formados devido a alcoólise ácida sofrida pela lignina à temperatura ambiente. Devido à oxidação da dupla ligação o sinapaldeído converte-se em siringaldeído, como também o coniferaldeído converte-se em vanilina ou em ácido ferúlico pela oxidação do aldeído (Mendes et al., 2001).

O envelhecimento entre 5 a 10 anos conduz a compostos que caracterizam cachaça, como diminuição do teor de metanol acompanhado pelo aumento dos teores de acetato de etila, acetaldeído, 1,1-dieroximetano. Mendes et al. (2001) citam que durante o envelhecimento observa-se também a formação de ésteres de álcoois superiores, acetato de isobutila e acetato de isoamila. Devido à oxidação de ácidos graxos, acompanhado de descarboxilação, formam-se metilcetonas, as quais em níveis de 0,5 mg/ L permitem numa evolução para o ranço em cachaça velha.

### **Aspectos toxicológicos**

Alguns elementos presentes na cachaça são responsáveis por inúmeros comprometimentos à saúde humana, sendo necessário conhecê-los mais detalhadamente, objetivando suas respectivas relações quanto à presença, concentração, como também em qual fase da fabricação da bebida estão presentes.

Algumas substâncias encontradas na cachaça apresentam alto teor de toxicidade, dentre elas estão o formaldeído e carbamato de etila, produtos que são carcinogênicos. Dentre os narcóticos estão o acetaldeído, benzaldeído; os que são responsáveis pela dor de cabeça, como furfural, acetona, metanol, álcool isoamílico, o propanol que possui ação depressiva e o ácido acético que causa

corrosão dos tecidos orgânicos. Estes componentes fazem parte da fração orgânica da bebida e podem ser influenciados pela cana-de-açúcar, pela fermentação, pela destilação e pelo envelhecimento (Siebald et al., 2002).

Buscando minimizar a toxicidade da bebida, tornam-se necessários alguns procedimentos que devem ser tomados pelos produtores de cachaça: como evitá-la e não corrigi-la manipulando o produto final; conhecer as fontes responsáveis pelos fatores toxicológicos; controlar a natureza química e os teores das espécies indesejáveis em todas as fases do processo e controlar o processo de separação das frações cabeça, coração e cauda durante a destilação.

### **Metabolismo de leveduras**

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, caracteristicamente esféricas ou ovais, pertencentes às divisões Ascomycota e Basidiomycota, cuja multiplicação ocorre por fissão binária, como *Schizosaccharomyces*, ou por brotamento, como por exemplo no caso de *Saccharomyces*.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada em processos de fermentação alcoólica, pois suporta níveis de etanol em torno de 12 a 15% (considerado elevado), hidrolisa oligossacarídeos, tais como maltotriose e maltotrealose, em glicose convertendo-a em etanol, como também tolera alta concentração de açúcar sendo osmotolerante (Belin, 1995).

Um dos fatores limitantes para a alta concentração de etanol produzido pelas leveduras é a deficiência nutricional da matéria-prima e não da toxicidade do etanol (Casey et al., 1983) como no caso da produção de cerveja. Se os requisitos nutricionais forem supridos, poderá ser observado um aumento no rendimento da fermentação alcoólica e um acréscimo na concentração final de etanol. De acordo com Maia et al. (1993), em Minas Gerais tem sido utilizado o

enriquecimento do caldo de cana com farinha de milho, farelo de arroz e/ou soja, o que favorece a viabilidade celular das leveduras.

A concentração de açúcar no caldo deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada à propagação do microrganismo que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a 2 – 3% (m/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula e impedem um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada à fermentação propriamente dita, ou seja, conversão do açúcar a etanol e CO<sub>2</sub>. De acordo com Schwan & Castro (2001), nesta etapa o teor máximo de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15% (m/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo. Concentrações de açúcares superiores a 15% podem inibir a atividade celular e favorecerem o acúmulo de glicogênio, acarretando uma diminuição no rendimento alcoólico (Maia et al., 1993; Walker, 1998).

Nem todo o açúcar presente no mosto é transformado em etanol. Uma parte é normalmente consumida pelas leveduras, permitindo sua reprodução celular e mantendo suas funções vitais normais. Os nutrientes adicionados permitem que a maior fração possível de açúcar seja convertida em novas células na fase de multiplicação, ou em etanol, durante a fase de fermentação, deixando uma fração mínima destinada à manutenção celular (Maia et al., 1995).

Para que ocorra uma multiplicação vigorosa das células é necessário que as exigências nutricionais das leveduras sejam supridas, permitindo assim a reprodução e garantindo a viabilidade celular (Schwan & Castro, 2001). Dentre os nutrientes requeridos pelas leveduras, e freqüentemente presentes na cana em quantidades insuficientes, encontram-se substâncias minerais e orgânicas. As substâncias orgânicas requeridas são as vitaminas e ácidos graxos insaturados que são responsáveis pela manutenção da fisiologia celular e conseqüentemente

pelo aumento da produtividade (Lima, 2001). Alguns substratos são usados tradicionalmente no fermento em Minas Gerais, como o fubá de milho, farelo de arroz e algumas vezes o farelo de soja de acordo com receitas próprias da cada produtor, mas mantendo características típicas das diferentes regiões do Estado (Pataro et al., 1998).

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Se for dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e  $\text{CO}_2$ .

✂ No mosto aerificado a levedura se reproduz muito rapidamente, empregando a energia obtida pela metabolização de parte dos açúcares existentes no meio. Nessa fase não ocorre a formação do álcool, pois a levedura, tendo muito oxigênio à disposição, oxida o piruvato, formado pela glicólise, no ciclo do ácido cítrico a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Quando todo o oxigênio existente na dorna de fermentação foi consumido, as células da levedura passam a utilizar anaerobicamente o açúcar existente no mosto. A partir deste ponto, a levedura fermenta esses açúcares em etanol e dióxido de carbono. O processo de fermentação é controlado, em parte, pela concentração de etanol que se forma, pelo pH do meio e pela quantidade de açúcar remanescente (Leninger, 1995).

✂ A velocidade da fermentação, assim como a quantidade total de glicose consumida são muitas vezes maior sob condições anaeróbicas do que sob condições aeróbicas, mecanismo conhecido como efeito Pasteur. Isto ocorre porque no processo anaeróbico são produzidas 2 moléculas de ATP e no processo aeróbico são produzidas 36 ou 38 moléculas de ATP. Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, é necessário consumir aproximadamente 18 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que em aeróbicas (Leninger, 1995).

Gancedo & Serrano (1989) detalharam o metabolismo de carboidratos por leveduras, atentando para a preferência das mesmas pelas unidades monoméricas desses compostos. Hammond (1993) complementa que o gênero *Saccharomyces* pode utilizar mais de uma fonte de carbono para proceder à fermentação alcoólica, como maltotriose, sacarose, galactose, maltose, frutose e glicose. Gancedo (1998) relata que, dentre estas fontes carbonadas, a glicose é o metabólito de escolha pela grande maioria das células, sendo considerado um hormônio do crescimento celular.

Uma das formas de ocorrer a fermentação alcoólica parte da degradação de substratos orgânicos carbonados, através da qual cada molécula destes originará duas de ácido pirúvico e quatro de ATP. Nessa reação, as duas moléculas de piruvato são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas de dióxido de carbono por ação de piruvato descarboxilase, que promove uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer o cátion  $Mg^{2+}$  e tem como coenzima a tiamina pirofosfato. Em um segundo passo, o acetaldeído é reduzido a etanol por ação da enzima álcool desidrogenase, tendo o NADH (derivado das atividades da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, quando utilizada a via glicolítica) como fornecedor de elétrons. A piruvato descarboxilase é característica de muitas leveduras, em especial as do gênero *Saccharomyces*, sendo grandes responsáveis pela produção de bebidas alcoólicas e de produtos de panificação (Rose, 1977 e 1978; Vogt et al., 1986; Madigan et al., 1997; Tortora et al., 1998).

As leveduras são capazes de armazenar carboidratos em duas formas distintas: glicogênio (homopolissacarídeo de glicose) e trealose (homodímero de glicose). Estes carboidratos podem chegar a 40% da massa celular seca. Normalmente, os níveis de glicogênio são superiores aos de trealose, quando as células estão em crescimento. Em relação à presença de oxigênio, os níveis de trealose são maiores em aerobiose. Também são maiores quando a célula está

em condições de estresse. A trealose está associada à formação de ascósporos. As vias biossintéticas de trealose e glicogênio são semelhantes, podendo, ambas, ser sintetizadas a partir de UDP-glicose. Quando em condições de estresse (temperatura, osmolaridade, catabólitos) ou falta de nutrientes, as leveduras fazem uso dessas reservas para manter seu metabolismo basal, retomando seu ciclo celular quando as adversidades do ambiente são cessadas. Vários autores, Lillie & Pringle, (1980); Berry & Brown, (1987); Panek, (1991); Alcarde & Basso (1997), observaram que a fermentação de glicogênio e trealose endógenos, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, pode formar até 68 litros de etanol por tonelada de levedura seca. Essa fermentação endógena é uma das formas utilizadas para a manutenção da viabilidade celular.

A função protetora da trealose é resultado da inter-relação entre sua localização e mobilização na célula. Sua presença no citoplasma, onde é acumulada, exerce uma influência na atividade de água do citosol, contribuindo para a desaceleração do metabolismo (latência), aumentando a resistência ao estresse hídrico. Em condições de baixa atividade de água, a trealose na membrana (nos dois lados da camada de fosfolípideo) substitui as moléculas de água, mantendo a integridade da membrana (Basso, 1996).

### **Microrganismos envolvidos na produção de cachaça**

No caso da cachaça, os microrganismos são provenientes do manuseio e transporte de cana, entre outros. O caldo de cana apresenta em sua constituição 65 a 75 % de água, 11 a 18% de açúcares como sacarose, glicose e frutose, substâncias nitrogenadas, pentosanas, ceras, lipídeos, pectinas, materiais corantes como clorofila, antocianinas e compostos polifenólicos e sais minerais, pH ácido 4,8 a 6,0 fazendo com que este caldo seja um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos (Schwan & Castro, 1998).

A microbiota do caldo de cana é constituída de leveduras e bactérias, sendo que constituem de leveduras isoladas e identificadas dos gêneros: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* e *Rhodotorula* (Valsechi, 1960; Maia et al., 1994). De acordo com Morais et al (1997), Pataro et al. (2000) Guerra et al. (2001) e Schwan et al. (2001), as leveduras envolvidas na fermentação do caldo de cana incluem, principalmente, os gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e diversas espécies de *Cândida*; porém, a conversão de açúcar em etanol é realizada principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, devido à capacidade de produzir e tolerar altas concentrações de etanol (Leão & Van Uden, 1982, 1985; Mendonça et al., 1999).

Foi observado que esses microrganismos contribuem para o "flavor" da bebida, mas bactérias causam deterioração no mosto insuficientemente acidificado com pH acima de 4 ou em altas temperaturas, acima de 32 °C.

Entretanto, *Saccharomyces cerevisiae* é o principal agente microbiano de produção de etanol, devido a seu elevado potencial de conversão de mono, di e trissacarídeos em etanol; possui glicogênio e trealose como carboidratos de reserva; capacidade de competição no meio fermentativo, uma vez que produz a toxina "Killer", capaz de eliminar naturalmente os microrganismos competidores por substrato. Esse somatório de características faz com que a mesma tolere condições adversas do meio (Mendonça, 1999).

De acordo com Schwan et al. (2001), durante a fermentação realizada em 24 horas, os microrganismos presentes foram leveduras, bactéria de ácido láctico, bacilos, bactéria de ácido acético e enterobactérias.

As leveduras no início da fermentação multiplicam-se devido à aeração do mosto, e após 10 horas cessa a proliferação, pois o mosto é um meio pobre em nutrientes como nitrogênio e fosfato. A taxa de multiplicação zero demonstra entrada altamente ordenada na fase estacionária; nessa fase as células são mais

resistentes ao estresse, mas ainda convertem açúcar em etanol por mais 6 horas em velocidade mais reduzida.

As bactérias de ácido láctico, grupo mais comum de bactérias encontradas, não conseguem se propagar adequadamente durante a fermentação; os bacilos são provavelmente contaminantes do ambiente que sobraram de esporos remanescentes durante a fermentação; bactérias de ácido acético aparecem no final devido à redução de CO<sub>2</sub> pela levedura; o nível de enterobactérias é baixo e elas não sobrevivem ao processo de destilação.

Devido ao influxo contínuo, novas espécies são desenvolvidas na dorna, provenientes da cana, solo, manuseio; mas a população residente sobrevive devido à adaptação ecológica e fisiológica. *Pichia heimi*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora uvarum*, são sensíveis a elevados níveis de etanol e aparecem só no início da fermentação; *Pichia methanolica* aparece no final e desaparece porque tanto a glicose como o etanol reprimem a rota da álcool oxidase, levando a sua desapareção, *P. subpelliculosa* e *Debaryomyces hansenii* apareceram na fase intermediária (Schwan et al., 2001). A presença de leveduras *non-Saccharomyces* pode indicar uma redução de eficiência do processo e também a dificuldade de padronização do produto final obtido. Pelos resultados obtidos neste trabalho pode-se inferir que o preparo de inóculo com cepas selecionadas reduziram em muito os problemas encontrados pelos produtores quanto ao rendimento e qualidade da cachaça produzida.

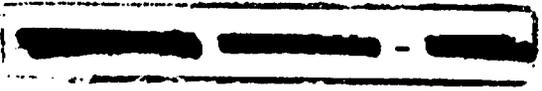
De acordo com Schwan et al. (2001), leveduras com a mesma função fisiológica, porém de espécies diferentes, podem substituir umas as outras, uma vez que a biota local influencia na composição de espécies. Isto determina diferentes sucessões que podem ser encontradas em diversos alambiques em regiões distintas. A presença de leveduras em sucessão é conhecida também em outros processos fermentativos como o do vinho (Fleet, 1984; Fleet et al, 1993) e da tequila (Lachance, 1995).

Schwan et al. (2001) observaram que durante a formação de cultura iniciadora, a atividade microbiana pode promover acidificação e aumentar o conteúdo alcoólico, levando ao desaparecimento de algumas espécies de leveduras. Essas mudanças no conteúdo de álcool e pH, juntamente com a concentração de açúcar, é conservada alta devido à adição diária de caldo de cana que afeta a seleção e prevalência de espécies de leveduras e cepas envolvidas na produção de Cachaça. Tolerância ao etanol e adaptação à alta atividade microbiana podem também ser responsáveis pela persistência de algumas espécies de leveduras e o desaparecimento de outras durante a fermentação.

Pataro et al. (2000) atribuíram o decréscimo na população de *Saccharomyces cerevisiae* à falta de nutrientes adicionados durante a formação de culturas iniciadoras, à alta temperatura na doma de fermentação, especialmente no final da produção, relacionado ao período de verão e à presença de metabólitos secundários, os quais podem inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo Gomes et al. (2002), linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* foram capazes de permanecer dominando a fermentação por até 30 dias consecutivos; após esse período, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* apresentaram populações iguais ou superiores às das linhagens iniciadoras testadas. Portanto, com trocas periódicas do fermento, utilizando linhagens selecionadas, pode-se manter o padrão de qualidade da cachaça ao longo da safra e entressafras diferentes.

As populações bacterianas normalmente encontradas são diversas e podem apresentar uma variação de até 3400 vezes na proporção entre leveduras e bactérias (3400 leveduras: 1 bactéria). A maior porcentagem de bactérias presentes são de bactérias Gram-positivas (Santos Júnior et al., 1998; Negrão et al., 1999). De acordo com Schwan, R.F. (dados não publicados), o gênero



*Lactobacillus* representou, em um estudo, 71% do total de Gram-positivas e 24% foram do gênero *Bacillus*. Dentre as bactérias isoladas e identificadas destacam-se as produtoras de ácido láctico: *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* e *Streptococcus* spp.

As bactérias produtoras de ácido láctico foi o grupo de bactérias encontrado em populações maiores, apesar de não terem sido capazes de se multiplicar durante o processo fermentativo (Schwan et al., 2001). As bactérias lácticas podem se multiplicar no final do processo fermentativo, utilizando o etanol formado como fonte de energia. A presença dessas bactérias no mosto é devido à resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. No final do processo fermentativo, as bactérias do ácido láctico podem produzir compostos secundários, principalmente ácidos, que vão aumentar os níveis de acidez da cachaça. Normalmente, não é aconselhável que a destilação ocorra horas depois que todo o açúcar tenha sido consumido pelas leveduras. Se a destilação é feita após um longo período em que os açúcares do mosto tenham sido consumidos, os níveis de acidez da cachaça tendem a ser elevados (Pataro et al., 2002).

De acordo com Pataro et al. (2002) vinhos (mosto) com acidez acima de 600 mg/100mL de ácido acético, proporcionam que populações de bactérias do ácido láctico aumentem acentuadamente; portanto, vinhos com acidez entre 300 e 500 mg/100mL álcool anidro apresentam baixas contagens de bactérias do ácido láctico.

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Pediococcus* podem ser responsáveis pela produção de compostos secundários indesejáveis (Narendranath et al., 1997). A fermentação malolática é uma fermentação secundária em vinhos, na qual o L-ácido málico é degradado a L-ácido láctico e dióxido de carbono. A fermentação malolática geralmente ocorre após as leveduras terem completado a fermentação primária alcoólica e é importante para a desacidificação de vinhos altamente ácidos (Osborne et al., 2000). Em

uma destilaria no sul de Minas, as bactérias do gênero *Bacillus* foram provavelmente contaminantes do campo e permaneceram na forma de esporos no decorrer da fermentação. As populações de bactérias Gram-negativas ocorreram em menor número e somente após 16 horas do início do processo. Foram identificadas as seguintes espécies: *Acetobacter aceti* produtora de ácido acético e espécies de *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Serratia*, Schwan et al (dados não publicados). As bactérias acéticas também são normalmente encontradas em fermentações de outras frutas, como o vinho, e estão associadas à diminuição da atividade das leveduras, o que pode proporcionar a entrada de oxigênio no mosto fermentante e conseqüentemente permitir o desenvolvimento de bactérias estritamente aeróbicas (Joyeux et al., 1984).

A contaminação bacteriana é uma das principais causas da redução na produção de etanol durante fermentações desenvolvidas por *S. cerevisiae*. No caso da produção de uísque, a contaminação bacteriana pode comprometer a qualidade do destilado e reduzir a produção final do produto. Não existe ainda uma correlação exata sobre a contaminação bacteriana e a perda de álcool produzido, embora seja óbvio que cada molécula de açúcar utilizada na produção do ácido lático pelas bactérias resulte na perda de duas moléculas de etanol (Narendranath et al., 1997). No caso da produção de cachaça artesanal, existem poucos dados a respeito da caracterização das populações bacterianas presentes nas dornas de fermentação, e a relação desses microrganismos com a produção de compostos secundários, responsáveis pelo 'flavor' da bebida. Algumas características que podem comprometer o padrão de qualidade da aguardente, como a acidez elevada, podem estar relacionadas à presença de um número elevado de bactérias no mosto durante a fermentação (Pataro et al., 2002).

## Seleção de microrganismos

Para que ocorra a seleção de um determinado microrganismo, vários fatores são levados em conta para que este seja submetido à fermentação de um substrato que originará um produto comercial. Dentro desses fatores podem ser citados; a taxa de crescimento celular, correlacionada à produção de biomassa; a viabilidade do microrganismo durante o processo; a estabilidade do mesmo ante à diversidade do meio a fermentar e o rendimento de metabólitos de interesse, produzidos pelo microrganismo, a partir do substrato inicial (Dias, 2001).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma das espécies de levedura mais utilizada em fermentações industriais: leveduras de panificação (uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* prensadas), produção de vinho (incluindo cepas floculantes para a produção de cidra), 'sake', produção de álcool de amido ou cereal, e produção de bebidas alcoólicas em geral (Kurtzman & Fell, 1998).

O melhoramento da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas. A identificação das leveduras associadas à produção de cachaça é importante para determinar o papel desses microrganismos nos vários estágios das fermentações, buscando a tipificação tecnológica para o desenvolvimento de linhagens iniciadoras. As leveduras, especialmente dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, são responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto, e têm sido detectadas, em proporções bem variadas, em mostos naturais de produtores mineiros (Pataro et al., 1998; Pataro et al., 2000; Schwan et al., 2001). A qualidade da bebida está fortemente relacionada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante o processo de fermentação e maturação, sendo determinantes tanto do rendimento em etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários. Essa escolha implica no conhecimento de suas características, as quais tornam-

diferentes cromossomos de 245 Kb a 2200 Kb, neste método de cariotipagem, a eletroforese é feita com a aplicação de força elétrica (campo elétrico), alternada ou contínua no gel de agarose, forçando o DNA a se reorientar a cada carga do campo. Moléculas longas podem levar mais tempo para se reorientar, e por essa razão movem-se mais lentamente (Fialho, 2000).

Segundo Gomes et al. (2002), linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* foram capazes de permanecer dominando a fermentação por até 30 dias consecutivos; após este período, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* apresentaram populações iguais ou superiores às das linhagens iniciadoras testadas. Portanto, com trocas periódicas do fermento, utilizando linhagens selecionadas, pode-se manter o padrão de qualidade da cachaça ao longo da safra e entressafras diferentes.

## Seleção de microrganismos

Para que ocorra a seleção de um determinado microrganismo, vários fatores são levados em conta para que este seja submetido à fermentação de um substrato que originará um produto comercial. Dentro desses fatores podem ser citados; a taxa de crescimento celular, correlacionada à produção de biomassa; a viabilidade do microrganismo durante o processo; a estabilidade do mesmo ante à diversidade do meio a fermentar e o rendimento de metabólitos de interesse, produzidos pelo microrganismo, a partir do substrato inicial (Dias, 2001).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma das espécies de levedura mais utilizada em fermentações industriais: leveduras de panificação (uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* prensadas), produção de vinho (incluindo cepas floculantes para a produção de cidra), 'sake', produção de álcool de amido ou cereal, e produção de bebidas alcoólicas em geral (Kurtzman & Fell, 1998).

O melhoramento da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas. A identificação das leveduras associadas à produção de cachaça é importante para determinar o papel desses microrganismos nos vários estágios das fermentações, buscando a tipificação tecnológica para o desenvolvimento de linhagens iniciadoras. As leveduras, especialmente dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, são responsáveis pela fermentação alcóolica do mosto, e têm sido detectadas, em proporções bem variadas, em mostos naturais de produtores mineiros (Pataro et al., 1998; Pataro et al., 2000; Schwan et al., 2001). A qualidade da bebida está fortemente relacionada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante o processo de fermentação e maturação, sendo determinantes tanto do rendimento em etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários. Essa escolha implica no conhecimento de suas características, as quais tornam-

---

taxonomia, como pode ser observado na habilidade de fermentar açúcares, nos casos de *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Capacidade de assimilar nitrato, como *Pseudozyma*, *Citeromyces* e *Wickerhamiella* (Mendonça, 1999).

A seleção de microrganismos em laboratório consta de amostragem na qual, por isolamento, se obtêm leveduras que passam por uma bateria de testes bioquímicos, morfológicos e moleculares. De acordo com Schwan et al. (2001), os isolados que foram identificados por testes tradicionais como *Saccharomyces cerevisiae*, foram submetidos a testes de identificação molecular por PCR. De acordo com Schwan et al. (2001) cepas selecionadas de *S. cerevisiae* predominantes em escala de laboratório e testadas em alambique comercial, foram bastante resistentes à competição com outros microrganismos e com outras linhagens de *S. cerevisiae*, como também possibilitou um aumento na produtividade do alambique, melhorando a qualidade do produto final obtido, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores.

Um número de diferentes técnicas baseadas na detecção do polimorfismo de DNA, como análises de PFGE, PCR e restrição de fragmento do comprimento de polimorfismo de DNA mitocondrial (mtDNA – RFLP) tem sido

se possíveis através de diversos testes que permitem identificar essas propriedades, possibilitando assim uma coleção de cepas com características que visam à melhor produção.

De acordo com Pataro et al. (2002), alguns produtores de cachaça utilizam fermento de panificação para acelerar a formação do fermento iniciador. No entanto, esta não seria uma prática recomendável, pois a levedura de padaria foi selecionada para a panificação e não para a produção de cachaça. Foi verificado que, em fermentações com fermento de padaria, *Saccharomyces cerevisiae* permaneceu no máximo por 20 dias da preparação do fermento (pé-de-cuba), devido a linhagens de *S. cerevisiae* selvagens serem inoculadas diariamente com o caldo de cana, dominando o processo.

Linhagens selecionadas deverão apresentar elevada tolerância ao etanol, apresentando um bom rendimento final. O etanol torna-se inibidor a altas concentrações, e a tolerância das leveduras é um ponto crítico para uma produção elevada deste metabólito primário. A tolerância ao etanol varia consideravelmente de acordo com as linhagens de leveduras. De modo geral, o crescimento cessa quando a produção atinge 5% de etanol (v/v), e a taxa de produção é reduzida a zero, na concentração de 6% a 10% de etanol (v/v). Uma das ações do etanol é desestruturar a fração lipídica da membrana celular (Ward, 1991; Kunkee & Bisson, 1993).

Um outro fator do micro-ambiente ao qual está sujeita a levedura, e que é extremamente relevante em um processo fermentativo, é a temperatura na qual a relação metabólito formado por substrato de partida seja a maior possível. A depender da temperatura, um mesmo microrganismo consome uma mesma

diferentes cromossomos de 245 Kb a 2200 Kb, neste método de cariotipagem, a eletroforese é feita com a aplicação de força elétrica (campo elétrico), alternada ou contínua no gel de agarose, forçando o DNA a se reorientar a cada carga do campo. Moléculas longas podem levar mais tempo para se reorientar, e por essa razão movem-se mais lentamente (Fialho, 2000).

Segundo Gomes et al. (2002), linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* foram capazes de permanecer dominando a fermentação por até 30 dias consecutivos; após este período, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* apresentaram populações iguais ou superiores às das linhagens iniciadoras testadas. Portanto, com trocas periódicas do fermento, utilizando linhagens selecionadas, pode-se manter o padrão de qualidade da cachaça ao longo da safra e entressafras diferentes.

## Seleção de microrganismos

Para que ocorra a seleção de um determinado microrganismo, vários fatores são levados em conta para que este seja submetido à fermentação de um substrato que originará um produto comercial. Dentro desses fatores podem ser citados; a taxa de crescimento celular, correlacionada à produção de biomassa; a viabilidade do microrganismo durante o processo; a estabilidade do mesmo ante à diversidade do meio a fermentar e o rendimento de metabólitos de interesse, produzidos pelo microrganismo, a partir do substrato inicial (Dias, 2001).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma das espécies de levedura mais utilizada em fermentações industriais: leveduras de panificação (uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* prensadas), produção de vinho (incluindo cepas floculantes para a produção de cidra), 'sake', produção de álcool de amido ou cereal, e produção de bebidas alcoólicas em geral (Kurtzman & Fell, 1998).

O melhoramento da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas. A identificação das leveduras associadas à produção de cachaça é importante para determinar o papel desses microrganismos nos vários estágios das fermentações, buscando a tipificação tecnológica para o desenvolvimento de linhagens iniciadoras. As leveduras, especialmente dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, são responsáveis pela fermentação alcóolica do mosto, e têm sido detectadas, em proporções bem variadas, em mostos naturais de produtores mineiros (Pataro et al., 1998; Pataro et al., 2000; Schwan et al., 2001). A qualidade da bebida está fortemente relacionada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante o processo de fermentação e maturação, sendo determinantes tanto do rendimento em etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários. Essa escolha implica no conhecimento de suas características, as quais tornam-

se possíveis através de diversos testes que permitem identificar essas propriedades, possibilitando assim uma coleção de cepas com características que visam à melhor produção.

De acordo com Pataro et al. (2002), alguns produtores de cachaça utilizam fermento de panificação para acelerar a formação do fermento iniciador. No entanto, esta não seria uma prática recomendável, pois a levedura de padaria foi selecionada para a panificação e não para a produção de cachaça. Foi verificado que, em fermentações com fermento de padaria, *Saccharomyces cerevisiae* permaneceu no máximo por 20 dias da preparação do fermento (pé-de-cuba), devido a linhagens de *S. cerevisiae* selvagens serem inoculadas diariamente com o caldo de cana, dominando o processo.

Linhagens selecionadas deverão apresentar elevada tolerância ao etanol, apresentando um bom rendimento final. O etanol torna-se inibidor a altas concentrações, e a tolerância das leveduras é um ponto crítico para uma produção elevada deste metabólito primário. A tolerância ao etanol varia consideravelmente de acordo com as linhagens de leveduras. De modo geral, o crescimento cessa quando a produção atinge 5% de etanol (v/v), e a taxa de produção é reduzida a zero, na concentração de 6% a 10% de etanol (v/v). Uma das ações do etanol é desestruturar a fração lipídica da membrana celular (Ward, 1991; Kunkee & Bisson, 1993).

Um outro fator do micro-ambiente ao qual está sujeita a levedura, e que é extremamente relevante em um processo fermentativo, é a temperatura na qual a relação metabólito formado por substrato de partida seja a maior possível. A depender da temperatura, um mesmo microrganismo consome uma mesma quantidade de substrato de partida num tempo até dez vezes menor. Um exemplo pode ser tomado no caso da produção de cachaça, cuja fermentação ocorre em 24 h a uma temperatura média de 32 °C, e da produção do vinho

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Leveduras utilizadas e preparo do inóculo

Três cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como RL11, FC9 e CA116, foram avaliadas quanto ao potencial fermentativo. As cepas utilizadas pertencem à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular de Microrganismos (DBI/UFLA), onde foram isoladas durante fermentações em alambiques da região do Sul de Minas Gerais, testadas em laboratório e identificadas por Mendonça (1999) e Fialho (2000). O processo de fermentação foi iniciado com inóculo cuja população era aproximadamente de  $10^8$  células viáveis. mL<sup>-1</sup>.

Para atingir a população inicial de  $10^8$  células viáveis. mL<sup>-1</sup>, as leveduras foram cultivadas em meio YEPG (em g.L<sup>-1</sup>: extrato de levedura, 10,0; peptona de soja, 20,0; glicose 20,0). O fluxograma apresentado na Figura 1 mostra as etapas do processo de multiplicação celular.

O inóculo utilizado para fermentação do caldo de cana durante as bateladas foi preparado no laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Biologia da UFLA. As cepas RL11, CA116 e FC9 foram crescidas em frascos até atingir uma população de  $10^8$  cel.mL<sup>-1</sup>. A partir de 3L de inóculo produzido, este foi levado para dorna de fermentação e acrescentado um volume de 22L de mosto aproximadamente através da alimentação com caldo de cana novo e estéril a 8 °Brix . Após 24 horas foi realizado o corte (divisão de mosto) para a dorna 2 (2ª repetição). Nessa segunda dorna também foi acrescentado ao volume de 11L de mosto proveniente da dorna 1, sendo novamente acrescentado de caldo de cana-de-açúcar novo, estéril a 8 ° Brix da mesma maneira realizada com a dorna 1 durante a multiplicação celular até atingir o volume de 22 L em cada dorna, para então serem utilizados nos

processos fermentativos em sistema de bateladas sucessivas. O experimento foi realizado em duas dornas para confirmação dos resultados, completado o volume de 22 L de mosto em cada dorna, tendo zerado o teor de sólidos solúveis totais (Brix) as células decantaram no fundo da dorna, o sobrenadante (mosto ou vinho) foi descartado e foram processadas as análises microbiológicas do pé-de-cuba de ambas as dornas.

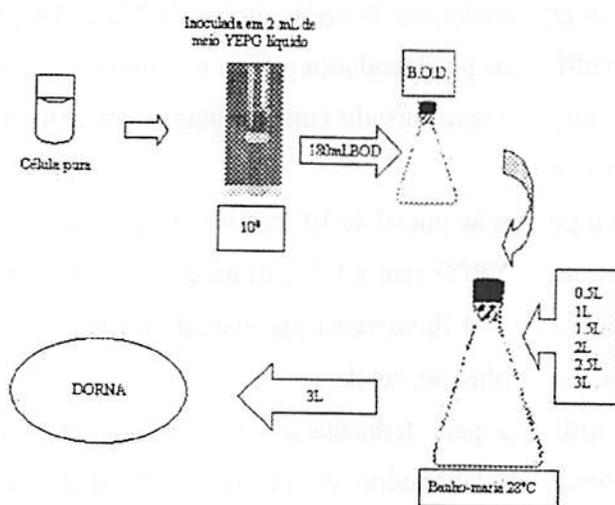


FIGURA 1 Fluxograma do processo de multiplicação.

### 3.2 Sistema de produção de cachaça

#### Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar usada neste experimento pertence à cultivar SP 801816, tardia, originária de uma fazenda produtora de cachaça da cidade de Lavras.

### Dornas

Foram usadas dornas para fermentação de aço inoxidável com capacidade de 25L, dotada de uma abertura no fundo da dorna para facilitar a retirada do fermento após a realização do experimento. Na parede da dorna, em uma altura superior ao pé-de-cuba, era dotada de uma torneira, na qual se recolhia o vinho. As dornas eram cobertas com tela de nylon, para evitar que caísse algum inseto no mosto em fermentação, como pode ser observado na Figura 2.

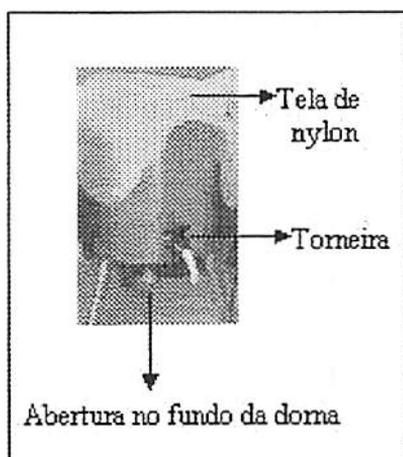


FIGURA 2 Dornas de aço inoxidável, com capacidade de 25 L utilizada para processos fermentativos em escala laboratorial.

### Moagem da cana

A cana-de-açúcar recém cortada foi moída em moenda do tipo queixo duro, da marca COBAR. O caldo de cana foi filtrado e decantado, posteriormente transportado em galão plástico com 75L de caldo. Imediatamente, era feita a leitura do teor de sólidos solúveis no laboratório de Microbiologia Geral (DBI/UFLA), através de um sacarímetro portátil da marca MERCÚRIO, o qual durante todo o experimento foi de 22 °Brix, sendo diluído

com água destilada para 16 °Brix; portanto, para cada litro de caldo adicionava 3 L de água destilada. Após a diluição o caldo de cana foi autoclavado por 15 min a 121 °C, para posterior fermentação.

### **3.3 Coleta das amostras**

As amostras eram recolhidas em tubo de ensaio estéril, sendo amostrados 7 mL do mosto que compunha o pé-de-cuba, para análise microbiológica. As amostras foram recolhidas após a retirada do sobrenadante; portanto, posterior a fermentação, antes de iniciar nova alimentação com caldo de cana nas dornas. 2 mL da amostra eram destinados à análise microbiológica, sendo o restante armazenado em tubos ependorff para análises cromatográficas posteriores, congelados a -20 °C.

### **3.4 Potencial hidrogeniônico (pH)**

O pH das amostras foi determinado através de coleta direta das dornas após cada alimentação, retirada pela torneira das mesmas, coletada em béquer, num volume de 100 mL. O potenciômetro utilizado foi da marca WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten), pH 330i/SET, calibrado com soluções tampão ácida e neutra, com valores de pH, respectivamente, 4.0 e 7.0 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

### **3.5 Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)**

A concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) foi avaliada através de um refratômetro portátil da marca MERCÚRIO.

### 3.6 Processo fermentativo

Após a formação do pé-de-cuba nas dornas, foram iniciadas as fermentações e entre as repetições o inóculo foi reciclado acrescentando-se caldo de cana-de-açúcar novo, estéril, com 16 ° Brix (teor de sólidos solúveis totais).

A fermentação do caldo de cana foi considerada terminada quando as leveduras decantaram no fundo da dorna. Após a retirada do sobrenadante para destilação, as células foram recicladas com adição de novo caldo, diluído em torno de 16 °Brix a uma temperatura de aproximadamente 30 °C.

Foram processadas sete bateladas sucessivas com as cepas iniciadoras RL11 e CA116, com a cepa FC9 foram processadas cinco bateladas devido ao longo período fermentativo apresentado pela mesma, a alimentação das dornas foi realizada com caldo de cana diluído a 16 °Brix. A primeira alimentação do caldo foi realizada à temperatura de 40 °C de modo que aquecesse o mosto para fermentação. A temperatura foi controlada para que dentro da dorna não fosse inferior a 25 °C. A adição do caldo foi lenta levando em média aproximadamente 6 h (variando de 2 a 9 h de abastecimento) e adicionados de forma que o inóculo fosse agitado proporcionando desta maneira uma aeração no mesmo para possível multiplicação celular inicial. Neste experimento não foram estabelecidos os intervalos de alimentação das dornas, tanto quanto o volume adicionado, procurando, portanto, adequar a cepa em experimento a um intervalo fermentativo comum de 24 a 36 h. As fermentações foram realizadas assim que foi esgotado o vinho procedente da multiplicação celular para a formação do pé-de-cuba, o qual constituiu 20% do volume da dorna de 25 L. A levedura iniciadora CA116 foi inoculada após uma semana de intervalo de fermentação com a cepa RL11, tendo sido esterilizadas as dornas de fermentação e realizada a limpeza da sala de fermentação e do alambique; este mesmo processo foi realizado entre as fermentações com as cepas CA116 e FC9.

### **3.7 Análise microbiológica**

Foram realizadas coletas de amostras para as análises microbiológicas do inóculo a cada final do processo fermentativo e antes do início da próxima batelada, visando acompanhar o desempenho da levedura inoculada, quanto a viabilidade celular e dominância no meio fermentativo.

#### **Contagem de células**

Após a coleta das amostras, foi feita, imediatamente, a contagem do número de células viáveis por mL. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se coloração por azul de metileno (Fink & Kuhles, 1993) como indicador da viabilidade celular. Células com metabolismo ativo, viáveis, permanecem incolores, enquanto aquelas com deficiência metabólica ou que estejam inviáveis, ficarão coradas de azul. Um volume da amostra (100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado de igual volume de solução de azul de metileno (azul de metileno, 0,1  $\text{g.L}^{-1}$  e citrato de sódio, 20  $\text{g.L}^{-1}$ ). Em todas as contagens foi necessária uma diluição para facilitar a visualização das células presentes na câmara. A contagem das células foi feita em microscópio óptico de campo claro com aumento de 400 vezes. Foram contados 5 dos 25 quadriculos do quadrante central da câmara de Neubauer (Bio-Rad Laboratories, 1992).

#### **Contagem de células viáveis através de plaqueamento**

De cada amostra foram preparadas diluições decimais em água peptonada estéril (em  $\text{g.L}^{-1}$ : peptona de soja, 10,0; cloreto de sódio, 5,0). O plaqueamento foi feito em meio de cultura complexo, DRBC (em  $\text{g.L}^{-1}$ : peptona de soja, 5,0; glicose, 10,0; fosfato de potássio dibásico, 1,0; sulfato de magnésio, 0,5; dicloran, 0,002; rosa bengala, 0,025; ágar, 15,0). As placas inoculadas foram incubadas em B.O.D. por 48 h a 28 °C. Após este intervalo de incubação foi realizada contagem e caracterização morfológica das colônias de microrganismos descrevendo tamanho, forma, elevação, bordos, estrutura,

brilho, cor, aspecto, sendo registradas com os dados de procedência (número da dorna, diluição da placa, data de coleta e repetição). As placas com cerca de 30 - 300 colônias de maior diluição foram selecionadas para a retirada dos isolados para caracterização molecular.

### **3.8 Caracterização das células**

Colônias de bactérias foram submetidas ao teste de Gram, e colônias de leveduras foram purificadas e posteriormente cariotipadas por PFGE (pulse field gel electrophoresis).

#### **Teste de Coloração de Gram**

Colônias de bactérias que cresceram no meio de cultivo foram submetidas ao teste de Gram, permitindo a distinção das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas. Este teste foi realizado após crescimento da cultura bacteriana em meio YEPG sólido (em g.L<sup>-1</sup>: extrato de levedura, 10,0; peptona de soja, 20,0; glicose 20,0; ágar 16,0) por 24 h (Pelczar, 1997; Stainer, 1993; Prescott, 1990).

### **3.9 Purificação e manutenção dos isolados de leveduras**

As colônias de leveduras isoladas foram purificadas pelo método de estrias compostas em meio YW (em g.L<sup>-1</sup>: extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona de soja, 5,0; glicose, 10,0; ágar, 20,0) a pH 3,5 e incubadas a 28 °C por 24 h. A caracterização morfológica das colônias de leveduras foi realizada quanto a sua forma, sendo classificadas como: esferoidal, ovoidal, cilíndrica, ogival, apiculada, forma-de-frasco ou triangular. As colônias puras foram estocadas a 4 °C em meio de cultura YW inclinado. Após 48 h de crescimento em B.O.D a 28 °C, uma alçada de cada colônia foi inoculada em

700µL YEPG mais glicerol a 40%, (v/v) ambos estéreis em criovials e estocados em freezer a - 20 °C.

### 3.10 Cariotipagem (PFGE – pulse field gel electrophoresis)

As leveduras selecionadas para cariotipagem eletroforética foram estabelecidas de acordo com as características morfológicas observadas em meio de cultura DRBC. Todas as leveduras que apresentaram morfologia de colônia diferente da colônia da célula de levedura inoculada foram testadas. As colônias de leveduras que apresentaram a mesma morfologia da colônia inoculada foram amostradas duas colônias de cada batelada sucessiva, para cariotipagem.

As células selecionadas foram submetidas à análise de cariótipo PFGE, seguindo a metodologia do equipamento com algumas modificações, sendo utilizado o sistema CHEF DR II (Bio Rad). As leveduras foram crescidas previamente em 2 mL YEPG líquido por 48 h em B.O.D. a 28 °C. Os tubos foram agitados, sendo retirado 1 mL de cada célula pertencente às colônias que foram separadas para cariotipagem. O volume de 1 mL correspondente a cada colônia foi vertido em ependorff e centrifugado a 5000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado em 40µL de ‘Lising-enzymes’ (10 mg/mL), levado ao banho-maria cuja temperatura estabelecida era de 65 °C, acrescentado de 40µL de agarose 1,2% da marca BIO-RAD.

A mistura de enzima e agarose foi imediatamente distribuída em molde de acrílico e esperado que os plugs solidificassem, para posteriormente serem transferidos para tubo de ensaio contendo 500 µL de CPE (ácido cítrico, 0,04M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,06M; EDTA, 0,02 M), permanecendo por 30 min nesta solução, e posteriormente adicionado de 500µL de proteinase K (20 mg/mL, sendo utilizado 0,4 mL de proteinase K e 7,6 mL da solução 3: EDTA, 0,45M; Tris, 10 mM; SDS, 0,03M), sendo incubado em banho-maria a 50 °C por 1 hora e 30 minutos. Após este período os plugs foram lavados com TE (Tris, 10 mM;

EDTA, 0,78 mM) pH 8, sendo 3 lavagens a 50 °C por 15 min cada e 5 lavagens à temperatura ambiente por 15 min cada.

Os plugs foram aplicados em gel de agarose 1,3% da marca SIGMA (300 mL de água destilada estéril diluída com tampão TAFE: Tris, 0,2M; EDTA, 7,8 mM; ácido acético glacial, 0,09M, numa diluição de 20X), e processada a corrida em tampão TAFE ( 4L de água destilada estéril com 200 mL de tampão TAFE, numa diluição de 20X).

Foram programados dois blocos para corrida, sendo o primeiro com pulso inicial de 60 segundos, pulso final de 60 segundos, tempo de corrida 8 h a 6 Volts, o segundo bloco foi programado para pulso inicial 90 segundos, pulso final 90 segundos, tempo de corrida 12 h a 6 Volts com ângulo de 120°. Cromossomos da levedura *S. cerevisiae* CA116 foram usados como padrão. Terminada a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo ( 10 mg/mL, sendo usados 50µL de brometo de etídeo para 1,0 L de água destilada) por 30 min; logo em seguida foi realizada a descoloração do gel em água destilada por 30 min, sendo fotografado com câmara Polaroid. O gel foi visualizado através do Transluminador de luz ultravioleta.

### 3.11 Destilação

Após o término de cada fermentação, o mosto foi enviado a um alambique com capacidade de 50 L de vinho, obtendo uma cachaça de 38 a 48% de teor alcoólico. Quanto a destilação, foram separados os compostos resultantes da fermentação, de acordo com ponto de ebulição característico de cada substância. Os produtos metabólicos microbianos mais voláteis que o álcool saem na primeira destilação, ou seja, na fração chamada de cabeça. O álcool etílico apresenta ponto de ebulição em torno de 78,5 °C; constituiu a segunda porção da destilação, também chamada de coração. Os produtos menos voláteis que o álcool etílico são obtidos na última porção de destilação, chamada de

**TABELA 3** Processo de destilação das sete bateladas realizadas através da cepa RL11

DESTILAÇÕES RL11	VINHO		CORACÃO		CABEÇA		CORTE		RENDIMENTO
	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	
Primeira	28	-	3,5	43	0,73	54	3,8	28	26,3%
Segunda	26	-	4,0	45	0,65	60	4,65	29	21,5%
Terceira	23	-	5,0	45	0,6	61	5,6	30	17,8%
Quarta	27	-	5,5	46	0,5	63	4,5	25	16,2%
Quinta	26	-	5,0	45	0,45	63	3,7	27	17,5%
Sexta	27	-	6,0	45	0,5	63	4,5	27	14,8%
Sétima	26	-	6,0	45	0,45	65	4,45	25	15,0%

T.A. = medida de teor alcoólico.

O rendimento das sete destilações observado na Tabela 3, variou de 14,8 a 26,31%, numa média de 18%, aproximadamente 5,0 L de cachaça a cada destilação a 45% de teor alcoólico; portanto, num volume de 26 L de vinho, para cada 4,7 L de mosto (caldo de cana fermentado) foi produzido 1 L de Cachaça. De acordo com Sales (2001), por meio da destilação, o vinho proveniente da fermentação alcoólica deverá produzir de 15 a 17% do volume de vinho destilado em Cachaça, contendo de 38 a 48% de volume em álcool; portanto; o rendimento das sete bateladas estava dentro do rendimento esperado para essa bebida, extrapolando na segunda destilação. De acordo com a Tabela 3 pode-se observar que as duas primeiras destilações apresentaram melhor rendimento que as demais, que tenderam a diminuir após a quinta destilação.

A contagem de células foi realizada após enviar o vinho resultante da fermentação ao alambique, processando agitação manual das dornas ressuspendendo as células as quais encontravam-se decantadas e o pé-de-cuba é recolhido em tubos de ensaio estéreis para serem processadas as análises

EDTA, 0,78 mM) pH 8, sendo 3 lavagens a 50 °C por 15 min cada e 5 lavagens à temperatura ambiente por 15 min cada.

Os plugs foram aplicados em gel de agarose 1,3% da marca SIGMA (300 mL de água destilada estéril diluída com tampão TAFE: Tris, 0,2M; EDTA, 7,8 mM; ácido acético glacial, 0,09M, numa diluição de 20X), e processada a corrida em tampão TAFE ( 4L de água destilada estéril com 200 mL de tampão TAFE, numa diluição de 20X).

Foram programados dois blocos para corrida, sendo o primeiro com pulso inicial de 60 segundos, pulso final de 60 segundos, tempo de corrida 8 h a 6 Volts, o segundo bloco foi programado para pulso inicial 90 segundos, pulso final 90 segundos, tempo de corrida 12 h a 6 Volts com ângulo de 120°. Cromossomos da levedura *S. cerevisiae* CA116 foram usados como padrão. Terminada a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo ( 10 mg/mL, sendo usados 50µL de brometo de etídeo para 1,0 L de água destilada) por 30 min; logo em seguida foi realizada a descoloração do gel em água destilada por 30 min, sendo fotografado com câmara Polaroid. O gel foi visualizado através do Transluminador de luz ultravioleta.

### 3.11 Destilação

Após o término de cada fermentação, o mosto foi enviado a um alambique com capacidade de 50 L de vinho, obtendo uma cachaça de 38 a 48% de teor alcoólico. Quanto a destilação, foram separados os compostos resultantes da fermentação, de acordo com ponto de ebulição característico de cada substância. Os produtos metabólicos microbianos mais voláteis que o álcool saem na primeira destilação, ou seja, na fração chamada de cabeça. O álcool etílico apresenta ponto de ebulição em torno de 78,5 °C; constituiu a segunda porção da destilação, também chamada de coração. Os produtos menos voláteis que o álcool etílico são obtidos na última porção de destilação, chamada de

cauda, composta de ácidos voláteis e álcoois superiores, os quais devem permanecer no vinhoto, ou serem transferidos em porções discretas e suficientes ao coração para a caracterização da bebida (Maia, 1994).

Terminada a fermentação, o vinho foi recolhido e o alambique foi aquecido por chama a gás. Aquecido o vinho, os vapores eram condensados sendo resfriados na serpentina e recolhido o destilado em tubo de vidro, processando-se os cortes das frações cabeça, coração e cauda, de acordo com o volume de vinho obtido na fermentação. Na Figura 3, pode ser observado o alambique utilizado no experimento.



FIGURA 3 Alambique utilizado no experimento

Através de testes preliminares, foram estabelecidos o volume de vinho que corresponde a destilado, como também a porcentagem do destilado correspondente à fração cabeça para cada cepa utilizada no experimento. Portanto para a cepa selecionada RL11, 17% do volume de vinho consistiram no volume de destilado e deste 10% corresponderam à fração cabeça, embora com as cepas selecionadas CA116 e FC9 a cada 4L de vinho corresponderiam a 1L

de destilado, sendo que do destilado 20% compõem a fração cabeça, padronizando a escala de laboratório utilizada neste trabalho. O corte da destilação foi realizado quando se obtinha na fração coração um teor alcoólico igual a aproximadamente 45% , constituindo o restante a fração cauda.

As frações cabeça e cauda da primeira e segunda destilação foram desprezadas, porém armazenadas 5mL em geladeira a - 4 °C das destilações posteriores, como também da fração coração de todos os destilados, para análise cromatográfica.

Foram amostrados após cada destilação 700 mL de cachaça para análise química no laboratório de Análises de Bebidas no DQI/UFLA e para envelhecimento em barril de carvalho com capacidade de 5 L, foi coletado 1250 mL.

O teor de álcool foi medido a cada 700 mL de destilado que saía da serpentina, por alcoômetro de mercúrio, da marca MERCÚRIO, em proveta de 1000 mL, lendo-se através da escala Gay-Lussac.

### **3.12 Análise química da Cachaça**

A análise química da bebida foi realizada no Laboratório de Análises Físico-Química de Bebidas do Departamento de Química/UFLA. As análises físico-químicas realizadas da bebida, correspondem aos teores de densidade relativa, cobre, extrato seco, grau alcoólico real, acidez volátil em ácido acético, álcool superior, aldeídos em aldeído acético, ésteres em acetato de etila e álcool metílico encontrados na cachaça. Estas análises foram realizadas de acordo com as normas do Ministério da Agricultura.

### **3.13 Análises cromatográficas**

Foram adotadas as seguintes condições para o cromatógrafo: temperatura de 250 e 240 °C, para o detector e injetor, respectivamente; volume de injeção de

1µl de amostra, na proporção de 1:1:1, sendo, na sequência, ar-amostra-ar e razão de split 15; nitrogênio como gás de arraste a 7,8 psi por 2', passando a 10,6 psi (0,42 psi/min) e finalmente chegando a 14,0 psi (1,27 psi/min); temperatura da coluna (30m x 0,25mm, C-wax 20M - 0,25µm de espessura) a 32 °C por 2min 100 °C ( 10 °C/min) e finalmente a 180 °C (30 °C/min).

As amostras de mosto (vinho e vinhoto) foram centrifugados a 5.000 rpm a 4 °C por 15 min, juntamente com as amostras do destilado (cabeça, cauda e coração), foram injetados com padrão interno (tolueno), o qual é ausente tanto nos destilados quanto em fermentação de cana-de-açúcar.

Os compostos acetaldeído, etanol, 1-propanol, isobutanol, isoamilico, amílico, 1-hexanol e ácido acético, foram pré-estabelecidos através de prévia identificação dos tempos de retenção dos padrões das marcas Sigma, Aldrich, Merck e Supelco. Para determinação do etanol (composto de maior concentração na amostra) foi adotado um padrão separado dos demais compostos, utilizando acetona (99,9%) como solvente, sendo que para outros compostos utilizou-se o próprio etanol (96%) como solvente. As amostras, para determinação do etanol, tiveram diluição de 100x e 20x para os destilados e fermentados, respectivamente.

### 3.14 Envelhecimento da cachaça

A fração coração de cada batelada foi armazenada em garrafão de vidro com capacidade de 5L; portanto, obtendo-se 4 garrafões envasados com cachaça. A cada destilação realizada foi armazenado em barril de carvalho do tipo tonel horizontal, 1250 mL da bebida para o envelhecimento. Os três barris utilizados no experimento (um barril para cada cepa selecionada fermentada), tem capacidade para 5L de cachaça. A bebida foi deixada envelhecer por um período de 30 dias, para posterior análise química (análise realizada no laboratório de Análises de Bebidas - DQI/UFLA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Processos fermentativos em bateladas sucessivas

#### Inóculo com *Saccharomyces cerevisiae* selecionada (RL11, CA116 e FC9)

A população microbiana viável presente na dorna 1 foi de  $5,0 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e de  $3,3 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> na dorna 2 no inóculo preparado com a cepa RL1. Nas dornas onde a cepa CA116 foi inoculada encontraram-se populações de  $1,3 \times 10^8$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $1,07 \times 10^8$  cel.mL<sup>-1</sup> nas dornas 1 e 2, respectivamente. *Saccharomyces cerevisiae* FC9 apresentou população microbiana de  $0,5 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> na dorna 1 e  $0,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> na dorna 2. Foi possível observar que a taxa de multiplicação celular não foi semelhante nas dornas inoculadas com a levedura FC9.

#### Fermentações com RL11

O pé-de-cuba foi formado por células que se decantaram após o consumo de açúcar, formando uma massa compacta, necessitando de uma agitação intensa para que as células fossem ressuspensas tanto para coleta de amostra quanto para iniciar o período fermentativo. Das sete bateladas, a primeira e a quinta tiveram período fermentativo de 36 e 24 h, respectivamente, as outras bateladas tiveram um período fermentativo maior, variando de 41 a 49 h. Os valores da variação de temperatura, pH, concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) podem ser observados na Tabela 2.

O caldo de cana-de-açúcar 'in natura' utilizado apresentou valores de pH entre 5,2 e 5,8; portanto, adicionando caldo sucessivamente às dornas de fermentação esperava-se um aumento no valor de pH. De acordo com Schwan et al. (2001), valores de pH próximos a 4 propiciam a propagação de microrganismos contaminantes do processo fermentativo. O decréscimo de

valores de pH é um fenômeno comum durante a fermentação alcoólica, devido à produção de ácidos por algumas espécies de leveduras e também pelas bactérias do ácido lático e acético que podem contaminar a fermentação (Schwan et al., 2001). A variação do pH está relacionada com a concentração alcoólica e movimento de prótons na célula, uma vez que a concentração alcoólica aumenta o valor de pH para maior de acordo com a concentração de etanol, e que a sua diminuição ocorre devido à expulsão extracelular de prótons  $H^+$ , e o etanol provoca um retorno passivo de  $H^+$  para a célula (Walker, 1998).

TABELA 2 Descrição do período de abastecimento das dornas, durante sete bateladas sucessivas realizadas com inóculo preparado com *Saccharomyces cerevisiae* RL11

BATELADA RL11		ALIMENTAÇÃO			DENTRO DA DORNA			
		Temperatura °C	Duração (h)	Volume (L)	°C	°Brix	pH	PF
1ª	Variação	40 - 25	9:30 - 16:30	2,0 - 4,0	27 - 30	8 - 0	2,94 - 3,58	36
	Média	29	7:00	2,3	29	6	3,27	
2ª	Variação	40 - 30	14:00 - 16:10	1,0 - 4,0	25 - 30	10 - 0	3,13 - 3,57	41
	Média	32	2:10	2,4	29	5	3,31	
3ª	Variação	40 - 30	8:00 - 16:30	0,3 - 4,0	23 - 31	6 - 0	3,31 - 3,56	47
	Média	35	8:30	2,0	25	4	3,41	
4ª	Variação	40 - 30	7:45 - 16:30	1,4 - 4,0	23 - 31	8 - 0	3,28 - 3,62	48
	Média	34	9:00	2,72	28	5	3,44	
5ª	Variação	40 - 25	8:55 - 15:30	1,2 - 4,0	28 - 34	9 - 0	3,20 - 3,48	24
	Média	33	7:00	2,64	32	8	3,40	
6ª	Variação	40 - 30	15:00 - 17:35	1,4 - 6,0	26 - 34	10 - 0	3,29 - 3,53	44
	Média	33	4:30	3,35	30	9	3,42	
7ª	Variação	40 - 25	11:50 - 14:30	1,2 - 4,0	26 - 31	10 - 0	3,26 - 3,49	49
	Média	31	4:00	3,	29	7	3,410	

PF = duração do período fermentativo em horas.

A temperatura variou em média durante as bateladas de 29 °C a 35 °C, a concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) dentro das dornas teve média de 4

a 8 durante o período fermentativo (Tabela 2). O valor de pH encontrado foi de valor mínimo de 2,94 e máximo de 3,58, sendo menor nas duas primeiras bateladas (Tabela 2).

A fermentação alcoólica mostrou-se homogênea durante as sete bateladas, apresentando cheiro suave de fruta, grande número de microbolhas no mosto, fazendo-se notar uma agitação intensa do mesmo. Não ocorreu formação de espuma espessa; os 10% do volume da dorna destinados a essa finalidade constituíram 2,5 L da capacidade de espuma que poderia ser formada na dorna, não foram utilizados.

Após recolher todo o vinho drenado, o mesmo foi enviado ao alambique para processar a destilação. Os vapores, quando em contato com a água fria retida no recipiente que continha a serpentina, condensavam e foram recolhidos, processando-se cortes das frações denominadas de cabeça, coração e cauda. A temperatura na saída da serpentina de todos os destilados apresentava-se em torno de 25 °C. Os resultados desse processo da produção de cachaça podem ser observados na Tabela 3.

Do vinho recolhido foi processado cálculo de 17% em relação vinho/cachaça; desse volume 10% correspondem a fração cabeça. Toda porção recolhida da serpentina, quando completada; 0,7 L foram vertidos em proveta e processada a leitura correspondente ao teor alcoólico. Após ter sido recolhido o volume da fração cabeça, foi recolhida a fração correspondente ao coração, sendo depositado em balão volumétrico de capacidade 6L, até atingir aproximadamente 45% de teor alcoólico. Das frações cabeça e cauda foram recolhidos 2mL para análises cromatográficas, sendo o restante desprezado; porém, da fração coração foram recolhidos 0,8 L para análises e o restante deixado em barril de carvalho para o processo de maturação.

**TABELA 3** Processo de destilação das sete bateladas realizadas através da cepa RL11

DESTILAÇÕES RL11	VINHO		CORÇÃO		CABEÇA		CORTE		RENDIMENTO
	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	Vol.	T.A.	
Primeira	28	-	3,5	43	0,73	54	3,8	28	26,3%
Segunda	26	-	4,0	45	0,65	60	4,65	29	21,5%
Terceira	23	-	5,0	45	0,6	61	5,6	30	17,8%
Quarta	27	-	5,5	46	0,5	63	4,5	25	16,2%
Quinta	26	-	5,0	45	0,45	63	3,7	27	17,5%
Sexta	27	-	6,0	45	0,5	63	4,5	27	14,8%
Sétima	26	-	6,0	45	0,45	65	4,45	25	15,0%

T.A. = medida de teor alcoólico.

O rendimento das sete destilações observado na Tabela 3, variou de 14,8 a 26,31%, numa média de 18%, aproximadamente 5,0 L de cachaça a cada destilação a 45% de teor alcoólico; portanto, num volume de 26 L de vinho, para cada 4,7 L de mosto (caldo de cana fermentado) foi produzido 1 L de Cachaça. De acordo com Sales (2001), por meio da destilação, o vinho proveniente da fermentação alcoólica deverá produzir de 15 a 17% do volume de vinho destilado em Cachaça, contendo de 38 a 48% de volume em álcool; portanto; o rendimento das sete bateladas estava dentro do rendimento esperado para essa bebida, extrapolando na segunda destilação. De acordo com a Tabela 3 pode-se observar que as duas primeiras destilações apresentaram melhor rendimento que as demais, que tenderam a diminuir após a quinta destilação.

A contagem de células foi realizada após enviar o vinho resultante da fermentação ao alambique, processando agitação manual das dornas ressuspendendo as células as quais encontravam-se decantadas e o pé-de-cuba é recolhido em tubos de ensaio estéreis para serem processadas as análises

microbiológicas. A variação da população microbiana em contagem celular pode ser observada na Tabela 4.

**TABELA 4** População microbiana viável encontrada durante as fermentações em bateladas sucessivas

Bateladas	Células viáveis (cel. mL <sup>-1</sup> )	
	D1	D2
Primeira	5,1 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>7</sup>
Segunda	5,8 x 10 <sup>7</sup>	8,9 x 10 <sup>7</sup>
Terceira	6,9 x 10 <sup>7</sup>	9,7 x 10 <sup>7</sup>
Quarta	7,5 x 10 <sup>7</sup>	6,6 x 10 <sup>7</sup>
Quinta	8,3 x 10 <sup>7</sup>	7,2 x 10 <sup>7</sup>
Sexta	8,9 x 10 <sup>7</sup>	7,8 x 10 <sup>7</sup>
Sétima	31,3 x 10 <sup>7</sup>	18,9 x 10 <sup>7</sup>

Legenda: D1 = dorna 1; D2 = dorna 2.

Durante as fermentações o número de células viáveis permaneceu na ordem de 10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. Quando da comparação entre as bateladas sucessivas foi observada uma variação de 5,1 a 31,3 x 10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. Foi observado que na dorna 1 houve aproximadamente uma população 5% maior que a da dorna 2. Esta variação pode estar relacionada à divisão do inóculo (corte) feito nas dornas no momento de formação do pé-de-cuba.

#### **Fermentações com CA116**

A população microbiana inoculada na dorna 1 foi de 1,3 x 10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup> e 1,07 x 10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup> na dorna 2. A cepa selecionada CA116 apresentou a

capacidade de floculação (Figura 4), o que facilitou o processo de sedimentação das células no final de cada batelada do processo fermentativo.

O tempo de fermentação das bateladas sucessivas com a *S. cerevisiae* CA116 variou entre 30 a 49 h. Como realizado com as fermentações com o inóculo da RL11, o abastecimento das dornas com caldo de cana-de-açúcar novo e estéril foi por um período médio em torno de 5 h.

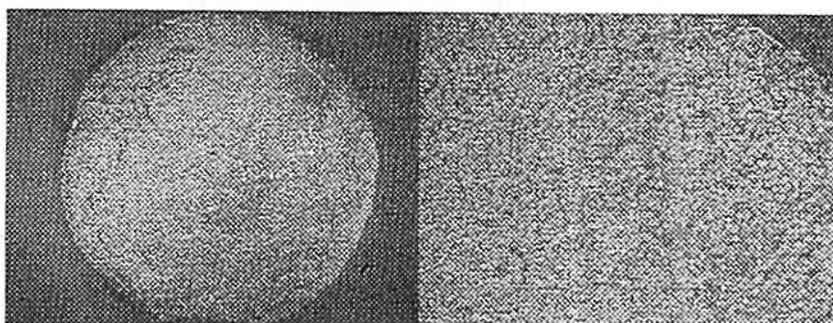


FIGURA 4 Floculação da cepa selecionada CA116, após fermentação do caldo de cana-de-açúcar.

Os valores de pH variaram entre 2,26 a 3,59 (Tabela 5) durante as bateladas realizadas. Observou-se durante este experimento que valores de pH e <sup>o</sup>Brix aumentavam com abastecimento de caldo às dornas, porém dado um intervalo maior de abastecimento estes valores diminuían devido ao metabolismo das leveduras.

Os valores dentro da dorna de temperatura, pH, <sup>o</sup>Brix, foram medidos assim que novo caldo de cana foi vertido nas dornas, num período máximo após 5 min de abastecimento das dornas. Dentro das dornas os valores de temperatura variaram entre 26 a 34 °C, variando em média em torno de 31 °C; portanto, mesmo que a média de abastecimento tenha sido em torno de 29 °C, dentro das dornas houve esse aumento, justificado pelo metabolismo dos microrganismos

constituíntes do mosto. O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) dentro das dornas apresentou valores entre 12 a 7 nas sete bateladas realizadas; em média ocorreu uma variação de 7 °Brix.

TABELA 5 Descrição do período de abastecimento das dornas, durante sete sucessivas bateladas realizadas com a *Saccharomyces cerevisiae* CA116

BATELADA CA116	ALIMENTAÇÃO			DENTRO DA DORNA				
	Duração	°C	(L)	°C	°Brix	pH	PF	
1ª	Varição	15:00 – 19:10	40 – 35	4,0	30 - 34	10 - 0	2,89 – 3,59	48
	Média	4:10	39	4,0	33	6	3,27	
2ª	Varição	17:00 – 18:50	40 – 35	2 – 6	29 – 34	12 – 0	2,97 – 3,62	69
	Média	1:50	29	5,0	33	8	3,39	
3ª	Varição	10:50 – 18:00	40 – 25	0,5 – 4	30 – 34	9 – 0	2,95 – 3,30	52
	Média	7:10	28	1,7	31	6	3,15	
4ª	Varição	15:15 - 19:10	40 - 25	1 - 4	28 - 31	11 - 0	2,93 – 3,48	41
	Média	4:00	27	2,4	30	9	3,24	
5ª	Varição	8:05 - 17:00	40 - 25	0,5 – 2,0	28 - 30	8 - 0	2,26 – 3,29	30
	Média	9:00	26	1,36	29	5	3,06	
6ª	Varição	14:20 - 18:10	40 - 25	1 – 4	28 - 31	11 - 0	3,01 – 3,57	44
	Média	4:10	28	3,0	30	8	3,32	
7ª	Varição	10:35 - 16:30	40 - 25	1 – 4	26 – 33	7 – 0	3,10 – 3,31	47
	Média	6:00	27	2,3	30	5	3,22	

PF = duração do período fermentativo em horas.

Durante todo o processo fermentativo com a cepa CA116 houve um aroma intenso, característico de fermentações de cachaça de alambiques da região. Ocorreu a formação de espuma que ocupou um volume de 3,3% do volume destinado a essa finalidade, com formação de bolhas heterogêneas.

A contagem da população microbiana das dornas foi realizada após enviar o vinho resultante da fermentação ao alambique. Esgotado o vinho, as dornas passaram por uma agitação manual, para ressuspender as células que se encontravam decantadas após fermentação. Nesse experimento não foi necessária uma agitação intensa, uma vez que a massa celular era consistente, no que diferia da massa celular formada pela cepa RL11 que era compacta.

**TABELA 6** Número de células viáveis durante a fermentação realizada com a cepa iniciadora CA116

Bateladas	Células viáveis (cel. mL <sup>-1</sup> )	
	D1	D2
Primeira	1,3 x10 <sup>8</sup>	1,07 x10 <sup>8</sup>
Segunda	1,5 x10 <sup>8</sup>	1,8 x10 <sup>8</sup>
Terceira	1,7 x10 <sup>8</sup>	2,1 x10 <sup>8</sup>
Quarta	4,5 x10 <sup>8</sup>	5,1 x10 <sup>8</sup>
Quinta	3,2 x10 <sup>8</sup>	1,3 x10 <sup>8</sup>
Sexta	1,5 x10 <sup>8</sup>	2,0 x10 <sup>8</sup>
Sétima	5,1 x10 <sup>8</sup>	5,3 x10 <sup>8</sup>

D1 = dorna 1; D2 = dorna 2.

A população microbiana permaneceu na ordem de 10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup>, durante as sete fermentações, variando de 1,07 x10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup> a 5,3 x10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. Em ambas as dornas a população microbiana tendeu a aumentar até a quarta

fermentação, tendo a população reduzida da quarta para quinta batelada em 16,9% na dorna 1 e 59,4% na dorna 2 .

Terminada a fermentação, o vinho foi recolhido e enviado ao alambique para o processo de destilação. A primeira destilação foi descartada, uma vez que é resultante do corte realizado para a multiplicação celular. A Tabela 7 descreve o processo de destilação durante as sete bateladas realizadas com a cepa iniciadora CA116.

**TABELA 7** Processo de destilação das sete bateladas realizadas através da cepa iniciadora CA116

DESTILAÇÕES RL11	VINHO		CORACÃO		CABEÇA		CORTE		RENDIMENTO
	Volume	T.A.	Volume	T.A.	Volume	T.A.	Volume	T.A.	
Primeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Segunda	41	-	4,0	44	2,1	58	6,1	35	16,4%
Terceira	35	-	3,0	45	1,8	60	4,8	40	20,8%
Quarta	32	-	3,0	44	1,6	59	4,6	37	21,8%
Quinta	30	-	2,0	43	1,5	56	3,5	40	30,0%
Sexta	34	-	3,0	46	1,7	60	4,7	40	20,6%
Sétima	40	-	3,0	48	2,0	60	5,0	41	20,0%

T.A. = medida de teor alcoólico. Volume medido em litros.

O volume de vinho destilado durante as seis destilações variou entre 30 a 41 L, sendo que do volume de vinho em cada destilação obteve-se um volume de fração cabeça, volume este entre 1,5 a 2,1 L correspondendo entre 56 a 60% de teor alcoólico; 4 L foi o maior volume obtido de coração a 44% de teor

alcoólico, o volume de coração dentre os demais destilados variou entre 2 e 3L e o teor alcoólico foi expresso em até 48%, sendo o mínimo de teor alcoólico obtido com os destilados de 43%, Tabela 7. O corte foi feito quando se obtiveram aproximadamente 45% de teor alcoólico, quando o último teor que compunha o destilado estava entre 35 a 41% de teor alcoólico. O rendimento das bebidas variou entre 16,5% a 30%, uma vez que o menor rendimento foi obtido através da segunda destilação e o maior, 30%, foi obtido na quinta destilação; aproximadamente houve um rendimento de 21,6% , produzindo 3L de cachaça a cada destilação a 45 % de teor alcoólico.

Nos testes preliminares, a primeira cachaça resultante da destilação após a primeira fermentação revelou que os valores de compostos físico-químicos encontrados na bebida extrapolaram os limites exigidos pelo Ministério da Agricultura, sendo confirmado com a cepa RL11; portanto, foi descartada a primeira destilação proveniente das fermentações com as cepas selecionadas CA116 e FC9. A temperatura do destilado na saída da serpentina apresentou uma variação respectivamente durante as destilações, sendo de 25, 32, 27, 25, 26 e 25 °C, influenciando na correção do teor alcoólico real, medido a 20 °C nas análises no Laboratório de Aguardente (DQI/UFLA).

### **Fermentações com FC9**

A temperatura dentro das dornas variou entre 25 a 34 °C, em média foi em torno de 29 °C (Tabela 8 ). O teor de sólidos solúveis variou de 7 a 11 °Brix, em média durante as cinco bateladas foi de aproximadamente 8 °Brix e os valores de pH tiveram uma média de aproximadamente 3,13, variando durante as bateladas de 2,85 a 3,58.

Durante o abastecimento, valores de pH e °Brix aumentavam e começavam a baixar após um período de aproximadamente 3 h, tendendo a aumentar com novas adições de caldo, no processo fermentativo. Foi observado

cheiro suave de fruta e intensa formação de microbolhas, as quais não formaram espuma na superfície da dorna.

TABELA 8 Descrição do período de abastecimento das dornas, durante as sete bateladas sucessivas realizadas com *Saccharomyces cerevisiae* FC9

BATELADA FC9		ALIMENTAÇÃO			DENTRO DA DORNA			
		Duração (h)	Temperatura °C	Volume (L)	Temperatura °C	°Brix	pH	PF
1ª	Variação	8:20 – 18:05	40 – 35	1 – 4	27 – 34	8 – 0	2,85 – 3,35	97
	Média	10:00	38	3,0	31	6	3,16	
2ª	Variação	9:50 - 15:50	40 - 25	2 - 4	29 – 34	10 - 0	2,98 – 3,54	71
	Média	6:00	30	3,3	32	9	3,34	
3ª	Variação	9:20 - 17:30	40 - 25	0,5 – 4,0	25 – 33	10 - 0	2,94 – 3,40	144
	Média	8:10	27	2,0	29	7	2,84	
4ª	Variação	8:05 - 12:10	40 - 25	4,0	25 – 31	11 - 0	3,09 – 3,50	72
	Média	4:05	35	4,0	29	9	3,29	
5ª	Variação	8:30 - 16:30	40 - 25	0,5 – 3,0	26 – 29	11 - 0	3,23 – 3,58	96
	Média	7:00	26	1,0	24	7	3,04	

PF = duração do período fermentativo.

TABELA9 Número de células viáveis durante a fermentação realizada com a *Saccharomyces cerevisiae* FC9

Bateladas	Células viáveis $\times 10^7$ cel. . mL <sup>-1</sup>	
	D1	D2
Primeira	1,1 $\times 10^7$	1,04 $\times 10^7$
Segunda	1,3 $\times 10^7$	1,2 $\times 10^7$
Terceira	1,5 $\times 10^7$	2,1 $\times 10^7$
Quarta	1,7 $\times 10^7$	7,95 $\times 10^7$
Quinta	1,97 $\times 10^7$	8,4 $\times 10^7$

D1 = dorna 1; D2 = dorna 2.

O número de células viáveis na dorna 1 antes da divisão com a dorna 2 foi de  $9,4 \times 10^7$  cel. mL<sup>-1</sup>; após a divisão a população microbiana foi de  $0,5 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> na dorna 1 e na dorna 2 de  $0,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. A população microbiana durante as cinco bateladas posteriores às fermentações, pode ser observada na Tabela 9.

No decorrer das bateladas houve pequeno aumento na população microbiana, embora na dorna 2 esse aumento foi de 46,43% a mais que a população microbiana na dorna 1 (Tabela 9).

Durante as cinco bateladas o número de células viáveis permaneceu na ordem de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> apresentando uma variação de  $1,04 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> a  $8,4 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, entre as duas repetições, dorna 1 e dorna 2.

TABELA 10 Processo de destilação das cinco bateladas realizadas com *Saccharomyces cerevisiae* FC9

DESTILAÇÕES RL11	VINHO		CORAÇÃO		CABEÇA		CORTE		RENDIMENTO
	Volume	T.A.	Volume	T.A.	Volume	T.A.	Volume	T.A.	
Primeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Segunda	33	-	3	45	1,7	59	4,7	39	21,2%
Terceira	28	-	3	45	1,4	61	4,4	35	21,4%
Quarta	30	-	3	43	1,5	60	4,5	34	23,3%
Quinta	30	-	3	45	1,5	60	4,5	38	23,3%

T.A. = medida de teor alcoólico. Volume medido em litros.

Observou-se que nas quatro destilações foi obtido o mesmo volume da fração coração 3 L; porém, o teor alcoólico da mesma variou entre 43 e 45%. A fração cabeça variou em volume de 1,4 a 1,7, sendo que nas duas últimas

destilações foram obtidos valores iguais tanto no volume quanto no teor de álcool (60%). Os cortes da destilação foram feitos quando o teor de álcool atingiu de 34 a 38%, de acordo com a Tabela 10. A temperatura do destilado, após sair da serpentina variou, respectivamente, 28, 25, 22 e 25 °C. Estes valores alteraram o teor alcoólico real da bebida que deve ser lida no alcoômetro a 20°C.

O rendimento das destilações variou entre 21 e 23% no decorrer das quatro destilações, sendo que a terceira e quarta destilações apresentaram o mesmo rendimento; em média essa cepa apresentou um rendimento de 22,3% , produzindo 3,0 L de cachaça por destilação a 45% de teor alcoólico.

#### **4.2 População microbiana**

Amostras do inóculo retiradas no final de cada processo fermentativo foram analisadas para avaliação da população microbiana. As dornas de fermentação foram abastecidas com caldo de cana de açúcar fresco, estéril, diluído com água destilada a 16 °Brix. O abastecimento nas dornas variou aproximadamente entre 6 a 8 h, sendo que o primeiro caldo adicionado foi aquecido a 40 °C e os demais caldos aquecidos de acordo com a temperatura interna das dornas; portanto, a temperatura de aquecimento do caldo variou de 25 °C a 40 °C. Quando zerado o °Brix, o vinho resultante do processo fermentativo foi recolhido e enviado ao alambique para ser destilado, restando nas dornas o inóculo (pé-de-cuba) sedimentado devido à floculação das células. Do pé-de-cuba, foram amostrados 7mL em tubo de ensaio estéril, um correspondente a cada dorna para análises, uma vez que desse volume, 2mL foram destinados imediatamente a análises microbiológicas, sendo que os demais 5 mL correspondem ao volume armazenado para análises cromatográficas Os resultados das análises microbiológicas, obtidos com as três leveduras inoculadas nas repetições no sistema de batelada podem ser observados na Tabela 11.



dominância no decorrer das bateladas como nos outros dois experimentos anteriores (Tabela 11).

A maior população leveduriforme foi obtida nos experimentos cujo inóculo foi preparado com a levedura RL11, seguido da cepa FC9. A *S. cerevisiae* CA116 apresentou uma variação maior entre o número de colônias inoculado em relação ao número de colônias totais.

De acordo com Schwan et al. (2001), durante a fermentação natural e espontânea de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça vários grupos de microrganismos estão presentes, sendo que as leveduras são encontradas em maior percentual.

### Leveduras

Após a avaliação da população total e leveduriforme, as colônias presentes foram analisadas e repicadas para o teste de PFGE para confirmação do cariótipo das cepas inoculadas. A descrição das diferentes colônias observadas durante todo o experimento pode ser observada na Tabela 12, relacionando as características observadas das diversas colônias com seu respectivo percentual durante todo o processo fermentativo realizado pelas cepas de leveduras.

A porcentagem de cada colônia na placa foi calculada separadamente para cada cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no experimento; portanto, as colônias de 1 a 11 pertencem à cepa RL11 durante as quatro bateladas. Entretanto, as colônias de 12 a 15 foram relativas à cepa CA116, e as demais colônias foram originadas do processo fermentativo das quatro bateladas através do inóculo preparado através da cepa FC9.

Na produção de Cachaça pode acontecer que outras leveduras estejam presentes no processo fermentativo, não sendo a levedura selecionada para produção dessa bebida. De acordo com Cabrini et al. (1999), leveduras

destilações foram obtidos valores iguais tanto no volume quanto no teor de álcool (60%). Os cortes da destilação foram feitos quando o teor de álcool atingiu de 34 a 38%, de acordo com a Tabela 10. A temperatura do destilado, após sair da serpentina variou, respectivamente, 28, 25, 22 e 25 °C. Estes valores alteraram o teor alcoólico real da bebida que deve ser lida no alcoômetro a 20°C.

O rendimento das destilações variou entre 21 e 23% no decorrer das quatro destilações, sendo que a terceira e quarta destilações apresentaram o mesmo rendimento; em média essa cepa apresentou um rendimento de 22,3% , produzindo 3,0 L de cachaça por destilação a 45% de teor alcoólico.

#### **4.2 População microbiana**

Amostras do inóculo retiradas no final de cada processo fermentativo foram analisadas para avaliação da população microbiana. As dornas de fermentação foram abastecidas com caldo de cana de açúcar fresco, estéril, diluído com água destilada a 16 °Brix. O abastecimento nas dornas variou aproximadamente entre 6 a 8 h, sendo que o primeiro caldo adicionado foi aquecido a 40 °C e os demais caldos aquecidos de acordo com a temperatura interna das dornas; portanto, a temperatura de aquecimento do caldo variou de 25 °C a 40 °C. Quando zerado o °Brix, o vinho resultante do processo fermentativo foi recolhido e enviado ao alambique para ser destilado, restando nas dornas o inóculo (pé-de-cuba) sedimentado devido à flocculação das células. Do pé-de-cuba, foram amostrados 7mL em tubo de ensaio estéril, um correspondente a cada dorna para análises, uma vez que desse volume, 2mL foram destinados imediatamente a análises microbiológicas, sendo que os demais 5 mL correspondem ao volume armazenado para análises cromatográficas Os resultados das análises microbiológicas, obtidos com as três leveduras inoculadas nas repetições no sistema de batelada podem ser observados na Tabela 11.

Como pode ser observado na Tabela 11, a cepa selecionada FC9 não foi avaliada na sexta e sétima bateladas, uma vez que a mesma apresentou apenas cinco bateladas sucessivas devido ao fato de ser inviável quanto ao período fermentativo

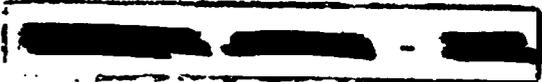
A população microbiana total presente no inóculo realizado com a cepa RL11, durante a primeira, segunda, terceira e quarta bateladas, variou de  $17,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $23,3 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A população leveduriforme avaliada pelo meio de cultivo DRBC e morfologia de colônias apresentou uma variação entre  $16,5$  a  $22,7 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> nas dornas durante as sete repetições realizadas (Tabela 11). A população da cepa RL 11 representou nas sete bateladas um percentual de 96% em relação à população total. Esses resultados indicaram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* RL 11 apresentou tanto característica de persistência quanto dominância nas dornas de fermentação.

O inóculo realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA116 apresentou um aumento na população inicial de aproximadamente 89,7% a mais em relação à cepa RL11 (Tabela 11). Conforme também observado nos experimentos com a cepa RL11, as variações de populações foram baixas no decorrer das sete bateladas sucessivas. Observou-se que a colônia correspondente à cepa CA 116 inoculada nas dornas teve uma variação no decorrer das sete bateladas de  $64,5$  a  $268 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, uma vez que a variação da população microbiana total nas dornas foi de  $108$  a  $306 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Tabela 11). A população da cepa inoculada foi elevada no decorrer das bateladas sucessivas realizadas, indicando ser também esta cepa uma levedura que tem capacidade de persistir e dominar outras contaminantes oriundas da fermentação natural, uma vez que na primeira batelada representava 59,7 % das colônias na placa na primeira batelada, e na sétima batelada correspondeu a 94,7% de colônias da placa.

TABELA 11 População microbiana total e das leveduras selecionadas nas quatro bateladas sucessivas do processo fermentativo

Batelada	RL 11 x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	Total x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	CA 116 x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	Total x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	FC9 x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	Total x 10 <sup>7</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>
Primeira	19,1	19,9	64,5	108	1,2	1,4
Segunda	16,5	17,2	95	144	8,6	9,3
Terceira	21,2	22,4	122,5	179,5	23,4	25,3
Quarta	22,6	23,3	206	254	24,3	25,3
Quinta	21,2	21,7	268	306	16,0	16,6
Sexta	22,7	23,2	252	266	-	-
Sétima	21,5	23,1	257	280	-	-

A *Saccharomyces cerevisiae* FC9 foi, dentre as três cepas avaliadas, a que apresentou uma menor taxa de multiplicação celular; na primeira batelada constituía apenas de  $1,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto que na primeira batelada a cepa selecionada RL11 foi representada por  $19,1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e as colônias que caracterizavam a cepa inoculada às dornas CA116 foram representadas por  $64,5 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> das colônias enumeradas na placa durante o experimento (Tabela 11). Essa população foi em média aproximadamente 93% menor que as obtidas com os inóculos preparados com as cepas RL 11 e CA 116. Após a segunda batelada ocorreu uma fase de multiplicação celular e a população leveduriforme variou dentre as cinco bateladas de  $1,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $24,3 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Tabela 12). A população leveduriforme apresentou persistência e



dominância no decorrer das bateladas como nos outros dois experimentos anteriores (Tabela 11).

A maior população leveduriforme foi obtida nos experimentos cujo inóculo foi preparado com a levedura RL11, seguido da cepa FC9. A *S. cerevisiae* CA116 apresentou uma variação maior entre o número de colônias inoculado em relação ao número de colônias totais.

De acordo com Schwan et al. (2001), durante a fermentação natural e espontânea de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça vários grupos de microrganismos estão presentes, sendo que as leveduras são encontradas em maior percentual.

### Leveduras

Após a avaliação da população total e leveduriforme, as colônias presentes foram analisadas e repicadas para o teste de PFGE para confirmação do cariótipo das cepas inoculadas. A descrição das diferentes colônias observadas durante todo o experimento pode ser observada na Tabela 12, relacionando as características observadas das diversas colônias com seu respectivo percentual durante todo o processo fermentativo realizado pelas cepas de leveduras.

A porcentagem de cada colônia na placa foi calculada separadamente para cada cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no experimento; portanto, as colônias de 1 a 11 pertencem à cepa RL11 durante as quatro bateladas. Entretanto, as colônias de 12 a 15 foram relativas à cepa CA116, e as demais colônias foram originadas do processo fermentativo das quatro bateladas através do inóculo preparado através da cepa FC9.

Na produção de Cachaça pode acontecer que outras leveduras estejam presentes no processo fermentativo, não sendo a levedura selecionada para produção dessa bebida. De acordo com Cabrini et al. (1999), leveduras

contaminantes podem dominar o fermento preparado, tanto o selvagem quanto o fermento utilizando levedura de panificação em poucos dias, já no início da safra. A dificuldade de persistência e dominância de cepas *Saccharomyces cerevisiae* em processo fermentativos realizados com cepas não selecionadas já foi observada por outros autores que trabalharam com fermentação alcoólica para produção de álcool combustível (Wheals et al., 1999) e também de cachaça (Gomes et al., 2002). Provavelmente esta substituição de cepas de *S. cerevisiae* após bateladas sucessivas, pode ser devido a alguns fatores como agressividade na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa.

Das colônias listadas na Tabela 12 as de números 2, 12 e 16 correspondem às células de leveduras inoculadas nas dornas de fermentação, sendo respectivamente RL11, CA116 e FC9.

Durante as fermentações com a cepa selecionada RL11, a colônia que corresponde à levedura inoculada representou 98,0% de todas as demais que apareceram. Respectivamente em percentual, a colônia 5 correspondeu a 0,75% do total das colônias obtidas, seguida da 3, 1, 8, 6, 4, 7, 9, 11 e 10 em ordem decrescente de percentual relativo ao número total de colônias durante as quatro bateladas, cuja variação foi de 0,32% da colônia 3 a 0,007% da colônia 10.

As fermentações acompanhadas com a cepa CA116, a colônia que mais apareceu durante as fermentações foi a colônia 12 representando 86% do total de colônias que foram amostradas durante as sete bateladas, seguida da colônia 13, com 10%, 14 representou 3,71% e a colônia 15 apenas 0,03%.

A menor variedade de morfotipos de colônias foi observada com o inóculo preparado com a cepa FC9, num total de 3 colônias distintas, sendo que colônia 16 representou a cepa inoculada com percentual igual a 94,6% das demais, seguida da colônia 17 com 3,80%, e a colônia 18 com 1,50% do total de colônias analisadas durante o experimento através das quatro bateladas.

TABELA 12 Descrição das características morfológicas e percentual das colônias representativas encontradas nos inoculos de *Saccharomyces cerevisiae* cepas RL11, CA116 e FC9

Característica da colônia	Colônia	% na fermentação
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> lisa, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 1	0.23
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 2	98.00
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> irregular, <sup>3</sup> ondulada, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa	Colônia 3	0.32
<sup>1</sup> Pequena, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> granulosa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> vermelho, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 4	0.08
<sup>1</sup> Pequena, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> rosa escuro, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 5	0.75
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> lisa, <sup>4</sup> granulosa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa escuro, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 6	0.09
<sup>1</sup> Pequena, <sup>2</sup> irregular, <sup>3</sup> lobado, <sup>4</sup> rugosa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> ondulada, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 7	0.06
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> em camadas, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 8	0.12
<sup>1</sup> Grande, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> ondulado, <sup>4</sup> granulosa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> achatada, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 9	0.03
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> lobado, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> vermelho, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 10	0.003
<sup>1</sup> Grande, <sup>2</sup> irregular, <sup>3</sup> filamentoso, <sup>4</sup> filamentosa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> bege, <sup>7</sup> achatada, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 11	0.007
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 12	85.94
<sup>1</sup> Grande, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> ondulado, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> achatada, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 13	9.95
<sup>1</sup> Pequena, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> vermelho, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 14	3.71
<sup>1</sup> Grande, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> granulosa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> achatada, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 15	0.03
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> opaca, <sup>6</sup> rosa, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 16	94.60
<sup>1</sup> Pequena, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> vermelho, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 17	3.80
<sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> circular, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> lisa, <sup>5</sup> brilhante, <sup>6</sup> rosa claro, <sup>7</sup> protuberante, <sup>8</sup> cremosa.	Colônia 18	1.50

<sup>1</sup>tamanho, <sup>2</sup>forma, <sup>3</sup>bordos, <sup>4</sup>estrutura, <sup>5</sup>brilho, <sup>6</sup>cor, <sup>7</sup>elevação, <sup>8</sup>aspecto.

Contaminações leveduriformes são comuns na fermentação, não indicando necessariamente baixa produtividade do alambique ou ineficiência do processo. A produtividade e eficiência estão mais relacionadas com os cuidados realizados com a recirculação de células, para permitir uma maior concentração do fermento desejado, podendo produzir pé-de-cuba de alta densidade, superando assim as leveduras numericamente os contaminantes (Tavares, 1992).

Os problemas com contaminação leveduriforme ocorrem, quando leveduras selvagens *non-Saccharomyces* ocorrem em proporções elevadas, dominando o fermento inicial, e que conseqüentemente poderão causar vários problemas no processo fermentativo, como por exemplo a redução na produtividade e rendimento, e problemas operacionais decorridos da dificuldade de sedimentação das células.

Medidas preventivas a contaminações nas dornas inexitem, como também não se tem o controle eficaz de leveduras contaminantes. Modificações nos procedimentos que sanem o problema e o emprego de antissépticos não são permitidas pela legislação numa fabricação artesanal de cachaça e também podem não ser eficazes em caso da contaminação estar propagada. A impossibilidade de detecção precoce de contaminantes, bem como do seu controle sem afetar o fermento, coloca o produtor num processo altamente vulnerável, sendo amenizada a situação quando há a decantação de leveduras que favorecem o estabelecimento do pé-de-cuba de alta densidade de células do tipo desejado (Tavares, 1992). Deste modo, torna-se indispensável o uso de leveduras selecionadas com a finalidade de serem usadas exclusivamente na fermentação de cachaça, em quantidade suficiente para dominar possíveis contaminações tanto com leveduras selvagens quanto com populações bacterianas.

Nas fermentações realizadas com leveduras selecionadas neste experimento, embora tenham aparecido algumas leveduras contaminantes, sua

proporção foi insignificante em relação ao percentual de colônias provenientes de cepas selecionadas (Tabela 12).

### **Bactérias**

A presença de bactérias já foi detectada em fermentações alcoólicas naturais como microrganismos contaminantes e indesejáveis ao processo (Schwan et al., 2001). A presença de bactérias foi detectada nas fermentações realizadas com os inóculos de *S. cerevisiae* cepas RL11, CA 116 e FC9. A descrição dos morfotipos e a classificação quanto à coloração de Gram das bactérias encontradas nas fermentações das quatro bateladas realizadas neste trabalho podem ser observadas na Tabela 13.

As bactérias codificadas de 1 a 6 estiveram presentes nas fermentações realizadas com a cepa RL11; dentre elas, apenas 1 bactéria foi classificada como Gram-negativa. Dentre as Gram-positivas, as bactérias 1, 2 e 3 apareceram durante a primeira fermentação, enquanto que os isolados bacterianos 4, 5 e 6 foram provenientes da terceira fermentação. Nas últimas fermentações não houve aparecimento de outros tipos de bactérias.

Nos processos fermentativos durante as sete bateladas realizadas com a levedura CA116, foram encontrados três morfotipos bacterianos, sendo duas delas Gram positivas (7 e 8) e uma Gram-negativa (9). O morfotipo 7 foi encontrado na primeira batelada, e os morfotipos 8 e 9 na segunda e terceira bateladas.

As bactérias 10 e 11, ambas Gram-positivas foram provenientes das fermentações realizadas com a levedura FC9, sendo que a bactéria 10 apareceu durante a terceira batelada e a 11 na última batelada realizada.

TABELA 13 Caracterização dos morfotipos e classificação quanto à coloração de Gram de bactérias presentes nas fermentações realizadas com os inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* cepas RL11, CA116 e FC9

Característica da colônia	Bactéria	x 10 <sup>6</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	% na fermentação
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> ondulado, <sup>3</sup> em camadas, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> vermelha, <sup>6</sup> protuberante, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 1	Gram-positiva (cocos)	0,01
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> liso, <sup>3</sup> granulosa, <sup>4</sup> opaca, <sup>5</sup> vermelha, <sup>6</sup> protuberante, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 2	Gram-negativa (cocos)	0,14
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> lisa, <sup>3</sup> lisa, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> vermelha, <sup>6</sup> elevada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 3	Gram-positiva (cocos)	0,02
<sup>1</sup> Irregular, <sup>2</sup> lobado, <sup>3</sup> lisa, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> rosa, <sup>6</sup> achatada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 4	Gram-positiva (bastonete)	0,13
<sup>1</sup> Irregular, <sup>2</sup> ondulado, <sup>3</sup> lobado, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> vermelha, <sup>6</sup> ondulada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 5	Gram-positiva (cocos)	0,003
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> lisa, <sup>3</sup> liso, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> laranja, <sup>6</sup> protuberante, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 6	Gram-positiva (bastonete)	0,007
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> ondulado, <sup>3</sup> granulosa, <sup>4</sup> opaca, <sup>5</sup> rosa, <sup>6</sup> achatada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 7	Gram-positiva (bastonete)	0,01
<sup>1</sup> Irregular, <sup>2</sup> ondulado, <sup>3</sup> granulosa, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> rosa, <sup>6</sup> achatada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 8	Gram-positiva (cocos)	0,35
<sup>1</sup> Irregular, <sup>2</sup> lobado, <sup>3</sup> lisa, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> laranja, <sup>6</sup> protuberante, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 9	Gram-negativa (cocos)	0,01
<sup>1</sup> Circular, <sup>2</sup> ondulado, <sup>3</sup> granulosa, <sup>4</sup> opaca, <sup>5</sup> rosa, <sup>6</sup> elevada, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 10	Gram-positiva (bastonete)	0,02
<sup>1</sup> Irregular, <sup>2</sup> filamentosa, <sup>3</sup> granulosa, <sup>4</sup> brilhante, <sup>5</sup> rosa, <sup>6</sup> protuberante, <sup>7</sup> viscosa.	Bactéria 11	Gram-positiva (bastonete)	0,08

<sup>1</sup>forma, <sup>2</sup>bordos, <sup>3</sup>estrutura, <sup>4</sup>brilho, <sup>5</sup>cor, <sup>6</sup>elevação, <sup>7</sup>aspecto.

Desta relação de bactérias (Tabela 13), 6 foram classificadas como cocos, e 5 como bastonetes, sendo que 9 foram Gram-positivas e 2 Gram-negativas.

As populações bacterianas normalmente encontradas em diferentes alambiques são diversas e podem apresentar uma variação de até 3400 vezes na proporção entre leveduras e bactérias (Schwan et al., 2001). A maior porcentagem de bactérias presentes encontradas em processos de fermentação artesanal de cachaça são de bactérias Gram-positivas (Santos Júnior et al., 1998; Negrão et al., 1999). De acordo com Schwan (dados não publicados), o gênero *Lactobacillus* representou em um estudo 71% do total de Gram-positivas e 24%

foram do gênero *Bacillus*. Dentre as bactérias isoladas e identificadas destacam-se as produtoras de ácido láctico: *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* e *Streptococcus* spp.

Schwan et al. (2001) relataram que dentre as bactérias encontradas em fermentações de Cachaça, as bactérias produtoras de ácido láctico foram o grupo de bactérias encontrado em populações maiores, apesar de não ter sido capaz de se multiplicar durante o processo fermentativo. As bactérias lácticas podem multiplicar-se no final do processo fermentativo, utilizando o etanol formado como fonte de energia. A presença destas bactérias no mosto pode ser devido à resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. No final do processo fermentativo, as bactérias do ácido láctico podem produzir compostos secundários, principalmente ácidos, que vão aumentar os níveis de acidez da cachaça; portanto, a destilação não deve ser processada horas depois que todo o açúcar tenha sido consumido pelas leveduras. Se a destilação é feita após um longo período em que os açúcares do mosto tenham sido consumidos, os níveis de acidez da cachaça tendem a ser elevados (Pataro et al., 2002).

A contaminação bacteriana é uma das principais causas da redução na produção de etanol durante fermentações desenvolvidas por *S. cerevisiae*. No caso da produção de uísque, a contaminação bacteriana pode comprometer a qualidade do destilado e reduzir a produção final do produto. Não existe ainda uma correlação exata sobre a contaminação bacteriana e a perda de álcool produzido, embora seja óbvio que cada molécula de açúcar utilizada na produção do ácido láctico pelas bactérias resulte na perda de duas moléculas de etanol (Narendranath et al., 1997). No caso da produção de Cachaça artesanal, existem poucos dados a respeito da 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. Algumas características que podem comprometer o padrão de qualidade da

aguardente, como a acidez elevada, podem estar relacionada à presença de um número elevado de bactérias no mosto durante a fermentação (Pataro et al., 2002).

### **Identificação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando técnicas moleculares**

As colônias de leveduras provenientes das fermentações realizadas com as três cepas de leveduras foram submetidas à caracterização eletroforética de cariotipagem para confirmação da persistência da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada. Foram isolados os morfotipos de colônia predominantes e também os diferentes de cada batelada realizada. Dos isolados das fermentações oriundas do inóculo com a cepa RL11 foram isolados para cariotipagem quatorze isolados do morfotipo predominante (colônia 2 citada no item 4.2.1) e dez isolados cujos morfotipos apresentavam diferença em relação ao morfotipo predominante (Figura 5). Onze morfotipos predominantes das cepas CA116 e FC9 foram isolados para a caracterização molecular, como também os morfotipos que diferiram do predominante (Figura 6 a e b).

Dos 24 isolados da cepa RL11 que submeteram a cariotipagem 79% foram confirmados como sendo idênticos a cepa iniciadora, embora 21% dos isolados apresentaram perfil molecular diferente da cepa inoculada; dois morfotipos diferentes entre si mostraram o mesmo perfil molecular e os três outros foram diferentes entre si, como também diferente da cepa inoculada (Figura 7). A mesma porcentagem de perfil molecular foi encontrado com a cepa CA116; portanto, 79% confirmaram-se idênticos a cepa inoculada e 21% apresentaram perfil molecular diferente, confirmando que as duas colônias que diferiram do padrão inoculado, porém apresentando o mesmo morfotipo, apresentaram também o mesmo perfil molecular; sendo assim, basicamente apenas três colônias diferiram em termos moleculares da cepa CA116 inoculada. Em relação a cepa FC9 dos 13 isolados cariotipados 100% apresentaram o

mesmo perfil molecular, mesmo que observado que os morfotipos diferiam do morfotipo predominante (Figura 7).

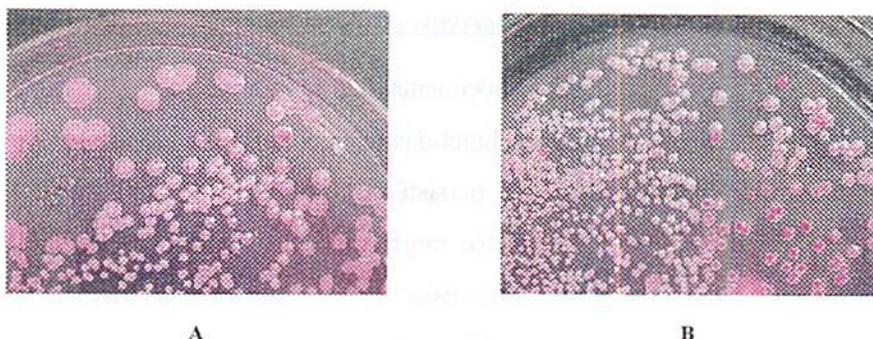
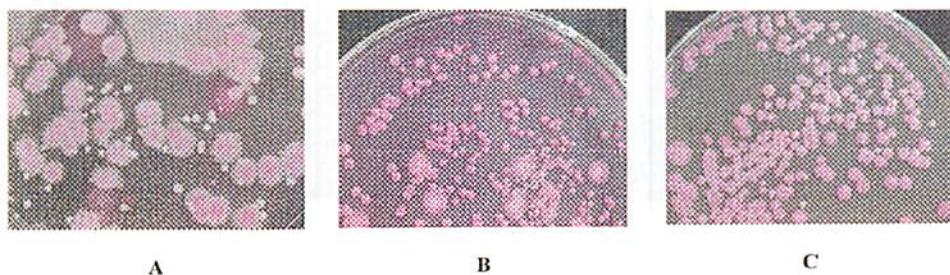


FIGURA 5 Morfotipos das Colônias de leveduras em meio DRBC presentes no inoculo formado com a cepa RL11.

No plaqueamento em meio de cultura DRBC do inóculo com a cepa RL11 observaram-se quatro morfotipos de colônias, dentre os quatro morfotipos observados, colônia 6 de cor laranja foi identificada como bactéria pelo teste de coloração de Gram, como Gram-positiva (Figura 5). Os demais morfotipos foram todos de células leveduriformes (Figura 5). Nas amostras realizadas após a quinta batelada foi observado um número maior de morfotipos de leveduras (Figura 5.b), nove morfotipos (1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 11) descritos na Tabela 13; como também duas colônias bacterianas de números 1 e 2, descritas na Tabela 14. Destes morfotipos as colônias 4, 5, 9, 10 e 11 diferiram do perfil molecular padrão da colônia inoculada 2.

Nas análises microbiológicas do inóculo realizado com a CA116 observaram-se 6 morfotipos diferentes; dentre eles, 3 foram bactérias (classificadas como 7, 8, 9) e os demais como colônias de leveduras, (colônias 12, 13 e 14) (Figura 6, a). Após a segunda batelada ocorreu predomínio da

CA116 e o número de morfotipos contaminantes decresceu significativamente. Os morfotipos 13, 14 e 15 apresentaram perfil eletroforético diferentes da colônia 12 que foi inoculada (Figura 6, b).

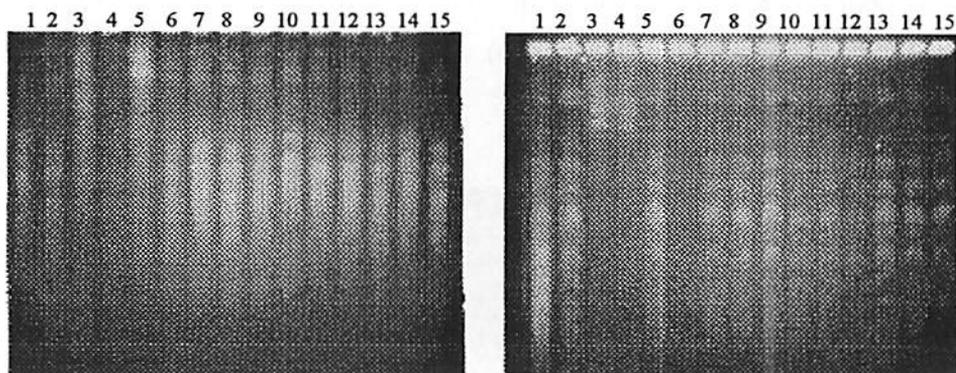


FIGURAS 6 Morfotipos das Colônias de leveduras em meio DRBC presentes no inoculo formado com as cepas CA 116 (a), (b) e FC9 (c).

No inóculo analisado com a cepa selecionada FC9 pôde-se observar (Figura 6, c ), que os morfotipos diferentes encontrados de leveduras, como as colônias 16, 17 e 18, apresentaram o mesmo perfil molecular.

A Figura 7 mostra o perfil eletroforético dos isolados das fermentações realizadas com as cepas RL11 e CA116. A Figura (7, a ) representa o perfil eletroforético da cepa selecionada RL11, sendo que apresentaram perfil molecular diferente da levedura inoculada (6 a 15), as leveduras 5, 9, 10 e 11, sendo, portanto, da esquerda para direita a segunda, terceira, quarta e a quinta, e os demais demonstraram o mesmo perfil eletroforético da cepa inoculada.

As células que foram cariotipadas da cepa CA116 estão representadas na Figura (7, b), quando duas leveduras que diferiram do padrão inoculado apresentaram o mesmo perfil molecular, levedura 13 e 15, as quais diferem de todos os outros, sendo portanto três leveduras *non-Saccharomyces*.



A: 1= controle; 2 = levedura 5; 3 = levedura 9; 4 = levedura 11; 5 = levedura 10; 6 a 9 = levedura 2; 10 = levedura 3; 11 a 15 = levedura 2. B: 1 = controle; 2 = levedura 14; 3 e 4 = levedura 13; 5 = levedura 12; 6 = levedura 15; 7 a 15 = levedura 12.

FIGURA 7 (a) e (b) Perfil eletroforético dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. RL11 e CA116.

De todos os isolados testados 19% foram confirmados ser diferentes molecularmente das cepas inoculadas, o que indica que a utilização das três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas possui característica de dominância e persistência no decorrer do processo fermentativo. Gomes (2002) realizou testes com duas cepas selecionadas de *S. cerevisiae* para produção de cachaça no centro-norte de Minas Gerais e observou que duas linhagens diferentes de *S. cerevisiae* foram encontradas nas dornas inoculadas com uma das cepas selecionadas e com a outra linhagem selecionada foram encontradas quatro linhagens diferentes de *S. cerevisiae*; portanto, ao lado das culturas iniciadoras, cada dorna de fermentação apresentou também a ocorrência de linhagens selvagens de *S. cerevisiae*.

A fermentação natural e espontânea do caldo de cana-de-açúcar proporciona uma grande heterogeneidade e números polimorfos de leveduras (Pataro et al., 2000). O polimorfismo cromossômico pode estar relacionado à duração de 24 horas do processo fermentativo, cujo aumento da concentração de etanol no mosto pode eliminar linhagens menos resistentes (Araújo et al., 1999). O polimorfismo modifica o tamanho e o número de cromossomos, e para o caso como o da *S. cerevisiae*, que apresenta dois cromossomos com o mesmo peso molecular, os de números 15 e 7, migram ao mesmo tempo no gel de eletroforese, como se fossem apenas um cromossomo (Figura 7, a e b.).

As colônias mostradas na Figura 13 apresentaram o mesmo perfil molecular, embora tenham diferido molecularmente.



FIGURA 8 Morfotipos de colônias de leveduras em meio DRBC presentes no inóculo formado com a cepa FC9 que apresentaram o mesmo perfil eletroforético.

No processo fermentativo para produção de vinho, Barros Lopes et al. (1998) citam que as leveduras selvagens ainda podem participar do processo, apesar da inoculação de altas concentrações de uma cepa iniciadora. Na produção de Cachaça esta contaminação leveduriforme está relacionada à adição de caldo de cana-de-açúcar às dornas num período de aproximadamente 24 h, introduzindo, portanto, nova população leveduriforme, aumentando as chances de substituição da cepa prevalecente durante o ciclo fermentativo (Morais et al., 1997).

Independente de qualquer inoculação com culturas iniciais de leveduras selecionadas, as leveduras inoculadas podem ser completamente dominadas por espécies selvagens dentro de algumas semanas (Schutz & Gafner, 1993; Gomes, 2002). Por outro lado, existem isolados de leveduras que tanto persistem quanto dominam o processo (Schwan et al., 2001). Guerra et al. (2001) citam que esta diversidade molecular observada pelo polimorfismo cromossômico em cepas *S. cerevisiae* pode ser devido a características exclusivas do processo fermentativo da Cachaça, como, por exemplo, tempo fermentativo, alta temperatura, alto teor alcoólico e ciclos fermentativos diários, com reciclagem de células durante aproximadamente 6 meses.

#### **4.3 Análise química das bebidas produzidas**

Foram realizadas análises químicas nas amostras de cachaça provenientes de cada repetição realizada e também da bebida envelhecida em barril de carvalho de capacidade 5L, com objetivo de verificar se a bebida produzida pela fermentação das três cepas de células classificadas como *Saccharomyces cerevisiae* atendia os requisitos analisados dentro do padrão permitido. Os valores obtidos dessas análises pode ser observados na Tabela 15.

### **Análise físico-química das bebidas destiladas através das fermentações conduzidas com a cepa iniciadora *Saccharomyces cerevisiae* RL11**

As sete destilações provenientes da cepa selecionada RL11, foram processadas em aproximadamente três horas, com passagem contínua de água na serpentina de modo que a resfriasse, condensando de maneira mais eficaz os vapores quentes oriundos do aquecimento no alambique; os destilados foram amostrados em 0,7 L e processada as análises físico-químicas no Laboratório de Aguardente (DQI/UFLA), como pode ser observado na Tabela 15.

Das análises realizadas, observou-se que a densidade relativa aumentou até a terceira destilação, caiu na quarta destilação, e permaneceu na faixa de 0,94 após envelhecimento em barril de carvalho. O teor de cobre oscilou durante as destilações, decrescendo progressivamente entre as repetições realizadas (Tabela 15).

O grau alcoólico real a 20 °C variou entre 40 a 42, e após envelhecimento apresentou 43% de teor alcoólico (Tabela 15). Embora a análise de álcool superior na primeira destilação tenha ultrapassado o valor máximo permitido, no decorrer das destilações estes valores tenderam a diminuir (Tabela 15). Pode-se observar que os valores de aldeído diminuíram da primeira até a terceira destilação, aumentando na quarta e também nas amostras de cachaça envelhecida. De acordo com as análises das bebidas, a soma dos componentes secundários foi diminuindo de valores durante as destilações (Tabela 15).

De modo geral, conclui-se que após o envelhecimento em barril de carvalho a densidade permaneceu na mesma faixa de valor das outras amostras; cobre teve uma oscilação de valores; extrato seco, acidez, aldeído, ésteres e soma dos componentes secundários houve um aumento nos valores obtidos; não houve uma modificação notória quanto aos álcoois superiores; e, em termos de metanol, houve uma redução de valores.

**TABELA 14 Resultados de análises físico-química das bebidas**

Itens analisados	Limite		Resultado - ano: 2002				
	Min	Max	27/09	28/09	30/09	02/10	Env.
Densidade relativa (20/ 20°C)	-x-	-x-	0,94645	0,94811	0,94973	0,94645	0,94475
Cobre (mg/L)	-x-	3,0	2,20	2,46	2,06	2,35	1,32
Extrato seco a 100°C (g/L)	-x-	-x-	0,048	0,012	0,012	0,16	0,512
Grau alcoólico Real a 20°C (% v/v)	38,0	48,0	42,0	41,0	40,0	42,0	43,0
Acidez volátil em Ácido acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	150,0	62,54	45,22	54,07	73,57	82,64
Alcool superior ( mg/100 mL de Álcool anidro)	-x-	300,0	309,86	292,68	259,15	226,02	286,93
Aldeídos em Aldeído Acético ( mg/100mL de álcool anidro)	-x-	30,0	7,63	7,53	6,29	10,35	11,71
Ésteres em Acetato de Etila (mg/ 100 mL de álcool anidro)	-x-	200,0	17,43	13,39	18,30	19,61	23,41
Soma dos Componentes Secundários ( mg/100 mL de álcool anidro)	200,0	-x-	397,46	358,82	337,81	329,55	304,69
Álcool Metílico ( mL /100 mL de álcool anidro)	-x-	0,250	0,0136	0,0158	0,0181	0,0260	0,0124

Env. = período de envelhecimento da bebida em barril de carvalho ( maturada em 30 dias).

Os álcoois superiores podem também ser originados de processos metabólicos envolvendo açúcares, em que a rota biossintética deste tipo de composto pode sofrer variação conforme a linhagem do levedo. A formação dos álcoois superiores também pode ser influenciada por variáveis, tais como: concentração de aminoácidos e pH do meio reacional, geralmente abaixo de 4,0, chegam a aumentar a produção de álcoois superiores em até 80%; temperatura de fermentação, temperatura muito alta de fermentação podem aumentar a produção de óleo fúsel em até 40%; nível de inoculação e intervalo de tempo entre a fermentação e a destilação (Crowell et al., 1961; Ayrapaa, 1970; Engan, 1970). Um outro fator que contribui com o aumento destes álcoois se refere ao

armazenamento de cana para posteriormente ser moída, como também a utilização da ponta da cana que é rica em aminoácidos, os quais aumentam a produção de álcoois superiores.

Para que ocorram as transformações químicas associadas ao processo de maturação e envelhecimento, a cachaça deve passar por alguns processos como: reações entre os compostos secundários provenientes da destilação; extração direta de componentes da madeira; decomposição de macromoléculas da madeira como: lignina, celulose, hemicelulose, dentre outros, e sua incorporação na bebida; transformações dos materiais extraídos da madeira; reações de compostos voláteis através da madeira do barril; e formação de complexos moleculares estáveis entre os compostos secundários e água e/ou etanol (Piggott, 1989).

O cobre é um elemento encontrado na constituição do material utilizado na construção de alambiques. Este metal contribui na eliminação de determinados odores desagradáveis, observados em cachaça destilada em alambique confeccionado com materiais onde está presente este metal, tal como aço inox. Este elemento, de acordo com a legislação competente, pode estar presente na cachaça na quantidade de 5 mg/L. Normalmente, a Cachaça apresenta teores de cobre maior do que aqueles encontrados nos vinhos, já que este metal provém dos destiladores. O cobre também ocorre nos solos, porém, em pequenas quantidades, podendo ocorrer contaminação pelo uso incorreto de agrotóxicos cúpricos (Faria, 1989). A contaminação da bebida pelo cobre se deve à formação de carbonato de cobre na superfície do metal, que é solubilizado pelos vapores ácidos produzidos durante a destilação, e, por arraste, conduz à contaminação do produto final por ions de cobre (Cardoso, 2001).

Devido à evaporação de água e etanol que ocorre geralmente durante o envelhecimento, pode ocorrer uma diminuição entre 1 a 3% do volume armazenado (Puech, 1983; Pigott, 1989).

Durante o envelhecimento, segundo Mendes et al. (2001), observa-se que a acidez fixa varia pouco, como também os teores de álcoois superiores se mantêm praticamente estáveis; porém os teores de aldeídos voláteis diminuem com o tempo, uma vez que o arredondamento do aroma da Cachaça deve-se à oxidação de aldeídos a ácidos e reações entre ácidos e álcoois formando os ésteres, portanto os 30 dias utilizados neste experimento não foi um período suficiente para a modificação esperada em teor de aldeídos.

Em barril de madeira, na bebida, ocorre um aumento progressivo no teor de extrato seco, observando que, taninos e compostos fenólicos provenientes da lignina chegam a representar 40%. Reações de esterificação também podem ocorrer durante o envelhecimento da bebida, porém em uma velocidade bem menor, requerendo de vários meses a anos para equiparar-se ao teor produzido intracelularmente (Maia, 1994).

#### **Análise físico-química das bebidas destiladas através das fermentações conduzidas com a cepa iniciadora *Saccharomyces cerevisiae* CA116**

Os resultados obtidos com a realização das análises físico-químicas podem ser observados na Tabela 15. Dos resultados obtidos observou-se que a densidade da bebida variou entre 0,94124 a 0,94811 e quando envelhecida obteve um valor de 0,94973 (Tabela 15). O teor de cobre nas bebidas foi diminuindo sucessivamente no decorrer das bateladas, permanecendo na faixa de 1,6 mg/L. Observou-se que o extrato seco das bebidas foi zero, embora, quando envelhecido tenha assumido valores de 1,2; portanto, com o envelhecimento de 30 dias, houve um aumento no teor de extrato seco analisado (Tabela 16).

Quanto ao grau alcoólico real da bebida, ocorreu variação entre 41 a 45%, e após 3º dias em barris de carvalho o valor encontrado foi de 42%. A acidez volátil expressa em ácido acético apresentou valores decrescentes durante as destilações; porém, quando maturada, este valor teve um aumento significativo, expresso por 144 mg/100 mL de álcool anidro.

Os valores de álcool superiores permaneceram entre 120,75 a 200,71 mL/100 mL de álcool anidro (Tabela 15). Os valores de aldeídos diminuíram de 7,84 a 6,10 mg/100 mL de álcool anidro durante as destilações. Os ésteres foram expressos em acetato de etila, o qual durante as destilações, diminuiu de 25.74 a 22.37 mg/100 mL de álcool anidro (Tabela 15). A soma dos componentes secundários apresentou uma oscilação em seus valores baixando de 279,70 a 193,72 mg/ 100 mL de álcool anidro na terceira destilação, valor este abaixo do limite mínimo permitido pelo Ministério da Agricultura. A concentração de metanol encontrada variou entre 0,026 da primeira destilação a 0,007 na segunda.

Na terceira destilação a bebida apresentou um teor de 0,025 mL/ 100 mL de álcool anidro de álcool metílico, o qual, na quarta destilação, cai novamente para 0,006 e com o envelhecimento baixou para 0,0028 mL/ 100 mL de álcool anidro (Tabela 15). Portanto, com o envelhecimento das bebidas observa-se que a densidade da bebida aumentou, houve uma oscilação no valor de cobre que permaneceu na faixa de 1,6 mg/ L; os valores de extrato seco, acidez volátil, álcool superior e aldeídos aumentaram com o envelhecimento da bebida em barril de carvalho; o grau alcoólico real da bebida, após maturada, foi 40%; portanto, diminuindo os valores de ésteres, soma dos componentes secundários e metanol.

TABELA 15 Resultados de análises físico-química das bebidas: CA116

Itens analisados	Limite		Resultado: CA116				
	Min	Max	11/12	12/12	14/12	16/12	Env.
Densidade relativa (20/20°C)	-x-	-x-	0,94804	0,94811	0,94475	0,94124	0,94973
Cobre (mg/L)	-x-	5,0	2,07	1,79	1,64	1,19	1,6
Extrato seco a 100°C (g/L)	-x-	-x-	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
Grau alcoólico Real a 20°C (% v/v)	38,0	48,0	42	41	43	45	40
Acidez volátil em Ácido acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	150,0	47,74	45,65	43,53	27,73	144,0
Alcool superior (mg/100 mL de Álcool anidro)	-x-	300,0	200,71	182,75	120,66	176,48	249,11
Aldeídos em Aldeído Acético (mg/100mL de álcool anidro)	-x-	30,0	7,84	7,25	6,11	6,10	11,44
Ésteres em Acetato de Etila (mg/100 mL de álcool anidro)	-x-	200,0	25,74	24,55	23,41	22,37	nd
Soma dos Componentes Secundários (mg/100 mL de álcool anidro)	200,0	-x-	279,70	260,21	193,72	232,69	nd
Alcool Metílico (mL/100 mL de álcool anidro)	-x-	0,250	0,026	0,0076	0,025	0,0064	0,0028

Env. = período de maturação da bebida em barril de carvalho (maturada em 30 dias). nd = valor não determinado.

**Análise físico-química das bebidas destiladas através das fermentações conduzidas com a cepa iniciadora *Saccharomyces cerevisiae* FC9**

Da cepa FC9, de todas as destilações foram amostrados 0,7 L de Cachaça para análise físico-química das bebidas, uma vez que foram realizadas apenas cinco bateladas devido ao longo período fermentativo.

Os resultados obtidos com a cepa FC9 demonstraram que a densidade relativa oscilou dentre os destilados de 0,94645 no primeiro destilado a 0,95132 no terceiro destilado e após maturada em barril de carvalho permaneceu com o mesmo valor da primeira e quarta destilação (Tabela 16).

O teor de cobre no segundo destilado foi o menor valor dentre os demais de 2,3, tendendo a aumentar nos outros destilados a 3,96 mg/ L no quarto destilado, embora quando envelhecido a bebida apresentou 0,9 mg/L de cobre. Quanto ao extrato seco somente o primeiro destilado apresentou 0,4, sendo que os demais não apresentaram este valor, porém quando envelhecida a bebida apresenta 1,2 g/L de extrato seco (Tabela 16). O grau alcoólico real das bebidas variou entre 39 a 42%, assumindo os menores valores o segundo e terceiro destilado de 41 e 39%, respectivamente; após maturado, o teor alcoólico da bebida é de 42% (Tabela 16). A acidez volátil expressa em ácido acético tende a aumentar até o terceiro destilado e cai no quarto, porém quando maturado este valor aumenta, assumindo 97,5 mg/ 100 mL de álcool anidro. Dentre os destilados os que apresentaram maior valor de álcool superior foi o primeiro e o quarto destilados; portanto, o teor de álcool superior dentre os destilados variou de 159,42 a 246,03; portanto, quando maturado, assume 246,3 mg/ 100 mL de álcool anidro (Tabela 16).

Os teores de aldeídos das bebidas oscilou entre 5,86 do terceiro destilado a 7,35 do último destilado, sendo que nos dois primeiros destilados permaneceu na faixa de 6,0; quando maturado, o teor de aldeídos expresso em aldeído acético foi de 6,8 mg/ 100 mL de álcool anidro. Os maiores teores de éster encontrados dentre os destilados foram os procedentes da primeira e segunda destilação, na faixa de 26,0 mg/ 100 mL de álcool anidro, tendendo a baixar até a quarta, o qual assumiu valor de 23,96 mg/ 100 mL de álcool anidro. A soma dos componentes secundários tende a cair da primeira destilação de 323,28 à terceira destilação de 255,81; porém, na quarta destilação tem seu valor aumentado expresso em 321,25 mg/ 100 mL de álcool anidro (Tabela 16).

TABELA 16 Resultados de análises físico-química das bebidas: FC9

Itens analisados	Limite		Resultado: FC9				
	Min	Max	09/12	15/12	18/12	22/12	P.M.
Densidade relativa (20/ 20°C)	-x-	-x-	0,94645	0,94811	0,95132	0,94645	0,94645
Cobre ( mg/L)	-x-	5..	2,70	2,30	3,03	3,96	0,9
Extrato seco a 100°C (g/L)	-x-	-x-	0,4	0,0	0,0	0,0	1,2
Grau alcoólico Real a 20°C (% v/v)	38,0	48,0	42	41	39	42	42
Acidez volátil em Ácido acético ( mg/100mL de álcool anidro)	-x-	150,0	44,57	60,87	64,00	59,42	97,5
Álcool superior ( mg/100 mL de Álcool anidro)	-x-	300,0	246,03	184,51	159,42	230,50	246,3
Aldeídos em Aldeído Acético ( mg/100mL de álcool anidro)	-x-	30,0	6,53	6,13	5,86	7,35	6,8
Ésteres em Acetato de Etila ( mg/ 100 mL de álcool anidro)	-x-	200,0	26,14	26,78	25,81	23,96	nd
Soma dos Componentes Secundários ( mg/100 mL de álcool anidro)	200,0	-x-	323,28	278,32	255,81	321,25	nd
Álcool Metílico ( mL /100 mL de álcool anidro)	-x-	0,250	0,012	0,02	0,01	0,006	0,0034

P.M. = período de maturação da bebida em barril de carvalho ( maturada em 30 dias)..nd = valor não determinado.

O teor de metanol nas bebidas aumentou de 0,012 a 0,02 da primeira para segunda destilação, respectivamente; portanto, tende a cair sucessivamente nos destilados, sendo que a última bebida apresentou 0,006 mL/100 mL de álcool anidro e quando envelhecido este composto assumiu valores de 0,0034 mL/ 100 mL de álcool anidro (Tabela 16).

Após o período de 30 dias de maturação da bebida em barril de carvalho, foi observado que o teor de cobre baixou significativamente para 0,9 mg/ L; e o grau alcoólico real não apresentou uma divergência das bebidas que abasteceram o barril.

Portanto, conclui-se que a escala adotada pelo laboratório de 20% do volume de destilado a ser destinado a fração cabeça foi ajustado, visto que foram considerados todos os destilados oriundos das bateladas com a cepa FC9 não apresentando teor de álcool superior acima do limite máximo estabelecido pelo Ministério da Agricultura; desta maneira, todas as bebidas produzidas estiveram dentro do padrão exigido.

#### **4.4 Álcoois superiores e Ácidos produzidos durante a fermentação**

A cromatografia gasosa permitiu a identificação de 11 compostos nas amostras no final da fermentação e destilados, sendo: acetaldeído, acetato de etila, metanol, 1-propanol, isobutanol, isoamílico, amílico, 1-hexanol, ácido acético e etanol; como padrão interno foi utilizado o tolueno por não ser um composto constituinte de cachaça.

Para análise qualitativa, foi observado o tempo de retenção dos compostos, sendo o acetaldeído em torno de 2,77 min; acetato de etila aproximadamente 3,6 min; metanol, 3,8 min; propanol, 5,6 min; isobutanol, 6,3; isoamílico, 7,9 min; amílico, 8,4 min; 1-hexanol, 9,6 min e ácido acético 10,4min. uma vez que, para análises quantitativas, foi tomada a área, a qual determinou a concentração de cada composto analisado (Bennett et al., 1961).

Os valores apresentados na Tabela 18 foram obtidos das seis repetições das fermentações e de duas duplicatas injetadas no CG. Observou-se que as fermentações realizadas com a cepa selecionada RL11, o acetaldeído apareceu durante todo o experimento (tanto em fermentado como destilado); como também o 1-propanol, isobutanol e isoamilico; o acetato de etila apareceu em todos os fermentados

As fermentações realizadas com a cepa selecionada CA116, os compostos detectados durante todas as fermentações foram 1-propanol, isobutanol, isoamilico, acetaldeído, ácido acético e 1-hexanol; acetato de etila não foi detectado na primeira fermentação, como também metanol; amílico não apareceu na terceira fermentação; quanto as bebidas destiladas não foi detectado metanol, amílico e ácido acético apareceu apenas no segundo destilado; os demais compostos foram todos detectados nas bebidas.

Com a cepa selecionada FC9, concentrações de acetaldeído foram detectadas em todas as fermentações; acetato de etila não foi detectado na segunda fermentação e pequena concentração de metanol foi detectada somente na primeira fermentação. Os demais compostos apareceram durante todas as fermentações.

Em relação às bateladas (final de fermentação), as concentrações de acetaldeído, metanol, isoamilico, 1-hexanol, ácido acético e isobutanol foram maiores nas fermentações realizadas com cepa RL11. Os valores de álcool 1-propanol, acetato de etila e amílico foram mais nas fermentações realizadas com a cepa CA116 (Tabela 17).

Foi observado que, de modo geral, nas fermentações realizadas com a cepa FC9 os compostos tiveram menores concentrações. Cleto et al. (1995) demonstraram que leveduras diferentes produzem os mesmos componentes secundários do ponto de vista qualitativo, porém quantitativamente apresentam diferenças significativas. Esta observação confirma os resultados obtidos neste

experimento. Quanto às bebidas destiladas, a cepa RL11 apresentou os maiores valores dos compostos analisados, sendo que a cepa CA116 apresentou maiores valores de 1-propanol (Tabela 17).

**TABELA 17** Relação dos compostos identificados através da cromatografia gasosa durante o final de cada batelada, como também das bebidas recém-destiladas

Compostos	RL11		CA116		FC9	
	Fermentado	Destilado	Fermentado	Destilado	Fermentado	Destilado
Acetaldeído (mg/100mL de solução)	3,89	5,32	3,68	3,84	3,84	3,20
Acetato de etila (mg/100mL de solução)	1,85	3,35	2,21	1,27	1,19	1,11
Metanol (mg/100mL de solução)	1,01	1,46	0,65	0,0	0,54	1,18
1-propanol (mg/100mL de solução)	3,38	15,98	4,88	18,39	3,54	10,90
Isobutanol (mg/100mL de solução)	5,06	27,38	4,79	15,94	6,2	17,2
Isoamílico (mg/100mL de solução)	17,8	76,82	15,95	51921,84	16,55	57,96
Amílico (mg/100mL de solução)	1,07	0,94	8,73	0,0	1,74	0,26
1-hexanol (mg/100mL de solução)	2,69	0,77	1,67	0,38	2,92	0,59
Ácido acético (mg/100mL de solução)	36,71	1,95	10,04	1,91	17,38	0,0

O álcool isoamílico foi o composto que esteve presente em maiores concentrações tanto em destilado, quanto em fermentado dentre as três cepas selecionadas, variando de 16,55 a 17,8 mg/100mL de solução em fermentados, e em destilado variou de 21,84 a 76,82 mg/100mL de solução (Tabela 17). Gomes (2002) relata que o álcool isoamílico foi o álcool superior em maior concentração em todas as amostras produzidas pelas duas linhagens De acordo com Oliveira (2001), além dos álcoois superiores serem importantes devido aos

seus odores característicos, esses álcoois possuem ação solvente sobre outras substâncias aromáticas interferindo nos graus de volatilidade destas.

O metanol assumiu os menores valores tanto para fermentado, variando de 0,54 a 1,01 mg/100mL de solução, quanto em destilado, o qual variou entre 0,0 a 1,46 mg/100mL de solução. O álcool amílico variou em fermentado de 1,07 a 8,73 e em destilado de 0,0 a 0,94 mg/100mL de solução. 1-hexanol assumiu valores entre 1,67 a 2,92 em fermentados e 0,0 a 0,77 em destilados. 1-propanol variou em fermentado de 3,38 a 4,88 e em destilado de 10,9 a 18,39 mg/100mL de solução. Em fermentados o álcool isobutanol variou entre 4,79 a 6,2, sendo que em destilados obteve valores de 15,94 a 27,38 mg/100mL de solução (Tabela 17).

O etanol ou álcool etílico apresentou de 8 a 9 % (v/v) em fermentado e em destilado variou entre 40 a 43% (v/v) (Tabela 17). A concentração de ácido acético, provavelmente, resultante do metabolismo de bactérias do ácido acético que constituem a microbiota das dornas em fermentados; variou de 10,04 a 36,71 e em destilados assumiu valores entre 0,0 a 1,95 mg/100mL de solução (Tabela 17). Este composto variou extensamente em diferentes bebidas; na maioria dos casos representa de 60 a 95% da acidez total (Nykanen et al., 1986).

Segundo Oliveira (2001), o acetato de etila é o éster predominante nas bebidas alcoólicas em geral; este éster apresenta um aroma agradável de frutas. Neste experimento a quantificação de acetato de etila esteve entre 1,19 a 2,21 em fermentados e dentre os destilados variou de 1,11 a 3,35 mg/100mL de solução (Tabela 17).

Os acetaldeídos são os intermediários na produção de álcoois superiores e condições que favorecem a produção destes compostos; também favorecem a formação de pequenas quantidades de aldeídos, sendo o principal aldeído associado à fermentação alcoólica. Foi quantificado neste experimento em fermentados entre 3,68 a 3,89 mg/100mL e em destilados variou entre 3,20 a

5,32 mg/100mL de solução (Tabela 18). Nascimento et al. (1997) determinaram, por cromatografia líquida, aldeídos em 56 cachaças, sendo que o acetaldeído foi o aldeído encontrado em maior quantidade em todas as cachaças

#### **4.5 Comparação dos processos fermentativos**

Os processos fermentativos, utilizando as três cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, podem ser caracterizados de acordo com alguns aspectos.

##### **RL11**

\*apresentou o maior número de microrganismos contaminantes (leveduras e bactérias);

\*entre as cepas estudadas foi a que fermentou em um menor período de tempo;

\*apresentou características suaves de fermentação: cheiro suave, formação de microbolhas, massa compacta de células quando decantadas;

\*dos 10 compostos analisados na cromatografia gasosa, 6 apresentaram maior concentração com esta levedura: acetaldeído, metanol, isoamilico, 1-hexanol, ácido acético e isobutanol em fermentados, e nos produtos destilados foram encontrados, além dos compostos mencionados acima, o acetato de etila e álcool amílico.

##### **CA116**

\*foi capaz de persistir e dominar as bateladas sucessivas; apesar de ter sido contaminada durante a multiplicação celular na formação do inoculo;

\*foi a fermentação mais caracterizada como produção de Cachaça apresentando cheiro agradável e pequena formação de espuma;

\*foi a única célula, dentre as três testadas, que apresentou habilidade para flocular, formando uma massa consistente no fundo das dornas, de fácil ressuspensão celular, como mostrado na Figura 8;

\*apresentou pouca contaminação tanto de leveduras selvagens, quanto de bactérias;

\*apresentou o maior teor alcoólico em etanol nas análises cromatográficas de 43%, como também os maiores valores de álcool 1-propanol, acetato de etila e amílico em fermentados e em destilado a maior concentração de 1-propanol.

### FC9

\*dominou completamente a fermentação, 100% de leveduras, e apresentou poucas bactérias;

\*período fermentativo muito longo, o que a torna inviável;

\*características suaves de fermentação de Cachaça quanto ao aroma, formação de microbolhas;

\*dentre as leveduras testadas apresentou uma massa consistente na fase de decantação, porém algumas células ficaram em suspensão ocorrendo perda de inóculo a cada retirada do vinho;

\*de modo geral apresentou os menores valores quantificados nos 10 compostos analisados através de cromatografia gasosa.

Portanto, para produtores do Sul de Minas a melhor cepa selecionada é a CA116, por atender a todos os requisitos de uma produção de cachaça, principalmente quanto à fermentação devido à sua capacidade de persistir e dominar o mosto em fermentação frente a contaminações, dentre as demais características citadas a cima.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos chegar às seguintes conclusões:

\*morfotipos de colônias diferentes não necessariamente indicam que sejam células de cepas diferentes, o que foi confirmado por técnica molecular;

\*a cepa selecionada RL11 apresentou o menor período fermentativo. Apresentou fermentação com maior número de microrganismos contaminantes; porém, dos 10 compostos analisados em cromatografia gasosa, 6 apresentaram maior concentração com esta levedura em fermentados, e 8 em destilados;

\*a cepa selecionada CA116 foi capaz de persistir e dominar a fermentação, dentre os compostos analisados em cromatografia, os maiores valores de álcool 1-propanol , acetato de etila e amílico em fermentados e em destilado a maior concentração de 1-propanol;

\*a cepa selecionada FC9 dominou o período fermentativo, porém devido ao período fermentativo extenso, torna-se inviável para a produção de cachaça; de modo geral, apresentou os menores valores quantificados nos 10 compostos analisados através de cromatografia gasosa.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCAARDE, A R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 54, n. 3, set./dez. 1997
- ALMEIDA, M. E. W.; BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 31, p. 117-123, 1972
- ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção artesanal de aguardente**. Lavras: UFLA, 2001.
- ANDRIETA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) batelada alimentada. *Stab*, Piracicaba, v. 8, n. 5/6, p. 36-40, maio./ago. 1990b.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia - alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. 230 p.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia - alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 230 p.
- ARAÚJO, R. A. C.; GUERRA, J. B.; PATARO, C.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Caracterização molecular por PFGE de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante o ciclo fermentativo para produção de aguardente de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 175.
- AYRAPAA, T. Effect of temperature on the formations of higher alcohols by culture yeasts. *Brauwissenschaft*, Nurnberg, v. 23, n. 1, p. 48-55, 1970.
- BARROS-LOPES, M. de.; SODEN, A.; MARTENS, A. L.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 48, n. 1, p. 279-286, Jan. 1998.

BASSO, L. C. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. **Processo de produção de álcool**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. p. 50-80.

BELIN, J. M. Las leveduras. In: BORGEOIS, C. M.; LARPENT, J. M. **Microbiologia Alimentaria, Fermentações alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1995. cap. 2, p. 19-30.

BENNETT, C. E.; NOGARE, S. D.; SAFRANSKI, L. W. Chromatography: Gas. In: KOLTHOFF, I. M.; ELVING, P. J. (Ed.). **Trealose on analytical chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1961. pt. 1, v. 3, cap. 37.

BERRY, D. R.; BROWN, C. Physiology of yeast growth. In: BERRY, D. R.; STEWART, G. G. (Ed.). **Yeast biotechnology**. London: Allen & Unwin, 1987. Cap. 6.

BIO-RAD. Pulsed field electrophoresis systems: instructions manual and applications guide. United States of America: **Bio-Rad Laboratories**, 1992. (Catalog numbers 170-3612 through 170-3729).

BORZANI, W. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 3, cap. 6. (Série Biotecnologia).

BORZANI, W. et al. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 1.

BOURGEAIS, C. M. ; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 366 p.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 1-14, jan./abr. 1998.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 197-206, jan./mar. 1999.

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

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. In: ——. **Produção artesanal de aguardente**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 218 p.

- CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardente. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção artesanal de aguardente**. Lavras: UFLA, 2001.
- CARVALHO, M.; SILVA, P. S. **Cachaça: uma alegre história brasileira**. São Paulo: Caninha 51, 1988. 157 p.
- CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEÃO, C. Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 665-668, Feb. 1998.
- CASCUDO, L. da Câmara. **História da alimentação no Brasil**. Belo Horizonte, Itatiaia /EDUSP, 1983. Vols 1 e 2
- CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, E. M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 639-646, Sept. 1993.
- CLETO, F. V. G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana**. 1997. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.
- CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Influência de dois tipos de leveduras, do tratamento ácido e da adição de fubá de milho sobre o desenvolvimento do processo fermentativo e qualidade final do destilado. **Tecnologia/Pesquisa, Stab**, Piracicaba, v. 13, n. 3, p. 28-30, jan./feb. 1995.
- CROWELL, E. A. et al. Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. **American Journal Enology and Viticulture**, Washington, v. 12, p. 111-116, 1961.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnologia: manual de microbiologia industrial**. Tradução de Paloma Liras Pain. Zaragoza: Acribia, 1993. 413 p. Tradução de: *Biotechnologie – Ierbuch der angewandten mikrobiologie*. 3. ed. Munchen Wien: R. Oldenbourg, 1989.
- DAWES, I. W.; SUTHERLAND, I. W. **Microbial physiology**. 2. ed. Oxford: Blackwellscientific, 1992. 289 p. (Basic Microbiology, v. 4).
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.

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

DOIN, P. A. Fermentação contínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 3, cap. 7. (Série Biotecnologia).

ENGAN, S. The influence of some aminoacids on the formation of higher aliphatic alcohol and esters. **Journal Institute of Brewing**, London, v. 76, n. 3, p. 254-256, 1970.

FARIA, J. B. **A influência do cobre na qualidade das aguardentes da cana (*Saccharum officinarum*, L.)**. 1989. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP/SP.

FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B.; FRANCO, D. W.; BÔSCOLO, M. Influência do tipo de madeira de tonéis para envelhecimento de aguardente de cana (*Saccharum officinarum* L.) em sua aceitabilidade. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE ANÁLISE SENSORIAL, 1., 1996. Campinas. **Livro de resumos...** Campinas: UNICAMP, 1996. p. 57.

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

FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylenblau farbung der hefezellmembran. **Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Deutschland, n. 218, p. 65-66, 1993.

FLEET, G. H. Wine yeasts. In: FLEET, G. H (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 151-223.

FLEET, G. H.; LAFON-FOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1034-1038, Nov. 1984.

FLIWEERT, M. T.; DIJKEN, J. P. van; PRONK, J. T. Metabolic responses of pyruvate decarboxilase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3399-3404, Sept. 1997

- FUGE, E. K.; WERNER-WASHBURNE, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress response**. Heidelberg: Springer Verlag, 1997. Cap. 2. (Molecular Biology Intelligence Unit).
- FURTADO, S. M. B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas**. 1995. 99 p. (Dissertação de Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts: metabolism and physiology of yeasts**. 2. ed. London: Academic Press, 1989. v. 3, cap. 6.
- GANCEDO, J. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews**, New York, v. 62, n. 2, p. 334-361, June 1998.
- GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 61-64, Jan. 1990.
- GOMES, F. C. O.; PATARO, C.; GUERRA, J. B.; NEVES, M. J.; CORRÊA, S. R.; MOREIRA, E. S. A.; ROSA, C. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 399-406, May 2002.
- GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters Applied in Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.
- HAMMOND, J. R. M. Brewer's yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast technology**. 2 ed. London: Academic Press, 1993. v. 5, cap. 1.
- IGLESIAS, R.; FERRERAS, J. M.; ARIAS, F. J.; MUNOZ, R.; GIRBES, T. Effect of continued exposition to ethanol on activity of the ammonium and fructose transport-systems in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, n. 4, p. 389-391, Feb. 1991.

IHDE, A. J. **The development of modern chemistry**. New York: Dover, 1984. 851 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1985. v. 1, 533 p

JOVALL, P.; TUNBLD-JOHANSSON, I. ; ADLER, L. Analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 154, n. 3, p. 209-214, Aug. 1990.

JOYEUX, A.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 153-156, July 1984.

KUNKEE, R. E.; BISSON, L. F. Wine making yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast technology**. 2. ed. London: Academic Press, 1993. v. 5, cap. 3.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998.

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

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose-transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 24, n. 11, p. 2601-2604, Nov. 1982.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose-transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 22, n. 5, p. 359-363, 1985.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W. R. Loodi & A. A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p. Tradução de : Principles of biochemistry.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. **Principles of biochemistry**. 3. ed. Worth, 2000. 1152 p.

- LEHTONEN, M.; SUOMALAINEN, H. Rum. In: ROSE, A. H. (Ed). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v. 1, cap. 9. (Economic Microbiology series).
- LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, Sept. 1980.
- LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Coord.) **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. cap. 4, p. 79-103. (Biotecnologia, v. 5).
- LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, A. A.; BOZANI, W (Ed.). **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 145-182.
- LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 67, n. 4, p. 485-491, Apr. 1995
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of microorganisms**. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p
- MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **Stab**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, jul./ago. 1994.
- MAIA, A. B.; PEREIRA, A. J. G.; SHAWBE, W. K. **Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Ottoni, 1994. 65 p.
- MAIA, A. B. R. A.; PEREIRA, A. J. G.; SCHAWABE, W. **Tecnologia para produção de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1993. 65 p.
- MAIA, A. B. R. A.; RIBEIRO, J. C. G. M.; SIVEIRA, L. C. I. **Produção artesanal de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 140 p. (I Curso Associação Mineira de produtos de Aguardente de Qualidade)
- MENDES, L. M.; MORI, F. A.; SILVA, J. R. M.; TRUGILHO, P. F. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção artesanal de aguardente**. Lavras: Editora UFLA, 2001.

- MENDONÇA, A. T.; SCHWAN, R. F.; SANCHES, N. M.; DIAS, D.; WHEALS, A. E. Avaliação Fisiológica das Leveduras Fermentativas de Caldo de Cana-de-Açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA SALVADOR, 20., 1999, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador, 1999. 269 p.
- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Characterization and secession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v. 13, n. 2, p. 241-243, Mar. 1997.
- MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 145-150, Jan. 1997.
- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on yeast-catalysed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, Nov. 1997.
- NASCIMENTO, R. F.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destilladas. **Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 7, p. 66-77, 1997.
- NEGRÃO, C.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P. Identificação de bactérias presentes no processo fermentativo de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA SALVADOR, 20., 1999, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador, 1999. 269 p.
- NOVAES, F. V. et al. **I Curso de extensão em aguardente de cana**. Piracicaba: ESALQ. Departamento de Tecnologia Rural, 1974.
- NONATO, E. **A Identificação e Quantificação de Compostos Secundários em Aguardente de Cana por CG e CG/EM**. 1999. 112 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Belo Horizonte, MG.
- NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in a wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.

- NYKANEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlin: Akademic-Verlag, 1983. 413 p.
- OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da cachaça obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135 p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.
- OSBORNE, J. P.; MIRA DE ORDUNÁ, R.; PILONE, G. J.; LIO, S. Q. Adetaldehyde metabolism by wine lactic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.
- PANEK, A. D. Storage carbohydrates. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts: yeasts organelles**. 2. ed. Great Britain: Academic Press, 1991. v. 4, cap. 13.
- PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A. C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.
- PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 24-31, July 2000.
- PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.; MORAIS P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 104-108, jul. 1998.
- PELCZAR, JR. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia – conceitos e aplicações**. v. 1. São Paulo: Makron Books, 1997. 524 p.
- PIGGOT, J. R.; SHARP, R.; DUCAN, R. E. B. **The science and technology of whiskies**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 410 p.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. Dubuque: Wm. C. Brown, 1990. 868 p.
- PUECH, J. L. et al. Vieillissement du cognac. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 4, n. 1, p. 66-80, 1983.

- REMIZE, F.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P.; DEQUIN, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 143-149, Jan. 1999.
- RIGOTT, J. R. (Ed). **Distilled beverage flavour**. Weinheim: VCA, 1989.
- ROSE, A. H. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H. (Ed). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v. 1, cap. 1. (Economic Microbiology series).
- ROSE, A. H. Production and industrial importance of primary products of microbial metabolism. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Primary products of metabolism**. London: Academic Press, 1978. v. 2, cap. 1. (Economic Microbiology series).
- ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic Press, 1970.
- SAS INSTITUTE. **User's guide: Statistics version. 6. ed.** Cary, 1990. 846 p.
- SALES, A. C.; CASTRO, H. A. 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.
- SANTOS JÚNIOR, J. J.; SCHWAN, R. F.; GUIMARÃES, O. Identificação de bactérias presentes na fermentação alcoólica para produção de aguardente. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 6., 1998, Águas de Lindóia. **Resumos... Águas de Lindóia**, 1999.
- SCHUTZ, M.; GAFNER, J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 75, n. 6, p. 551-558, Dec. 1993.
- SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A.; SILVA, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. **Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations**. Unidet Kingdom: Kluwer Academic Publishers, 2001. v. 1, p. 1-8.
- SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, Apr. 1998.

- SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcoólica. 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 artesanal de aguardente**. Lavras: Editora UFLA, 2001.
- SERVISO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DE MINAS GERAIS - SEBRAE. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo horizonte, 2001. 259 p.
- SIEBALD, H. G. L.; CANUTO, M. H.; LIMA, G. M.; SILVA, J. B. B. Alguns aspectos toxicológicos da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 59-62, 2002.
- SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Primary products of metabolism**. London: Academic Press, 1978. v. 2, cap. 10. (Economic Microbiology series).
- STAINER, R.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**. New Jersey: Macmillan, 1993. 689 p.
- SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal Institute of Brewing**, London, v. 85, n. 3, p. 149-156, 1979.
- TAVARES, F. C. A. Processo de Controle Seletivo de Leveduras Contaminantes. **Stab**, Piracicaba, p. 45-48, 1992.
- TOKUOKA, K. A review sugar and salt tolerant yeast. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 74, n. 2, p. 101-110, Feb.1993.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbioly: an introduction**. 6. ed. California: Benjamin Cummings, 1998. 832 p.
- VALSECHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz Queiroz, 1960. 90 p.
- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. Tradução de Jaime Esain Escobar. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1986. 294 p. Tradução de: **Der Wein: bereitung, behandlung, untersuchung**. 9 ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1984
- WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chicheste, England: John willy, 1998. 350 p.

WARD, O. P. **Biotecnologia de la fermentacion: principios, procesos e productod.** Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acribia, 1991. 265 p. Tradução de: **Fermentation Biotechnology.** Canada: Open University Press, 1989.

WATSON, D. C. Yeast in distilled alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast technology.** 2. ed. London: Academic Press, 1993. v. 5, cap. 6.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnology,** New York, v. 17, n. 12, p. 482-487, Dec. 1999.