

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA

**SELEÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Saccharomyces cerevisiae*  
PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE**

Belo Horizonte

2019

FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA

**SELEÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A  
PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

2019

Alvarenga, Flávia Barbosa Magalhães.

A473s Seleção de isolados ambientais de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de cachaça de alambique / Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga. – 2019.  
76 f. : il.

Orientador: Carlos Augusto Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Cachaça – Produção – Teses. 2. *Saccharomyces cerevisiae* – Teses. 3. Levedura – Teses. 4. Compostos voláteis – Teses. 5. Isolados ambientais. 6. Análise sensorial – Teses. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:663.59

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**SELEÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE**

**FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 14 de março de 2019, pela banca constituída pelos membros:

*Carlos Augusto Rosa*

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Orientador e Presidente da Comissão)  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

*Ana Luiza Freire*

Dra. Ana Luiza Freire  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

*Fátima de Cássia Oliveira Gomes*

Profª. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 14 de março de 2019.

Dedico este trabalho a meu avô Fernando (*in memoriam*) por ser o meu exemplo de vida, um homem dedicado e trabalhador. Aos meus pais, Teresa e Marcio, meus irmãos, Pedro e Marcio, e ao meu grande companheiro, Júnior, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ninguém chega a lugar nenhum sozinho, e se hoje defendo o meu mestrado e tenho cada página dessa dissertação escrita, foi graças ao apoio dos que me rodeiam. Eu nada seria se não tivesse Deus em minha vida, pois somente Ele consegue acalmar meu coração e aliviar minhas angústias.

O meu muito obrigada ao Carlos, meu orientador, por acreditar em uma menina desconhecida que bateu na porta da sala dele sem nem marcar hora. Por ter me dado a oportunidade de trabalhar com o melhor tema, em um ótimo laboratório e cercada de pessoas maravilhosas. Obrigada pela paciência, pelo exemplo de profissional e pelos ensinamentos, inclusive por me ensinar que “quem espera nunca alcança”, “devagar é que não sei vai longe” e que “quem fica parado é poste”.

Ana Luiza, serei eternamente grata por ter me ensinado tudo no laboratório, desde como usar uma pipeta até os experimentos mais mirabolantes, sempre com muito carinho e delicadeza.

Thelma, minha duplinha durante muito tempo, obrigada por ter sido a primeira a me acolher de braços abertos, pôr na hora dos desesperos me abraça e falar “pode chorar”.

Ana Cristina, que menina excepcional, que coração lindo é esse que você tem?! Obrigada por me ajudar nos experimentos mais difíceis e demorados, por me escutar e me acalmar e principalmente, por me levar para o GOU.

Katharina, até carrinho de compra já levou no seu carro para me ajudar. Obrigada pelas conversas, risadas e por cada palavra de conforto.

Ana Raquel e Thais, que coração gigante vocês têm. Agradeço a vocês por todo apoio, por cada conversa, e pelas ajudas que me deram nos experimentos sempre que precisei.

Karina, que já carregou 70 litros de caldo de cana no seu carro para mim, não sei nem como agradecer. Obrigada por ser essa pessoa prestativa, parceira e amiga. Mesmo com Gabs na barriga nunca deixou de ajudar em nada.

Marina Perbone as caminhadas de volta para casa nunca seriam as mesmas sem você, obrigada pela companhia, amizade, e pelas conversas.

Arthur, Fernanda, Giulia, Cris, Carol, Mayra, Gisele, Elaine Carvalho, Maria Clara, Marina Bahia, Raissa, Lívia, Ludmilla, Elaine Costa, professora Camila se a caminha foi dura, sem vocês teria sido impossível.

Luiz Flamarion, produtor da cachaça Áurea Custódio, obrigada pela doação do caldo de cana, pela conversa e por todas as dicas que me deu. Dhionne, sem sua ajuda na fermentação e na destilação não teria conseguindo, sou muito grata a você.

Júnior, acho que nem todo agradecimento do mundo seria suficiente por tudo que fez por mim, por cada noite em claro e por todos os finais de semana que me fez companhia no laboratório, pelas ajudas com as apresentações e com as estatísticas. Obrigada por, principalmente ao longo desses últimos dois anos, ter se mostrado o melhor companheiro do mundo.

Dona Tuca e Seu Marcio, mãe e pai, obrigada por serem os melhores pais que Deus poderia dar a alguém. Por sempre me apoiarem, nunca me deixarem desistir, por me ensinarem a correr atrás dos meus sonhos e acima de tudo, por serem meus exemplos vida. Obrigada por escutarem meus choros e por simplesmente dizerem que tudo vai dar certo, afinal, "se fosse para dar certo de primeira não chamaria experimento" ne pai?!

Meus irmãos, Pedro e Marcio, meus heróis e exemplos, obrigada pelo o companheirismo em todos os momentos e por me fazerem sempre querer ser melhor.

Vô, Deus te levou para junto Dele ainda no meio dessa minha caminhada, mas foi sempre você que me deu forças para seguir atrás dos meus sonhos e nunca desistir. Foi tudo por você! Vó Tetê e Marcia, obrigada pelas orações e carinho. Tia Ana Amélia, obrigada por ser minha referência de casa nessa cidade grande.

Minhas amigas das antigas Thamiris e Jéssica, o apoio das duas foi essencial para mim, sempre com palavras de carinho, com reza forte e pensamentos positivos.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada, meu muito obrigada! Aos amigos do laboratório, um até breve e obrigada por terem sido minha segunda família por esses dois anos.



O que vocês fizerem façam de todo o coração, como se estivessem servindo o Senhor e não às pessoas. Lembrem que o Senhor lhe dará como recompensa aquilo que ele tem guardado para o seu povo, pois o verdadeiro Senhor que vocês servem é Cristo.

(Colossenses 3: 23-24)

## RESUMO

A melhoria da qualidade da cachaça produzida no Brasil se faz necessária devido ao aumento do mercado consumidor e a busca por novos sabores e aromas. A qualidade da cachaça está diretamente relacionada a identidade das leveduras e às condições de estresse as quais são submetidas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo selecionar leveduras ambientais que possam ser utilizadas na fermentação da cachaça visando à produção de uma bebida com alta qualidade sensorial. Foram testados 74 isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidos de cascas de arvores, líquens e madeira em decomposição de diferentes ecossistemas brasileiros. Estas leveduras foram submetidas aos testes de: assimilação de lisina, produção de sulfeto de hidrogênio, estresse fermentativo (pH, temperatura, glicose, sacarose e etanol), produção de invertase, capacidade de floculação, fermentação em escala laboratorial, produção da cachaça em escala piloto. As linhagens foram comparadas com a levedura *S. cerevisiae* UFMG-CM-1007, reconhecida como uma boa produtora de cachaça. Três isolados ambientais foram selecionados a partir dos testes descritos acima, e com estes foi produzido cachaça em escala piloto. As cachaças produzidas foram analisadas por cromatografia gasosa e os perfis de compostos encontrados foram semelhantes, sendo observada a formação de álcoois, cetonas, aldeídos, clicoalcanos e ésteres. As cachaças produzidas foram avaliadas sensorialmente utilizando teste de aceitação. Todas as cachaças tiveram aceitação tão boa quanto a cachaça controle nos testes sensoriais realizados. Estes resultados sugerem que estas linhagens ambientais de *S. cerevisiae*, C2, C45 e C145, apresentam potencial para serem utilizadas como culturas iniciadoras para a produção de cachaça de alambique.

**Palavras-chave:** Produção de Cachaça. *Saccharomyces cerevisiae*. Levedura. Linhagens Ambientais. Compostos Voláteis. Análise Sensorial.

## ABSTRACT

The improvement of the quality of cachaça produced in Brazil is necessary due to the increase in its consumer market and the search for new flavors and aromas. The quality of the cachaça is directly related to the identity of the yeasts and the stress conditions that are submitted. Thus, this work aims to select new yeasts that can be employed in the cachaça fermentation aiming at the production of a differentiated beverage with high sensorial quality. A total of 74 *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, isolated from the bark of trees, lichens, and decomposing wood of different Brazilian ecosystems, were tested. These yeasts were tested for lysine assimilation, hydrogen sulfide production, fermentative stress (pH, temperature, glucose, sucrose, and ethanol), invertase production, flocculation capacity, laboratory scale fermentation, and pilot scale production. The strains were compared with the *S. cerevisiae* UFMG-CM-1007 yeast, which is recognized as a good cachaça producer. Three environmental isolates were selected from the tests described above, and with these was produced the cachaças in the pilot scale. The produced cachaças were analyzed compared by gas chromatography, and the founded profiles of compounds were very similar, being observed the formation of alcohols, ketones, aldehydes, clicoalcanos, and esters. The produced cachaças were also compared using a sensorial acceptance test. All the cachaças were well accepted in the sensorial tests carried out. These results suggest that these environmental strains of *S. cerevisiae*, C2, C45, and C145, can be used as starter cultures to produce alembic cachaça.

**Keywords:** Cachaça Production. *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. Environmental lineage. Volatile Compounds. Sensorial Analysis.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1.	Cana de Açúcar .....	18
2.2.	Processo de Produção da Cachaça.....	19
2.3.	Fermento.....	22
2.3.1.	Saccharomyces cerevisiae como Cultura Iniciadora na Produção de Cachaça	24
2.4.	Formação de Compostos Secundários .....	25
2.5.	Importância Econômica da Cachaça.....	28
3.	OBJETIVO .....	30
3.1.	Objetivos Específicos .....	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1.	Microrganismos.....	31
4.2.	Teste de Assimilação de Lisina.....	31
4.3.	Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S).....	31
4.4.	Teste de Estresse Fermentativo .....	35
4.4.1.	Crêterios de Seleção das Linhagens de S. cerevisiae com Melhores Desempenho nos Testes de Estresse.....	35
4.5.	Teste de Invertase .....	36
4.5.1.	Obtenção da Curva Padrão de Glicose .....	36
4.5.2.	Medida da Atividade de Invertase .....	37
4.6.	Teste de Floclulação.....	37
4.7.	Teste de Fermentação em Caldo de Cana de Açúcar para Avaliação da Produção de Etanol .....	38

4.8.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	38
4.9.	Produção das Cachaças em Escala Piloto.....	39
4.10.	pH e Acidez e do Mosto Fermentado e da Cachaça.....	39
4.11.	Análise da Produção de Compostos Secundários por Cromatografia Gasosa	40
4.12.	Análise Sensorial .....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1.	Teste de Lisina e Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S).....	41
5.2.	Teste de Estresse Fermentativo .....	41
5.2.1.	CrITÉRIOS de Seleção das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> com Melhores Desempenho nos Testes de Estresse.....	42
5.2.2.	pH.....	43
5.2.3.	Glicose e Sacarose .....	44
5.2.4.	Etanol .....	44
5.2.5.	Temperatura .....	45
5.3.	Teste de Invertase .....	45
5.4.	Floculação.....	47
5.5.	Seleção das Melhores Leveduras .....	48
5.6.	Teste de Fermentação .....	48
5.7.	Produção das Cachaças em Escala Piloto.....	53
5.8.	Análise por Cromatografia Gasosa das Cachaças Produzidas com as Linhagens Seleccionadas.....	54
5.9.	Análise Sensorial .....	56
6.	CONCLUSÕES.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limite de concentração de produtos secundários presentes na cachaça.....	26
Tabela 2 – Leveduras pré-selecionadas para o presente estudo, local de coleta e substrato onde foram isoladas. ....	33
Tabela 3 – Leveduras com os melhores desempenhos nos testes de estresse e métricas aplicadas.....	42
Tabela 4 – Leveduras com os piores desempenhos nos testes de estresse e métricas aplicadas.....	43
Tabela 5 – Média da atividade de invertase obtida pelas leveduras testadas (mg/L) e diferença das médias entre a atividade de invertase da levedura analisada e da levedura controle.....	46
Tabela 6 – Informações de Isolamento de Leveduras por Local e Substrato (Fonte SAFAR, 2013).....	49
Tabela 7 - Média do consumo de açúcar, em graus brix, a cada 4 horas, durante 24 horas. ....	50
Tabela 8 – Concentração em g/L dos compostos encontrados no início (T0) e no fim da fermentação (T24) por HPLC. ....	52
Tabela 9 - Determinação de acidez e pH do mosto fermentado e da cachaça. ....	54
Tabela 10 – Compostos encontrados por Cromatografia Gasosa. ....	55
Tabela 11 – Informações socioeconômicas dos participantes da análise sensorial.....	57
Tabela 12 – Média e desvio padrão das notas para cada quesito avaliado na análise sensorial.....	58



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cachaça é uma bebida típica do Brasil produzida a partir do caldo de cana de açúcar fermentado e destilado. A produção data do início da colonização, e, até meados da década de 1940, era realizada na área rural utilizando processos rudimentares, não havendo padrão de qualidade. A partir de então, a produção doméstica aumentou e o processo produtivo vem sendo aperfeiçoado, proporcionando melhorias no rendimento, produtividade e qualidade da bebida.

Estima-se que no Brasil há, em atividade, cerca de 40 mil produtores de cachaça, os quais geram em torno de 600 mil empregos diretos e indiretos. O estado de São Paulo se destaca como maior produtor nacional de cachaça de coluna e, Minas Gerais, como maior produtor de cachaça de alambique. Nos últimos anos a cachaça vem conquistando espaço no mercado de bebidas *premium* e apresenta boas previsões de crescimento do consumo, devido principalmente à valorização e reconhecimento de seu valor como bebida típica pela população brasileira. A cachaça deixou de ser considerada uma bebida de baixa qualidade e passa a ser comparada a bebidas nobres como uísque e vodca.

Vários fatores podem influenciar a qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, mas a identidade das leveduras e as condições de fermentação são determinantes para o sabor. Existem diversos gêneros e espécies de leveduras fermentativas do caldo de cana de açúcar, mas a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação alcoólica, sendo predominante na fermentação espontânea. Portanto, com o objetivo de obter uma melhoria na qualidade da cachaça e maior eficiência no processo produtivo, faz-se necessário a realização de seleção de leveduras que sejam resistentes ao processo de produção da cachaça e que produzam uma bebida com alta qualidade sensorial. No mercado estão disponíveis duas culturas iniciadoras para a cachaça, sendo uma licenciada pela UFMG, com o nome comercial de CanaMax, e outra licenciada pela UFLA (Fermento CA-11).

Estudos de biodiversidade, identificação e origem das leveduras associadas à produção da cachaça são de grande importância para a determinação dos mecanismos de ação destes microrganismos durante a fermentação. Os trabalhos



baseados na ocorrência de *S. cerevisiae* em ambientes naturais têm levado ao isolamento de várias linhagens filogenéticas desta espécie. Esta levedura foi isolada de árvores de carvalho e outras *Fagaceae* no hemisfério norte, Ásia e mediterrâneo. No Brasil, até 2016, nenhum estudo havia revelado ainda os possíveis habitats naturais desta espécie de levedura, diferentes dos ambientes de fermentação. BARBOSA e colaboradores (2016) mostraram que esta levedura está associada com casca de árvores nativas brasileiras, e por meio do sequenciamento completo do genoma, observaram similaridade genética destas com isolados ambientais obtidos na América do Norte e Japão. Constataram também a inserção de genes de linhagens de vinho nas linhagens ambientais do Brasil, e indícios de hibridização destas com *S. paradoxus*.

Em 2018, BARBOSA e colaboradores realizaram o sequenciamento do genoma de 22 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de fermentação de cachaça. Os genomas destas leveduras foram comparados com linhagens ambientais, produtoras de vinho, cerveja, pão e isolados de outros substratos em diferentes regiões do planeta. A partir destas análises foi possível constatar que a maior parte da ancestralidade das leveduras de cachaça é proveniente das leveduras de vinho, e que estas parecem sofrer uma baixa influência genética das leveduras ambientais brasileiras. No entanto, estes autores mostraram que linhagens ambientais também podem ser isoladas de dornas de fermentação de cachaça, mas em baixo número. Assim, o presente trabalho tem como objetivo principal testar os isolados ambientais brasileiros de *S. cerevisiae* para a produção de cachaça de alambique. Estes isolados nunca foram testados em relação a produção desta bebida e podem representar fontes de novos aromas que agregariam valor de mercado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cana de Açúcar

A cana de açúcar é uma gramínea perene, do gênero *Saccharum*, que se desenvolve em forma de touceira. Suas porções são os colmos, as folhas, inflorescências, rizomas e raízes. O gênero *Saccharum* compreende seis espécies, sendo elas *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. No entanto, as variedades comerciais encontradas hoje em dia, são híbridos resultantes do cruzamento entre as espécies (FIGUEIREDO, 2008; GRIVET et al., 2004). Originária do sudeste Asiático, a cana de açúcar é própria de climas tropicais e subtropicais. Apresenta um dos genomas mais complexos entre as plantas cultivadas, com alta ocorrência de poliploidia e aneuploidia, representando um grande desafio aos pesquisadores que buscam o seu melhoramento genético (GRIVET & ARRUDA, 2002).

No Brasil, a cana de açúcar é cultivada desde a época da colonização. Entretanto, ganhou destaque na agricultura a partir da década de 1970 e desde então o setor sucroenergético vem se adaptando às necessidades mercadológicas e ganhando espaço tanto na área agrícola, quanto na industrial. Com o aumento das pesquisas e os avanços tecnológicos aplicados no cultivo da cana de açúcar, foi possível, além do aprimoramento do manejo da plantação, o desenvolvimento de novas espécies com maior adaptabilidade de cultivo às diferentes regiões do Brasil (GOES et al., 2009).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2018/2019 de cana de açúcar no Brasil está estimada em 635,51 milhões de toneladas. O que representa um aumento de 0,4% quando comparada à safra de 2017/2018 que fechou em 633,26 milhões de toneladas. A cana é destinada à fabricação de açúcar com produção de cerca de 34,25 milhões de toneladas, etanol com 30,41 bilhões de litros, etanol anidro com 11,24 bilhões de litros e etanol hidratado com 19,17 bilhões de litros na safra de 2018/2019 (CONAB, 2018).

## 2.2. Processo de Produção da Cachaça

Cachaça, de acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é a denominação típica e exclusiva da bebida produzida no Brasil a partir do caldo de cana-de-açúcar fermentado e destilado, com graduação alcoólica entre 38% a 48% em volume a 20°C, podendo ser acrescida de açúcares, em até 6 gramas de sacarose por litro de mosto, e apresenta características sensoriais peculiares (BRASIL, 2005).

A cachaça é produzida por meio da fermentação do caldo da cana-de-açúcar e posterior destilação. O caldo de cana é obtido a partir do esmagamento da cana-de-açúcar em uma moenda, e em seguida é decantado para a separação das impurezas, podendo ser diluído, com água, até atingir de 14 e 16 graus brix (RAMOS & GONÇALVES, 2018). A fermentação da cachaça é composta por duas etapas. A primeira é a propagação do microrganismo que é realizada sob intensa aeração e a concentração de açúcar não pode ser superior a 3%. Os ingredientes utilizados para a produção do fermento são variáveis de acordo com cada produtor – podendo ser farinha de milho, farelo de arroz ou de soja – no entanto, deve ser capaz de suprir todas as necessidades nutricionais das leveduras a fim de que estas possam se desenvolver de forma adequada e garantindo assim, boa fermentação. O processo de preparação do fermento pode durar de 5 a 30 dias e ocorre dentro da própria dorna de fermentação (PAULO et al., 2016; ROSA et al., 2016).

Após a preparação do fermento, inicia-se a segunda etapa que é de fato a fermentação, onde o fermento é misturado ao caldo de cana (com concentração de açúcar em torno de 15%) e há a conversão do açúcar em CO<sub>2</sub> e etanol. O final da fermentação é determinado pelo consumo total do açúcar do caldo de cana pelas leveduras e dura em média 24 horas (ROSA et al., 2016).

Tradicionalmente as cachaças são produzidas a partir de fermentação espontânea pela ação dos microrganismos provenientes da manipulação da colheita, transporte e moagem da cana; mas também podem ser utilizados fermentos comerciais. A duração média do processo fermentativo do caldo de cana é de aproximadamente 24 horas e de modo geral, esta pode ser conduzida por três diferentes sistemas: convencional em batelada, descontínuo alimentado e contínuo.

O método convencional consiste em colocar o inóculo e todo meio de fermentação juntos na dorna de fermentação, e após 24 horas, o inóculo é descartado, é feita a destilação, e o processo pode ser reiniciado. As leveduras ficam expostas a quantidades elevadas de etanol, o que pode influenciar no metabolismo destes microrganismos. No sistema de bateladas sucessivas, ocorre o reaproveitamento do fermento (inóculo) em várias fermentações subsequentes. No sistema descontínuo alimentado, a dorna é alimentada aos poucos, de modo a garantir que a concentração de açúcar pré-estabelecida. Já no processo contínuo, alimenta-se a dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração conveniente, e retira-se também de forma contínua parte do líquido, livre de leveduras, a ser destilado (LIZ et al., 2016).

Ao longo do processo fermentativo é importante fazer o controle das seguintes etapas, sendo elas:

- concentração de açúcares: mensurada por meio de um refratômetro (em graus Brix) durante todo o processo, em intervalos regulares e deve representar uma queda indicando que o açúcar consumido pelas leveduras é transformado em álcool;
- temperatura do mosto: já que a cachaça é produzida em várias partes do país e em diferentes épocas do ano, a variação de temperatura é muito grande (15 a 42°C), no entanto, a ideal é entre 20-32°C;
- tempo de fermentação: o ideal é de 12 a 24 horas;
- aroma: deve ser característico do substrato fermentado, agradável e frutado, qualquer alteração com formação de odores desagradáveis, pode indicar contaminação;
- aspecto da espuma: deve ser leve e fácil de ser rompida, quando esta se encontra densa e pesada, de forma a dificultar a liberação do CO<sub>2</sub>, pode ser um indício de contaminação;
- pH do caldo de cana: deve estar entre 5 e 5,5 indicando bom estágio de maturação;
- rendimento: fator mais importante e sofre influência de todos os aspectos anteriores.

Se todos os parâmetros acima citados forem observados de forma efetiva e de acordo com as orientações técnicas, é possível garantir o máximo de rendimento e qualidade (PEREIRA et al., 2006; ROSA et al., 2016).

Posteriormente a fermentação completa do mosto, obtém-se o vinho que apresenta constituintes de natureza sólida, líquida e gasosa. Após a decantação, o vinho é submetido ao processo de destilação, e são formadas duas frações: flegma e vinhaça. A flegma, produto principal da destilação, é constituída por uma mistura hidroalcoólica impura, com teor alcoólico variando de acordo com o equipamento utilizado para a destilação. A vinhaça é o resíduo da destilação formada por água, sais, leveduras, bactérias e resíduos diversos (ROSA et al., 2016).

O processo de destilação visa separar e concentrar os compostos voláteis presentes no vinho da fração residual que será descartada. Nos alambiques, ocorre a destilação simples, pois separa gradualmente os compostos baseados na volatilidade. Desta forma, os compostos com maior volatilidade, como metanol e acetaldeído, são destilados primeiro na fração denominada “cabeça”, que corresponde a cerca de 5-10%. Os compostos com menor volatilidade como os álcoois superiores, são destilados nas frações “coração” e “cauda”. A parte mais importante do destilado é o “coração”, onde é possível encontrar aldeídos, ésteres, álcoois superiores além de alguns produtos secundários, e representa 80 a 85% do volume total. A cauda corresponde a aproximadamente 10% do volume e contém compostos secundários com alto ponto de ebulição (SCHWAN et al., 2001; MAIA & CAMPELLO et al., 2006; ROSA et al., 2016). Um dos principais fatores para uma boa destilação da cachaça é a definição precisa do coração da bebida, para tanto, é necessário a determinação e padronização do brix inicial do mosto e do teor alcoólico do vinho (SORATTO, 2007).

Existem dois tipos de cachaças produzidas no Brasil, a cachaça de coluna, também denominada cachaça industrial, e a cachaça de alambique ou artesanal. Legalmente não existe diferenciação entre as duas, mas há variação no processo de destilação (SEBRAE-MG, 2013). Enquanto a cachaça de coluna normalmente é produzida em grande escala pelas indústrias e a destilação ocorre em colunas de aço inoxidável, a cachaça de alambique é produzida em escala reduzida, mas possui grande expressividade comercial. Sua formulação é variável entre os produtores e a

destilação ocorre em alambiques, geralmente de cobre (ROSA et al., 2016; MARTINS et al., 2018).

### 2.3. Fermento

Vários fatores podem influenciar a qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, mas a identidade de leveduras e as condições de fermentação são determinantes para o sabor (OLIVEIRA et al., 2005). Existem muitos gêneros e espécies fermentativas do caldo de cana-de-açúcar, mas a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação alcoólica, além de ser predominante na fermentação espontânea da cachaça e se destacar pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (VALÉRIO JÚNIOR et al., 2018; GOMES et al., 2007).

A população microbiana encontrada naturalmente no caldo de cana é composta por leveduras e bactérias, onde as leveduras são as grandes responsáveis pelo consumo do açúcar e consequente produção do etanol. Além disto, essas também são capazes de produzir compostos secundários (ROSA et al., 2016). Algumas bactérias, principalmente as bactérias ácido lácticas, podem influenciar positivamente no perfil sensorial das cachaças, agregando aromas de frutas e amanteigados (MAPA DA CACHAÇA, 2019). Já foram isoladas diferentes linhagens de leveduras nas dornas de fermentação de cachaça, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces* (ROSA et al., 2016). As bactérias mais comumente encontradas são as bactérias do ácido láctico, e as principais espécies são *Lactobacillus casei*, *L. fermentans* e *L. plantarum* (GOMES et al., 2010).

A maioria das cachaçarias tradicionais utiliza a fermentação natural (selvagem ou espontânea), no entanto há aquelas que utilizam fermento prensado, misto, seco (granulado) e selecionado. O fermento natural ou selvagem é composto por leveduras naturalmente presente na cana, no mosto e equipamentos, podendo haver variações da microbiota de acordo com o produtor e com a região (ROSA et al., 2016). O fermento natural pode ser preparado de diferentes formas, utilizando-se apenas o caldo de cana ou adicionando a este farelo de arroz, fubá de milho e frutas cítricas. Esta mistura fica em repouso por até 24 horas, e é adicionado mais caldo de cana

diluído em uma proporção de (1:1) por 24 horas (CARDOSO, 2001). Diferentes linhagens indígenas de *S. cerevisiae* podem ser encontradas nas dornas durante a produção (PATARO et al. 2000; GUERRA et al. 2001; ARAÚJO et al. 2007; CONCEIÇÃO, 2015; BARBOSA, 2016; ROSA et al., 2016). A falta de controle sobre a microbiota responsável pela fermentação é um dos aspectos que podem levar a variações organolépticas na bebida.

O fermento prensado é o mesmo utilizado na fabricação de pães, é considerado um método simples e rápido, porém, é necessário ser acondicionado sob refrigeração. Para seu preparo é necessário de 20 a 50 gramas de fermento para cada litro de caldo de cana. O Brix inicial deve ser baixo a fim de facilitar o desenvolvimento das leveduras ali presentes, quando este cair à metade, adiciona-se mais caldo de cana, dobrando o volume; esse processo é repetido até que o fermento atinja de 20 a 30% da capacidade da dorna de fermentação (MUTTON & MUTTON, 2016).

O fermento misto é largamente utilizado em diversas cachaçarias e consiste na mistura do fermento natural, com o fermento prensado. No entanto, utiliza-se uma concentração menor de fermento prensado, não ultrapassando 20g/L de mostro. O fermento granulado ou seco, não necessita de refrigeração e apresenta uma contagem de celular três vezes maior do que o prensado, o que possibilita o início da mais rápido da fermentação (MUTTON & MUTTON, 2016).

O fermento selecionado, também chamado de culturas iniciadoras, vem ganhando espaço nas destilarias tradicionais. HOLZAPFEL (1997) define culturas iniciadoras como um preparado contendo um grande número de microrganismos viáveis que pode ser utilizado em processos fermentativos com o intuito de acelerá-lo. Devem ser adaptadas ao substrato no qual serão utilizadas, o que facilita o controle e aprimoramento da fermentação garantindo a qualidade e padronização do produto final. É facilmente multiplicável o que facilita e acelera o preparo do inóculo e garante uma alta concentração celular, além de ser mais resistente que os demais, implicando em maior reutilização. Normalmente apresentam características floculantes - com o passar do tempo da fermentação as leveduras se aglomeram formando flocos que se depositam no fundo da dorna - o que facilita a separação do vinho do fermento (BERNARDI et al., 2008; GOMES et al., 2010; CANUTO et al., 2013). O uso de linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas constitui um meio alternativo de controle mais

eficiente ao processo fermentativo (GUTIERREZ et al., 1997; LOPEZ et al. 2003; ROMANO et al. 2003; VALERO et al. 2005; SILVA et al. 2006; ROSA et al., 2016).

### **2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* como Cultura Iniciadora na Produção de Cachaça**

*Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura com aplicação biotecnológica devido a sua fisiologia única e grande aplicabilidade em processos fermentativos tanto de alimentos quanto de bebidas. É conhecida por apresentar uma fermentação vigorosa, incapaz de se desenvolver utilizando apenas a lisina como fonte de nitrogênio e por favorecer a fermentação em detrimento da respiração quando em meios ricos em açúcares. Além disso, apresenta resistência a concentrações elevadas de etanol, produto resultante da fermentação, o que proporciona a *S. cerevisiae* uma grande prevalência em meios açucarados (GUERRA et al., 2001; SIPICZK et al., 2001; OTTERSTEDT et al., 2004; GOMES et al., 2007; JOHNSON & ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

A qualidade sensorial da cachaça está diretamente relacionada aos tipos de microrganismos utilizados durante a fase de fermentação, sendo estes, determinantes do rendimento de etanol e das proporções dos compostos secundários formados (GOMES et al., 2007; AMORIM et al., 2016). Vários pesquisadores têm estudado as populações de leveduras utilizadas no processo de fermentação da cachaça, e observaram que existe um predomínio de *Saccharomyces cerevisiae* (GOMES et al., 2007; GUERRA et al., 2001; PATARO et al., 2000).

Quando utilizada a fermentação espontânea, os microrganismos presentes ao longo do processo fermentativo da cachaça são desconhecidos, o que pode causar alterações de qualidade e a não padronização do produto final ao longo das várias safras do ano (GONÇALVEZ, 2015). Desta forma, a utilização de culturas iniciadoras vem sendo um grande aliado na produção de cachaça, pois, além da padronização, pode reduzir as contaminações, a competição por nutrientes essenciais e o tempo de fermentação, além de aumentar o rendimento e a qualidade sensorial da bebida (GOMES et al. 2007; SILVA et al. 2009).

Linhagens de *S. cerevisiae* iniciadoras do processo fermentativo devem apresentar algumas características fisiológicas, tais como: rápido início da



fermentação, tolerância às condições estressantes, alto consumo de açúcar presente no meio, ausência de produção de ácido sulfídrico, formação de compostos aromáticos desejáveis, alto rendimento, baixa produção de ácido acético (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2006; GOMES et al., 2007; VIANNA et al., 2008). Já é possível encontrar no mercado, culturas iniciadoras de *S. cerevisiae* específicas para a produção de cachaça. São elas, a CanaMax licenciada pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a empresa Danstar Ethanol Technology, e a UFLA-CA11 licenciada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) para a empresa LNF. As culturas iniciadoras são capazes de dominar o processo fermentativo, pois são adicionadas ao caldo de cana em grandes concentrações, já são adaptadas às condições estressantes do processo e prevalecem sobre os microrganismos selvagens (STROPPIA et. al, 2009).

#### **2.4. Formação de Compostos Secundários**

Os compostos voláteis da cachaça são formados ao longo do processo de fermentação, destilação e envelhecimento. Inicialmente, durante a fermentação, as leveduras consomem o açúcar presente no meio e há a formação, principalmente, de etanol e gás carbônico, e em menor quantidade, de ácido carboxílico, metanol, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, dentre outros, chamados de compostos secundários (CARDOSO, 2006; RIBEIRO, 2017). Durante a destilação, ocorrem diversas reações, tais como hidrólise e esterificação, que são responsáveis também pela formação de compostos secundários. A quantidade e o tipo de compostos formados variam de acordo com a fração (cabeça, coração ou cauda) do destilado a ser analisada e pode ser influenciada por fatores como: composição do caldo de cana, boa separação das frações da cachaça, o tipo e a capacidade do destilador utilizado, o tempo e a temperatura da destilação e o material do destilador (cobre ou alumínio) (CARDOSO, 2006).

A identificação e determinação da concentração de compostos secundários presentes na cachaça é de extrema importância, pois estes irão influenciar no aroma e sabor da bebida. Os compostos secundários são regulamentados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento por meio da portaria nº 55 de 27 de julho de 2004 e da instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 conforme mostrado na Tabela 1.

Apesar de não haver na legislação uma regulamentação sobre a presença e quantidade de glicerol na cachaça, a análise deste composto é necessária, pois este participa da formação do *flavor* e corpo das bebidas. O glicerol é formado na mesma via metabólica do etanol a fim de reestabelecer o equilíbrio redox, competindo pela utilização de NADH, quando em elevadas concentrações pode conferir sabor adocicado (RIBEIRO, 2017). Devido a sua capacidade de agregar características sensoriais positivas, algumas indústrias acrescentam o glicerol a suas bebidas a fim de camuflar possíveis problemas de sabor (GERVASIO et al., 2002; MORO et al., 2007).

**Tabela 1** – Limite de concentração de produtos secundários presentes na cachaça, segundo Ministério da Agricultura e Abastecimento.

<b>Descrição</b>	<b>Máximo</b>
Acidez volátil, expressa em ácido acético em mg/100mL de álcool anidro	150
Ésteres totais, em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100mL de álcool anidro	5
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg/100mL de álcool anidro	360
Metanol, em mg/100mL de álcool anidro	20
Carbamato de etila em µg/L	150

Os álcoois superiores são aqueles com mais de dois átomos de carbono, também chamados de óleo ou álcool fusel, sendo formados durante a fermentação, e são oriundos da degradação de aminoácidos (OLIVEIRA, 2016). Apresentam aroma característico de queimado que pode interferir no sabor das bebidas destiladas (NYKANEN, 1986). Quando em altas concentrações podem reduzir a qualidade e o valor comercial das cachaças (PEREIRA et al., 2015).

Os níveis de álcoois superiores podem sofrer influência de inúmeros fatores como aeração do mosto, altas temperaturas ao longo da fermentação, o pH do mosto, a levedura utilizada e a concentração do inóculo. É necessário evitar a formação de álcoois superiores em excesso durante a fermentação, pois para reduzi-los é

necessário aumentar a fração da cabeça no momento da destilação, o que gera uma redução do rendimento além de perdas de outros compostos secundários desejáveis para a composição do aroma e sabor da cachaça (OLIVEIRA et al., 2005; MAIA & CAMPELO, 2006)

Os ésteres são ácidos carboxílicos com alterações do grupamento OH por OR com odores agradáveis de flores e frutas, que podem ser percebidos em baixas concentrações (OLIVEIRA, 2016). A principal origem dos ésteres nas bebidas alcoólicas está relacionada ao metabolismo das leveduras e, em menor proporção, é originário das reações de esterificação química (BERRY & SLAUGHTER, 2003). O acetato de etila é o éster predominante das bebidas destiladas, quando em pequenas concentrações confere aroma suave de fruta e quando em elevadas concentrações, pode formar um aroma desagradável e enjoativo (RIBEIRO, 2016).

Nas bebidas alcoólicas também é possível encontrar éster etílico derivados de ácidos graxos de baixa massa molecular, como isobutílicos, 3-metilbutílicos; éster etílico de alta massa molecular como ácido caprílico, cáprico, láurico e palmítico. Os ésteres são componentes que se destacam na análise sensorial devido a suas características aromáticas (BELITZ et al., 1999; AQUINO, 2013).

Os aldeídos, em especial o acetaleído, são subprodutos da fermentação alcoólica, apresentam alta volatilidade o que justifica sua presença nas porções mais voláteis, no caso da cachaça, na cabeça. Estes compostos apresentam odor marcante de amêndoas amargas que influencia no aroma das bebidas alcoólicas. O controle das concentrações de aldeídos é de suma importância, não apenas para a qualidade do produto mais também por questões de saúde pública, já que há toxicidade associada à ingestão de altas concentrações destes compostos (OLIVEIRA, 2016).

O furfural, apesar de ser um aldeído raro na cachaça, pode ser formado a partir da decomposição de carboidratos e, em cachaças envelhecidas, a partir da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros. No entanto, pode estar previamente presente no caldo de cana, quando a colheita da cana for precedida de queima das folhas, o que gera a desidratação de alguns açúcares (PEREIRA et al., 2003).

Os ácidos orgânicos, como os demais compostos secundários, também são importantes para a composição do aroma e sabor das bebidas destiladas, o seu

conteúdo é expresso por meio da acidez volátil, e são subprodutos da fermentação. Os ácidos orgânicos voláteis são os mais encontrados em bebidas destiladas, com destaque para ácido acético e láctico. No entanto, também podem ser encontrados em menor quantidade, o ácido fórmico, butírico e propiônico (NYKÄNEN & NYKÄNEN 1991; TEIXEIRA, 2016).

Os principais ácidos orgânicos presentes nas bebidas destiladas são os ácidos graxos voláteis que quando são formados, reagem com álcoois presentes no meio e propiciam a formação de ésteres, responsáveis pela composição do aroma das bebidas destiladas (LIMA et al., 2001; CORNIANI, 2017). A presença de determinados ácidos orgânicos nas bebidas pode estar relacionada à falta de cuidados durante o preparo. Altas concentrações de ácidos acético e láctico podem significar contaminação do mosto principalmente por *Acetobacter* e *Lactobacillus*. Portanto, estes podem ser utilizados como indicadores de pureza da matéria prima utilizada (SCHWAN et al., 2001; CARVALHO-NETTO et al., 2008).

A quantificação do carbamato de etila é de grande importância pois além da sua implicação na saúde por ser um composto carcinogênico, apresenta-se como limitante, quando em concentrações superiores a 150µg/L, à exportação de cachaça para Europa e América do Norte. Sua formação pode ocorrer durante todo o processo produtivo das bebidas destiladas, a partir da reação entre etanol e alguns precursores nitrogenados, como ureia, carbamil fosfatos, n-carbamil aminoácidos e cianetos (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2017).

Oriundo da degradação da pectina presente na cana de açúcar, o metanol é um composto secundário à fermentação da cachaça que se incorpora à bebida. Quando ingerido, pode gerar um quadro de acidose grave além de ocasionar cegueira, afetar o sistema respiratório e levar à morte (SILVA JÚNIOR et al., 2016).

## **2.5. Importância Econômica da Cachaça**

O segmento produtivo da cachaça apresenta previsões positivas quanto ao mercado consumidor, a começar pela valorização e reconhecimento do produto como bebida típica, pelo próprio brasileiro. Segundo dados divulgados pelo SEBRAE (2008), os consumidores das classes A e B descobriram a cachaça como produto de qualidade. Desta forma, a cachaça perde a imagem de bebida desvalorizada e de

baixa qualidade, e passa a ser valorizada e comparada a destilados nobres como uísque e vodca (SEBRAE, 2014)

Estima-se que no Brasil há, em atividade, cerca de 40 mil produtores de cachaça, os quais geram em torno de 600 mil empregos diretos e indiretos. De acordo com o Instituto Brasileiro de Cachaça (IBRAC), o Brasil apresenta capacidade produtiva de cerca de 1,2 bilhões de litros anuais de cachaça, no entanto a produção anual é inferior a 800 milhões de litros. Embora 90% da produção de cachaça seja legalizada, acredita-se que 85% dos produtores, na maioria micro e pequenos, sejam informais. Além disso, 70% da produção está relacionada à cachaça de coluna ou industrial, enquanto o restante refere-se a cachaça de alambique (IBRAC, 2018; SEBRAE, 2014)

Nacionalmente, São Paulo é o maior estado produtor de cachaça de coluna, e Minas Gerais, o maior estado produtor de cachaça de alambique. Outros estados que também se destacam na produção nacional de cachaça são: Rio de Janeiro, Pernambuco, Ceará e Paraíba. Já os principais estados consumidores são: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais (IBRAC, 2018; SEBRAE, 2014). Apesar de grande parte da produção da cachaça ser consumida pelo mercado interno, em 2017, houve um aumento na exportação de 4,32% em volume, em comparação a 2016, resultando no segundo ano seguido de aumento das exportações. A cachaça foi exportada para mais de 60 países, sendo os principais Estados Unidos, Alemanha, Paraguai, França e Portugal, gerando receita de US\$ 15,80 milhões o que representa 8,74 milhões de litros (IBRAC, 2018). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apresenta registros de 4.124 marcas de cachaça em circulação no Brasil, com destaque para os estados de Minas Gerais com 1.587 marcas (SEBRAE, 2014).

### 3. OBJETIVO

Selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de substratos naturais, como casca de árvore, madeira em decomposição e líquens para a produção de cachaça de alambique.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Selecionar as linhagens resistentes às principais condições de estresse encontradas durante a fermentação do mosto de caldo de cana de açúcar;
- Verificar a capacidade fermentativa, consumo de açúcares e produção de metabólitos pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* pré-selecionadas e comparar com linhagem comercial;
- Produzir cachaça em escala piloto utilizando as linhagens de *S. cerevisiae* que apresentarem melhor desempenho nos testes realizados;
- Verificar o perfil de compostos voláteis nas cachaças produzidas com as linhagens selecionadas;
- Realizar análise sensorial das cachaças produzidas para verificar a aceitação da bebida pela população.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismos

As leveduras utilizadas neste trabalho foram pré-selecionadas baseadas no trabalho de BARBOSA e colaboradores (2018). Estes autores analisaram os genomas de 188 linhagens de *S. cerevisiae*, de diferentes origens: ambientais (casca de árvore, líquens e madeira em decomposição), de dorna de cachaça, de cerveja e vinho. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta a árvore filogenética de linhas de *S. cerevisiae*. Para o presente trabalho foram utilizadas 74 linhagens *Saccharomyces cerevisiae* ambientais, representadas pelas grupos Brasil 1 e Brasil 3, pertencentes à Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) isoladas de casca de árvore, líquen e madeira em decomposição, conforme apresentado na Tabela 2. A linhagem *S. cerevisiae* UFMG-CM-1007 (CanaMax), isolada de dorna de cachaça e comercializada como boa produtora da bebida, foi utilizada como controle dos experimentos.

### 4.2. Teste de Assimilação de Lisina

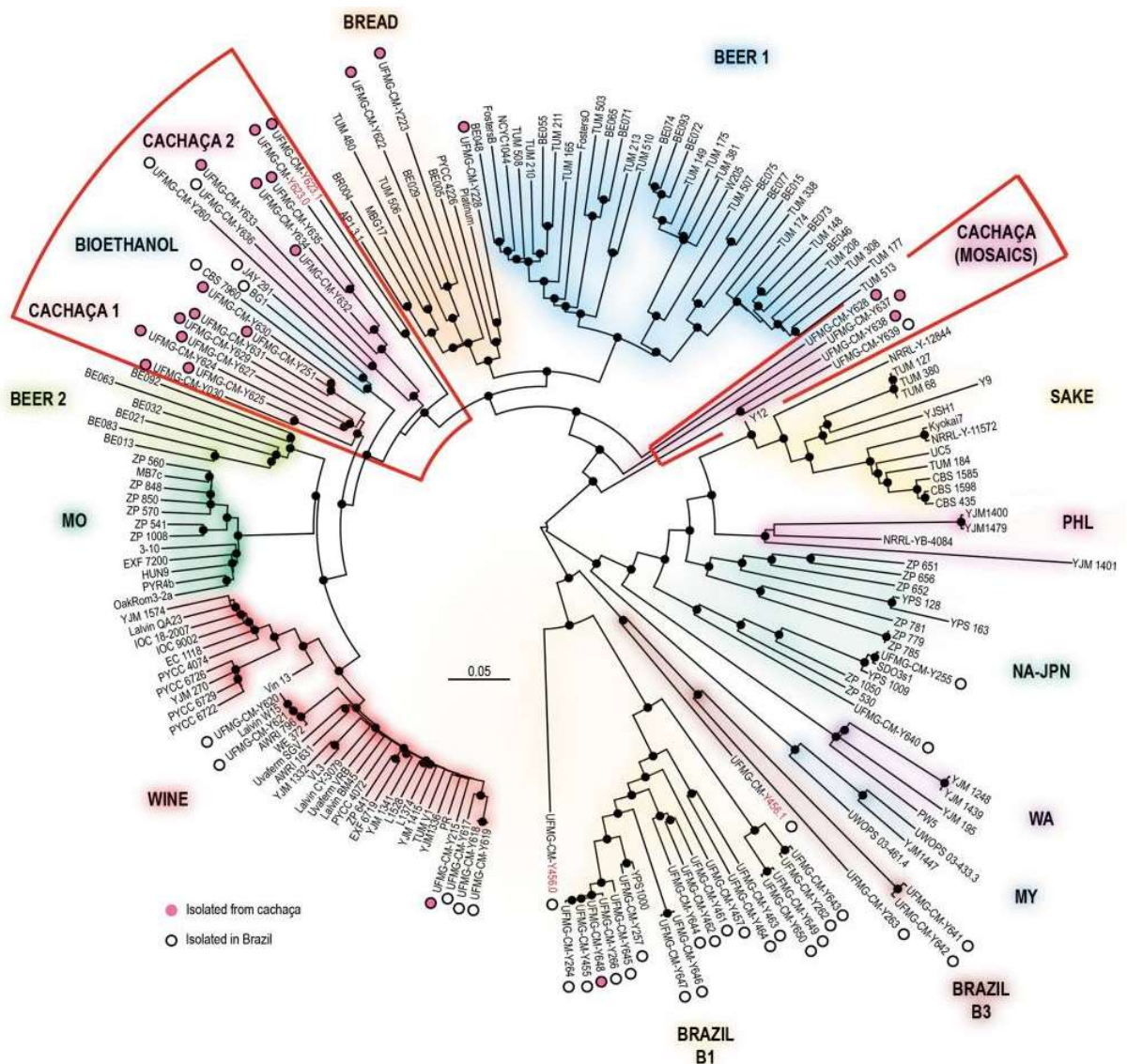
O meio de lisina (1,17% de YCB, 0,056% de lisina, 2% de ágar) foi utilizado com o objetivo de verificar se as linhagens previamente selecionadas eram *S. cerevisiae*. Para isso, as leveduras foram diluídas conforme grau dois da escala de McFarland e posteriormente inoculadas em meio lisina; os resultados foram observados após 3 dias de incubação à 25°C. As leveduras que não apresentaram crescimento foram confirmadas como *S. cerevisiae* (KURTZMAN et al, 2010; VAUGHAN-MARTINI, 2011).

### 4.3. Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

Para a caracterização das linhagens produtoras de sulfeto de hidrogênio, responsável por odor desagradável e indesejado de enxofre na bebida, foi utilizada a metodologia proposta por ZAMBONELLI e colaboradores (1984). As leveduras foram crescidas em meio YM por 48 horas, posteriormente, inoculadas em meio diferenciado *Bacto Bismuth Sulfite Ágar* (BSA), e incubadas por 6 dias a 25°C. O meio de cultura BSA promove a formação de colônias brancas quando não há a produção de H<sub>2</sub>S. Quando ocorre produção de H<sub>2</sub>S pelo microrganismo é possível verificar o

crescimento de colônias escuras, devido à reação deste composto com o sulfato ferroso presente no meio, dando origem ao sal negro, sulfeto de ferro, indicando resultado positivo. Este teste foi realizado em triplicata e considerou-se como positivo, quando o crescimento das colônias enegrecidas foi detectado nas três repetições de cada levedura.

**Figura 1** – Árvore filogenética de linhagens de *S. cerevisiae* obtida por sequenciamento completo do genoma, conforme descrito em BARBOSA et al. (2018).





**Tabela 2** – Leveduras pré-selecionadas para o presente estudo, local de coleta e substrato onde foram isoladas.

<b>Leveduras</b>	<b>Substrato</b>	<b>Local</b>
C1	Casca de <i>Quercus rubra</i>	Caraça/MG
C2	Casca de árvore	Caraça - MG
C3	Casca de <i>Q. rubra</i>	Caraça - MG
C4	Casca de <i>Q. rubra</i>	Caraça - MG
CAR 49.30	Casca de <i>Q. rubra</i>	Caraça - MG
CAR 50.30	Casca de <i>Q. rubra</i>	Caraça - MG
YEFO34	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas - TO
YEFO36L	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas - TO
C37	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C41	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C45	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C39	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C53	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C109	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
RD 10.3	Madeira em decomposição	Parque Est. do Rio Doce - MG
C49	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas - TO
CTP2b	Casca de Jequitibá	Pium - TO
C129	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C167	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C132	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C139	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C145	Líquen	Mucajaí/RR
CG 192	Líquen	Mucajaí/RR
C161b	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C203	Casca de árvore	Mucajaí/RR
C229	Casca de árvore	Parque Est. do Rio Doce - MG
ID 23.3	Madeira em decomposição	Ilha Grande - RJ
ID 38.2	Madeira em decomposição	Ilha Grande - RJ
IH 22.1	Madeira em decomposição	Ilha Grande - RJ
C38	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C40	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO

Continua

<b>Leveduras</b>	<b>Substrato</b>	<b>Local</b>
C43	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C46	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C47	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C48	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C51	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C52	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C54	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C55	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C111	Casca de <i>T. guianensis</i>	Palmas-TO
C130	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C134	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C140	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C141	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C146	Líquen	Mucajaí - RR
C147	Líquen	Mucajaí - RR
C148	Líquen	Mucajaí - RR
C149	Líquen	Mucajaí - RR
C158a	Líquen	Mucajaí - RR
C161a	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C162	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C163	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C164	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C204	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C205	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C230	Casca de árvore	Rio Doce - MG
C231	Casca de árvore	Rio Doce - MG
CG 194	Líquen	Mucajaí - RR
CG 195	Líquen	Mucajaí - RR
CG 196	Líquen	Mucajaí - RR
C166	Casca de árvore	Mucajaí - RR
C168	Casca de árvore	Mucajaí - RR
CG 193	Líquen	Mucajaí - RR
CTP2a	Casca de Jequitibá	Pium -TO

Continua

Leveduras	Substrato	Local
SIG 3.1	Casca de árvore	Ilha Grande - RJ
R1CS 6.3	Casca de <i>Protium hebetatum</i>	Caxiuanã - PA
FTD 14	Casca de árvore	Floresta da Tijuca - RJ
FTD 24	Casca de árvore	Floresta da Tijuca - RJ
C133	Casca de árvore	Mucajaí - RR
FH 31.1	Madeira em decomposição	Foz do Iguaçu
FTD 13	Casca de árvore	Floresta da Tijuca - RJ

#### 4.4. Teste de Estresse Fermentativo

As análises de tolerância ao estresse fermentativo das leveduras foram realizadas baseadas em metodologia descrita por BELLOCH et al. (2008), com algumas adaptações. As leveduras foram crescidas em meio ágar YPG (peptona 0,5%, levedura extrato 0,5%, glicose 2%, ágar 1,5%). Após 48 horas, foram inoculadas em 5ml de caldo YPG (peptona 0,5%, levedura extrato 0,5%, glicose 2%) e incubadas por 24 horas a 30°C sob agitação. Realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 655nm e esta foi ajustada a 0,4 com caldo YPG. Novamente foram incubadas sob agitação a 30°C por 4 horas e realizada a diluição das células, com água estéril, a mensuração e o ajuste absorbância (655nm). Foram feitas 6 diluições decimais para cada levedura e 5 µL de cada uma das diluições foram inoculadas nas placas de YPG para cada teste de estresse. As placas foram incubadas por 6 dias e o crescimento foi observado para cada levedura nas respectivas diluições. As condições de estresse as quais as leveduras foram submetidas foram variações de pH (2,8; 3,0; 3,2), concentração de glicose (20, 25, 30%), sacarose (10, 15, 20%) e etanol (8, 10, 12, 15%), além de diferentes temperaturas (10, 16, 25, 30, 37 e 42°C).

##### 4.4.1. Critérios de Seleção das Linhagens de *S. cerevisiae* com Melhores Desempenho nos Testes de Estresse

Visando buscar as leveduras que apresentaram os melhores desempenhos nos testes de estresse, foi realizada uma seleção tendo como base dois critérios:

- *Critério por condição de estresse*: indica, em quantas das condições testadas (pH, sacarose, glicose, etanol e temperatura) as leveduras estudadas obtiveram desempenho melhor ou igual à controle (UFMG-CM-1007. Neste quesito, foram selecionadas apenas as leveduras que apresentaram resultados maiores ou iguais a 0,5 indicando que o seu desempenho foi igual ou superior à levedura controle em pelo menos 50% das condições testadas.
- *Critério global*: levando em conta as seis diluições as quais as leveduras foram submetidas, foi utilizado o somatório dos resultados de crescimento de cada uma, em todas as condições testadas. Posteriormente foi feita a diferença entre a soma do crescimento de cada levedura estudada e a soma de crescimento da levedura controle. A partir destes resultados, as leveduras foram ranqueadas de forma crescente. Valores numéricos maiores e positivos mostram que a linhagem testada apresentou desempenho superior a levedura controle.

#### **4.5. Teste de Invertase**

A invertase é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose (dissacarídeo) em uma molécula de glicose e outra de frutose (FIEDUREK et al., 2000). Para a determinação da atividade invertásica foi utilizada a metodologia de DNS adaptada para microplacas proposta por SANTOS et al. (2017) e MAURO (2017).

##### **4.5.1. Obtenção da Curva Padrão de Glicose**

A partir de uma solução padrão de glicose (1000mg/L), sete outras soluções com concentração variando entre 50mg/L e 1000mg/L foram preparadas em balões volumétricos. Em uma placa de 96 poços com capacidade para 2ml, foram adicionados, 100µL de cada solução de glicose preparada e 100µL de solução de DNS. O conteúdo foi homogeneizado, ficou em banho maria a 100°C por 5 minutos, e resfriado com gelo. Após este procedimento, 800µL de água destilada foram adicionados, e o conteúdo novamente homogeneizado. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância desta placa em Tecan com comprimento de onda de 540nm.

Para a construção da curva-padrão, utilizou-se uma planilha do Excel com o intuito de gerar um gráfico, onde o eixo Y representa a absorbância, e o eixo X a

concentração de glicose (g/L). A partir do coeficiente angular da reta ajustada, foi calculado o fator de concentração, Equação 1.

**Equação 1** – Fator de concentração

$$\text{Fator de concentração} = \frac{1}{\text{coeficiente angular}}$$

#### **4.5.2. Medida da Atividade de Invertase**

Em uma placa de 96 poços foi adicionado, em triplicata, para cada poço, 50  $\mu\text{L}$  de solução de sacarose (0,1 M), 40 $\mu\text{L}$  de tampão acetato (100 mM, pH 5.0) e 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra enzimática (0,01g de célula de levedura diluída em 1000  $\mu\text{L}$  de tampão acetato). O conteúdo foi homogeneizado e a placa incubada a 30°C por 30 minutos. A fim de paralisar a reação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. Após 5 minutos sob fervura, a placa foi resfriada e 800  $\mu\text{L}$  de água destilada adicionados. Em seguida, a placa foi novamente homogeneizada e realizada a leitura da absorbância em Tecan com comprimento de onda de 540nm.

#### **4.6. Teste de Flocculação**

O teste de flocculação foi realizado baseado na metodologia proposta por DUARTE e colaboradores em 2013. As linhagens de leveduras foram inoculadas em 5 mL de meio YPD e incubadas a 30° C por 24 h. Após a incubação, os tubos foram agitados por 10 segundos em Vortex, e a capacidade de flocculação foi observada visualmente. As linhagens foram consideradas como leveduras flocculantes (AF): quando houve a formação de agregados celulares em cultura estática após agitação; alternativamente, as linhagens foram classificadas como não-flocculantes (NF): quando as células não formaram aglomerados após a dispersão por agitação. Em seguida foi realizada a determinação espectrofotométrica. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas por 16 minutos a 16162 g e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de Helm's. O grau de flocculação das leveduras foi determinado a partir da razão entre a densidade óptica (600nm) da suspensão de cultura no tempo zero ( $OD_0$ ) e a densidade óptica medida após 30 min em repouso ( $OD_{30}$ ), conforme a Equação 2.

## **Equação 2 – Grau de Flocculação**

$$\frac{OD_{30}}{OD_0} * 100$$

Ao final, os resultados encontrados foram classificados de acordo com a escala de flocculação estabelecida: valores maiores 90%, sem atividade de flocculação; entre 70% e 90%, baixa atividade de flocculação, entre 30% e 70%, média atividade de flocculação, menor que 30%, alta atividade de flocculação.

### **4.7. Teste de Fermentação em Caldo de Cana de Açúcar para Avaliação da Produção de Etanol**

O teste de fermentação foi realizado conforme proposto por GOMES (2006). Para a elaboração do inóculo, as leveduras foram crescidas em placas com meio YM a 30°C. Após 48 horas, estas foram crescidas em forma de escalonamento, a fim de realizar a propagação do inóculo, sob agitação em shaker, em volumes de 50 e 300 ml de meio sintético de propagação (15g/L de sacarose, 5g/L de fosfato diácido de potássio, 1.5g/L de cloreto de amônio, 1g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, 1g/L de cloreto de potássio, 6g/L de extrato de levedura). O crescimento foi conduzido até atingir uma concentração de 10<sup>8</sup> células/ml, com contagem de células por ml em câmara de Neubauer. Após o preparo do inóculo, foi realizado o teste de fermentação. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, em Erlenmeyer de 250 ml com 100 ml de caldo de cana não estéril, por 24 horas a 30° C. Foram retiradas alíquotas de 1,5ml a cada 4 horas, a fim de serem analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e o consumo dos açúcares totais foi mensurado por meio de refratômetro.

### **4.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

O etanol, o glicerol, a glicose, a sacarose e a frutose proveniente da fermentação em escala laboratorial foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) e coluna Sulcogel 610H” 30cm x 7,8 mm (Sigma-Aldrich) mantida à temperatura de 45° C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 10A; fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

As amostras retiradas da fermentação foram centrifugadas a 16162 g durante 10 minutos, a massa celular acumulada foi descartada e o sobrenadante foi filtrado em membrana com poro de 0,22µm.

#### **4.9. Produção das Cachaças em Escala Piloto**

Para a produção das cachaças foram utilizadas as três linhagens que apresentaram melhor desempenho nos testes previamente descritos, além da levedura controle (UFMG-CM-1007). A forma de propagação das leveduras foi realizada conforme descrito no item acima (4.7). No entanto, utilizou-se o próprio caldo de cana, autoclavado, a 8° brix, como meio de propagação e o inóculo foi calculado baseado em 10% do volume da capacidade de dorna de fermentação.

Após a elaboração do inóculo, este foi adicionado à dorna de fermentação contendo 20 litros de caldo de cana a 15° brix. A fermentação ocorreu por cerca de 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, o vinho foi destilado em alambique de cobre por aproximadamente 4 horas. Foram separadas as porções da cabeça (10% inicial do volume total) e da cauda (10% final do volume total) que foram descartadas e o coração foi engarrafado e utilizado para os testes de cromatografia gasosa e de análise sensorial.

#### **4.10. pH e Acidez e do Mosto Fermentado e da Cachaça**

Após a fermentação do caldo de cana, foi retirada uma alíquota de 30 ml a fim de verificar o pH do mosto fermentado e a acidez total titulável. O mesmo foi feito após a destilação da fração coração da cachaça.

O pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro Kasvi. A acidez foi mensurada conforme protocolo do fornecedor do “Kit de Determinação de Acidez de Cachaça” (Laboratório Amazile Biagioni Maia - LABM). Foi realizada titulação com o NaOH 0,5N e fenolftaleína, após a viragem, o volume gasto de NaOH foi aplicado à fórmula abaixo, Equação 3, para o cálculo da acidez.

#### ***Equação 3 – Determinação de Acidez***

$$acidez = \frac{3000 * volume\ gasto\ de\ NaOH}{teor\ alcoólico}$$

#### **4.11. Análise da Produção de Compostos Secundários por Cromatografia Gasosa**

O ensaio foi realizado utilizando um cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) com detector de espectrometria de massas (Agilent 5977A - MSD) acoplado, do tipo quadrupolo. A coluna utilizada foi capilar CP – WAX 52 CB (Polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de diâmetro interno). O forno iniciou com temperatura de 40°C por 1 minuto e posteriormente, a temperatura foi sendo elevada em 10°C a cada minuto até atingir 180°C. Após alcançar esta temperatura, esta passou a ser elevada em 35°C/minuto até atingir 220°C, onde permaneceu por 3 minutos, totalizando a corrida analítica de 20 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo constante de 1ml/minuto. Para a injeção foi utilizado divisão de fluxo (*split*) de 1:50, com volume de injeção de 1 µL. A obtenção dos dados foi realizada no modo SCAM, utilizando razão massa carga (m/z) de 14 a 500. A interface do cromatógrafo com o detector foi mantida a 240°C, e utilizou-se a ionização por impacto de elétrons também a 240°C. O analisador de massa quadrupolo simples utilizado estava a 150°C. Os resultados de massa e perfil de fragmentação dos picos detectados foram comparados com o banco dos espectros da biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

#### **4.12. Análise Sensorial**

Amostras das cachaças produzidas foram submetidas a sessões de degustação descritivas onde foram avaliadas à aceitação e a intenção de compra das cachaças. Em cada sessão, as bebidas foram servidas e apresentadas de forma aleatória, à temperatura ambiente. Os provadores avaliaram aspectos relevantes tais como aroma, sabor e impressão global, julgando e atribuindo pontuações de 1 a 7 em cada etapa conforme ficha de avaliação (ANEXO 1). Calculou-se as médias e desvios padrões de todos os quesitos avaliados e aplicou-se o teste *t de student* a fim de verificar se as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas. O projeto de elaboração desta análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – COEP, CAAE: número 79241317.3.0000.5149.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Teste de Lisina e Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

As 74 linhagens previamente selecionadas da Coleção de Microrganismos e Células da UFMG e a levedura controle (UFMG-CM-1007) foram submetidas primeiramente ao teste de assimilação de lisina a fim de verificar se estas eram ou não *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras que obtiveram resultado negativo, indicando que são *S. cerevisiae*, foram então testadas quanto à produção de sulfeto de hidrogênio. Os resultados completos destes testes são apresentados no ANEXO 2. Apenas três linhagens testadas (ID 38.2, FH 31.1, ID 23.3) apresentaram resultado positivo para lisina indicando que estas não são *S. cerevisiae* (VAUGHAN-MARTINI, 2011). Portanto, tais linhagens foram eliminadas dos experimentos seguintes.

Das 71 leveduras testadas quanto a produção de H<sub>2</sub>S, 23 foram positivas quanto a produção deste gás, indesejado na produção de bebidas, pois apresenta odor desagradável de enxofre. SILVA (2006) utilizou 233 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de destilarias de cachaça de diferentes regiões de Minas Gerais e destas, apenas cinco não apresentaram produção de sulfeto de hidrogênio. ARAÚJO e colaboradores (2018) testaram sete linhagens de *S. cerevisiae* e apenas uma não produz H<sub>2</sub>S. O menor número de linhagens que produziram H<sub>2</sub>S no presente trabalho pode estar relacionado à origem ambiental dos isolados. Nos trabalhos citados acima, as linhagens testadas foram originárias de fermentação de cachaça. Possivelmente, linhagens ambientais podem estar menos associadas com a produção deste composto.

### **5.2. Teste de Estresse Fermentativo**

Este experimento visa mensurar a capacidade das linhagens ambientais de *S. cerevisiae*, de desenvolverem colônias, nas principais condições de estresse (pH, sacarose, glicose, etanol, temperatura) ao longo de 6 dias, podendo apresentar resultados de 1 a 6, sendo 1, crescimento apenas na primeira diluição e 6, crescimento em todas as diluições. A tabela com as médias das duplicatas dos resultados está disponível no ANEXO 3.

### 5.2.1. Critérios de Seleção das Linhagens de *S. cerevisiae* com Melhores Desempenho nos Testes de Estresse

A fim de selecionar as leveduras com melhor desempenho no teste de estresse foram utilizados os critérios por crescimento nas condições de estresse testadas, e, a somatória de todos estes estresses (critério global). As Tabelas 3 e 4 apresentam os melhores e piores resultados obtidos, respectivamente, para os dois critérios adotados.

**Tabela 3** – Leveduras com os melhores desempenhos nos testes de estresse e métricas aplicadas.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Critério de Condição	Critério Global
C203	1	28
C51	1	27
C204	1	26
CTP2b	1	12,5
C140	0,94736	23,5
C146	0,94736	23
C131	0,94736	22
C48	0,94736	22
C41	0,94736	21,5
C229	0,94736	17
C54	0,94736	11,5
C47	0,89473	21
C49	0,89473	19,5
C3	0,89473	19
C46	0,89473	17,5

No critério por condição de estresse, as leveduras C203, C51 e C204 obtiveram resultado 1, o que significa que em 100% das condições, estas foram melhores ou iguais à UFMG-CM-1007. Após a utilização de ambos os ranqueamentos propostos, foram eliminadas oito leveduras (C132, CTP2a, C205, C141, C161a, C166, C158a, C148) na primeira triagem, pois estas não apresentaram desempenho melhor ou igual à levedura controle (UFMG-CM-1007) em pelo menos metade das condições testadas (Tabela 3).

**Tabela 4** – Leveduras com os piores desempenhos nos testes de estresse e métricas aplicadas.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Critério de Condição	Critério Global
C111	0,52631	-2
C52	0,52631	-3
C132	0,47368	-2,5
CTP2a	0,42105	-5,5
C205	0,36842	-5,5
C141	0,36842	-6
C161a	0,36842	-7
C166	0,31578	-7,5
C158a	0,31578	-15,5
C148	0,26315	-17

Já na segunda triagem, foram eliminadas mais duas leveduras (C111 e C52), pois estas apresentaram resultados negativos, o que significa que quando avaliadas quanto ao crescimento total o desempenho foi novamente inferior à levedura padrão. Sendo assim, seguiram para o teste de invertase 38 leveduras (Tabela 4).

### 5.2.2. pH

O pH não foi um fator limitante ao crescimento para maioria das leveduras estudadas, pois apenas três delas (C205, C158a e C148) não cresceram adequadamente em todas as variações de pH propostas. A maioria das leveduras apresentou comportamento semelhante a UFMG-CM-1007 (levedura controle), que cresceu nas diferentes diluições e concentrações de pH testadas.

A avaliação da influência do pH durante a fermentação é importante pois segundo FLEET e HEARD (1993), o crescimento da *S. cerevisiae* é reduzido quando o pH do meio fermentativo passa de 3,5 para 3,0. No entanto, em 2005, SERRA e colaboradores mostraram que para *S. bayanus var. uvarum*, o pH não teve impacto significativo no crescimento destas leveduras. BELLOCH *et al.* (2008) submeteram *S. cerevisiae* de diferentes origens a variações de pH e os resultados foram semelhantes ao encontrado neste estudo. BADOTTI *et al.* (2009) ao analisar o comportamento de leveduras isoladas de dornas de cachaça em pH 2,8 observou que a maioria delas

também não apresentou dificuldade de crescimento como as leveduras ambientais aqui testadas.

### **5.2.3. Glicose e Sacarose**

A concentração inicial de açúcar total presente no caldo de cana é em torno de 22° Brix (22%), no entanto, este é diluído até 14 a 16° Brix (14 a 16%), de forma a criar um meio propício para o crescimento das leveduras (RAMOS & GONÇALVES, 2018). Altas concentrações de açúcares podem atrapalhar a respiração celular, o que afetaria o desenvolvimento destes microrganismos. Todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas foram capazes de crescer nas concentrações de sacarose utilizadas, como também observado por BELLOCH *et al.* (2008) e WILLIAMS *et al.* (2015). Como a sacarose é um dissacarídeo, e por ação da enzima invertase esta pode ser clivada em glicose e frutose, é de grande importância que, além de crescerem nas diferentes concentrações de sacarose, que as leveduras também sejam capazes de crescer em meio com alta concentração de glicose. Em meio contendo 30% de glicose a maioria das leveduras apresentou dificuldade de crescimento, se desenvolvendo apenas primeiras diluições,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ; com 20% de glicose, mais de 50% das leveduras apresentaram crescimento satisfatório ( $10^{-3}$ ); 25% das leveduras (CTP2b, C133, C111, C52, C132, CTP2a, C205, C141, C161a, C166, C158a, C148) não cresceram de forma satisfatória (pelo menos até a terceira diluição,  $10^{-3}$ ), em nenhuma das três concentrações de glicose testadas.

### **5.2.4. Etanol**

Ao analisar o desenvolvimento das leveduras estudadas nas diferentes concentrações de etanol, 8, 10, 12 e 15%, é possível observar que, a levedura controle cresceu em todas as concentrações de etanol e todas as linhagens ambientais cresceram em 8% de etanol. Já para 15% de etanol, apenas as linhagens C1, C3, C4 e C37 não foram capazes de se desenvolver. PATARO e colaboradores (2002), também testaram a resistência de *S. cerevisiae* a etanol e observaram que a maior concentração de etanol tolerada pelas linhagens testadas foi 12% e que todas conseguiram se desenvolver em 8%.

A fermentação é um complexo processo onde as leveduras devem ser capazes de produzir e tolerar altas concentrações de etanol; ao final do processo de produção da cachaça, o vinho fermentado apresenta cerca de 8% de álcool. Para a maioria das leveduras, essa elevada concentração é tóxica, no entanto, grande parte das linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de tolerar e de se desenvolver nesta e em concentrações ainda maiores de etanol (BADOTTI et al., 2010).

### **5.2.5. Temperatura**

A fermentação do caldo de cana para a produção da cachaça ocorre em temperatura ambiente, podendo variar de 20 a 40°C (MORAIS et al., 1997), com temperatura ótima entre 25 e 35°C (ROSA et al., 2016). No presente trabalho todas as leveduras, incluindo a controle, não cresceram a 10 e 16°C, diferentemente do encontrado por BELLOCH e colaboradores (2008) que estudaram leveduras isoladas de vinho e de cerveja. BADOTTI e colaboradores (2010) ao testarem leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça, constataram que todas as linhagens se desenvolveram a 30°C, que a maioria delas também cresceu a 37°C e que, quando em baixas temperaturas, nenhuma delas se desenvolveu. Em nosso estudo, apenas dois isolados não cresceram satisfatoriamente a 30°C (C161a C158a), temperatura ótima da fermentação da cachaça; em 37 e 42°C a maioria das leveduras apresentou crescimento em pelo menos até a terceira diluição ( $10^{-3}$ ) com exceção apenas das linhagens CTP2a e C205. Desta forma é possível observar que, apesar da ausência de crescimento das leveduras ambientais estudadas nas temperaturas de 10 e 16°C, nas demais temperaturas, estas obtiveram desempenho semelhante as leveduras de cerveja, vinho e cachaça (BELLOCH et al. 2008; BADOTTI et al. 2010).

### **5.3. Teste de Invertase**

Foram testadas quanto à atividade de invertase as 38 leveduras selecionadas, e a levedura controle – UFMG-CM-1007. Os resultados obtidos foram ranqueados, utilizando como referência a atividade de invertase apresentada pela levedura controle ( $7,2 \pm 0,8$ mg de açúcar redutor/mg de células/minutos). A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no teste de invertase. De todas as leveduras testadas, apenas três (C1, C49, CAR 49.30) não apresentaram resultados superiores a UFMG-CM-1007.

Desta forma, estas não prosseguiram para o teste de floculação, pois a sua baixa capacidade de invertase poderia comprometer o desempenho da fermentação da cachaça. A maior atividade de invertase encontrada foi de  $21,7 \pm 1,1$  para a levedura C48 e a menor foi de  $4,4 \pm 0,5$  para a CAR 49.30. PATARO e colaboradores (2002) realizaram teste de invertase de leveduras isoladas ao longo de 24 horas de fermentação da cachaça de três diferentes destilarias e observaram que as *S. cerevisiae* isoladas apresentaram atividade de invertase variada. O melhor resultado encontrado por estes autores para *S. cerevisiae* foi de  $69,2 \pm 1,3$   $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mg de células/minuto e o pior foi  $3,6 \pm 1,05$   $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mg de células/minuto. A invertase é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose, e esta pode ser obtida de diferentes microrganismos. A *S. cerevisiae* é um dos principais microrganismos produtores de invertase e pode apresentar duas formas da enzima, intracelular e extracelular (KARKAS & ONAL, 2012). No caldo de cana, substrato para a produção de cachaça, o principal açúcar é a sacarose, desta forma, é necessário que as leveduras utilizadas para a fermentação, apresentem atividade de invertase. Após a hidrólise da sacarose, a glicose e frutose são conduzidas para o interior das células, aonde serão degradadas até piruvato e posteriormente transformadas em etanol e  $\text{CO}_2$ , subprodutos da fermentação (BARNETT, 1981).

**Tabela 5** – Média da atividade de invertase obtida pelas leveduras testadas (mg/L) e diferença das médias entre a atividade de invertase da levedura analisada e da levedura controle.

Leveduras	Atividade invertásica	Diferença das médias
C48	$21,7 \pm 1,1$	14,51
C47	$19,2 \pm 3,4$	11,99
C46	$17,6 \pm 2,1$	10,38
C45	$16,9 \pm 3,1$	9,70
C54	$16 \pm 1,2$	8,78
C109	$16 \pm 0,9$	8,58
C146	$15,8 \pm 0,6$	8,57
C130	$15,2 \pm 2,9$	7,96
C43	$14,6 \pm 2,8$	7,41
C133	$14,5 \pm 2,2$	7,28

Continua

		Conclusão
<b>Leveduras</b>	<b>Atividade invertásica</b>	<b>Diferença das médias</b>
CTP2b	14,4±1,6	7,23
C42	14,4±1,4	7,21
C134	14,4±1	7,20
C145	14,4±1,7	7,19
C2	14,2±2,3	7,04
C140	13,4±2,3	6,17
C41	13±2,7	5,77
C168	12,9±2,2	5,68
C131	12,6±0,3	5,40
C129	12,5±1,2	5,34
C203	12,3±0,7	5,11
C167	12,2±0,9	5,04
C204	12,2±0,9	5,02
C3	12,1±1,6	4,89
C161b	10,8±0,2	3,58
C164	10,7±0,6	3,52
C163	10,6±1,4	3,40
C139	10±2,4	2,80
CAR 50.30	9,4±01	2,23
C4	9,3±2	2,09
C229	9,3±0,1	2,07
C231	8,6±1,5	1,42
C230	8,1±0,9	0,92
C37	7,4±0,8	0,23
C51	7,3±0,6	0,09
C1	7,1±1,3	-0,06
C49	6,4±0,2	-0,82
CAR 49.30	4,4±0,5	-2,81
1007	7,2±0,8	-

#### 5.4. Floculação

A capacidade de sedimentação das leveduras foi mensurada visualmente e por espectrofotometria. Nenhuma das leveduras testadas, incluindo a controle (UFMG-

CM-1007), apresentou atividade floculante. Ao classificá-las de acordo com a escala de floculação estabelecida (valores maiores 90%, sem atividade de floculação; entre 70% e 90%, baixa atividade de floculação, entre 30% e 70%, média atividade de floculação, menor que 30%, alta atividade de floculação), todas apresenta valores superiores a 90%, indicando ausência de floculação.

Portanto, esse teste não foi utilizado para a seleção de linhagens para experimentos posteriores. No trabalho de Silva (2007), a levedura UFMG-CM-1007 também foi utilizada como controle nos experimentos de floculação e, assim como no presente trabalho, não apresentou atividade floculante. A tabela com os resultados do teste de floculação pode ser encontrada no ANEXO 4.

### **5.5. Seleção das Melhores Leveduras**

A partir dos dados acima, 35 leveduras foram selecionadas. Para diminuir o número de leveduras a ser testado na produção de cachaça, o substrato de isolamento foi também considerado como critério de seleção. Para isolados originários do mesmo substrato, apenas um foi escolhido (Tabela 6).

Todas as leveduras que foram isoladas nas mesmas data, temperatura e substrato, foram agrupadas como similares. Dentro de cada grupo, foi selecionada aquela que obteve melhores resultados em todos os testes anteriormente aplicados. Sendo assim, foram escolhidas as 18 leveduras (CAR50-30, C3, C4, C2, C42, C45, C54, C109, CTP2b, C128, C168, C134, C139, C145, C163, C163, C204, C230) Tabela 6, que mais se destacaram para seguir para os próximos testes.

### **5.6. Teste de Fermentação**

O teste de fermentação em escala laboratorial foi realizado com o objetivo de selecionar as linhagens com melhor desempenho fermentativo. Todas as fermentações iniciaram com 15,2°Brix (T0) e foram acompanhadas por 24 horas (T24). Três linhagens, C2, C45 e C145, além da linhagem controle, UFMG-CM-1007, apresentaram ao final da fermentação, as menores concentrações de açúcares totais, com Brix final de  $4\pm 0$ ;  $3,25\pm 0,3$ ;  $4\pm 0$ ;  $4\pm 0$  respectivamente (Tabela 7), indicando que estas leveduras foram capazes de consumir maior quantidade de açúcar e conseqüentemente converte-lo em etanol.



**Tabela 6** – Informações de Isolamento de Leveduras por Local e Substrato (Fonte SAFAR, 2013).

<b>Local</b>	<b>Código de isolamento</b>
Santuário do Caraça (Jardins), MG	CAR49-30
Santuário do Caraça (Jardins), MG	CAR50-30 <sup>a</sup>
Santuário do Caraça (Jardins), MG	C1
Santuário do Caraça (Jardins), MG	C3 <sup>a</sup>
Santuário do Caraça (Jardins), MG	C4 <sup>a</sup>
Santuário do Caraça (Trilha da Cascatona), MG	C2 <sup>a</sup>
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Buritizal), TO	YEF 034
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Buritizal), TO	C37 <sup>a</sup> , C38, C39, C40
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	YEF 036L
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	C41, C42 <sup>a</sup> , C43
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	C45 <sup>a</sup> , C46, C47, C48
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	C49, C50, C51
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	C52, C53, C54 <sup>a</sup> , C55
Taquaruçu (Mata ripária do Córrego Bela Vista), TO	C109 <sup>a</sup> , C111
Centro de Pesquisa Canguçu, TO	CTP2a, CTP2b <sup>a</sup>
Serra da prata, Mucajaí, RR	C129 <sup>a</sup> , C130, C131
Serra da prata, Mucajaí, RR	C166, C167, C168 <sup>a</sup>
Serra da prata, Mucajaí, RR	C132, C133, C134 <sup>a</sup>
Serra da prata, Mucajaí, RR	C139 <sup>a</sup> , C140, C141
Serra da prata, Mucajaí, RR	C145 <sup>a</sup> , C146, C147, C148, C149, C158a
Serra da prata, Mucajaí, RR	CG192, CG193, CG194, CG195, CG196
Serra da prata, Mucajaí, RR	C161a, C161b, C162, C163 <sup>a</sup> , C164
Serra da prata, Mucajaí, RR	C203, C204 <sup>a</sup> , C205
Parque Estadual do Rio Doce, MG	C229, C230 <sup>a</sup> , C231

<sup>a</sup>: isolados selecionados como representante de cada grupo

**Tabela 7** - Média do consumo de açúcar, em graus brix, a cada 4 horas, durante 24 horas.

<b>Amostra</b>	<b>Brix T0</b>	<b>Brix T4</b>	<b>Brix T8</b>	<b>Brix T12</b>	<b>Brix T16</b>	<b>Brix T20</b>	<b>Brix T24</b>
C2 <sup>a</sup>	15,2±0	13±0	11±0	9±0	7±0	5±0	4±0
C3	15,2±0	13±0	11±0	9±0	7,5±0	6±0	5±0
C4	15,2±0	14±0	13±0	11±0	9±0	8±0	7±0
C37	15,2±0	13,5±0	12±0	10,25±0,3	9±0	8±0	6,25±0,3
C42	15,2±0	13,5±0	12,5±0	11±0	10±0	8,5±0	6,5±0
C54	15,2±0	14±0	11,75±0,3	9,25±0,3	7,5±0,7	6,5±0	5,25±0,3
C45 <sup>a</sup>	15,2±0	12,5±0	9,75±0,3	7±0	5±0	4±0	3,25±0,3
C109	15,2±0	13,5±0	11,25±0,3	9,25±0,3	8±0	7±0	6±0
CTP2b	15,2±0	13,8±0	12±0	10±0	8±0	6,5±0	5,25±0,3
C129	15,2±0	14,25±0,3	13,25±0,3	12,5±0	11,65±0,2	11±0	10±0
C134	15,2±0	13±0	11±0	9±0	7,9±0,1	6,75±0,3	5,5±0,7
C139	15,2±0	13±0	11±0	9,25±0,3	7,25±0,3	6±0	5±0
1007 <sup>a</sup>	15,2±0	13±0	11±0	8±0	6±0	4,25±0,3	4±0
C145 <sup>a</sup>	15,2±0	13±0	10±0	7,3±0,4	6±0	5±0	4±0
C163	15,2±0	14±0	12,5±0	11±0	9±0	8±0	6,75±0,3
C168	15,2±0	14±0	13±0	11±0	10±0	8,75±0,3	7,25±0,3
C204	15,2±0	13,5±0	13±0,3	9±0	7±0	5,75±0,3	5±0
C230	15,2±0	14±0	13±0	10,25±0,3	8,75±0,3	7,75±0,3	6,75±0,3
CAR 50.30	15,2±0	14±0	13±0	11,5±0,7	10±0	9±0	7±0

<sup>a</sup>: leveduras que apresentaram maior consumo de açúcar ao final de 24 horas de fermentação.

T0: tempo inicial da fermentação; T4: após 4 horas de fermentação; T8: após 8 horas de fermentação; T12: após 12 horas de fermentação;

T16: após 16 horas de fermentação; T20: após 20 horas de fermentação; T24: após 24 horas de fermentação.

A análise do mosto fermentado foi feita por CLAE para determinar a quantidade de etanol produzida ao final da fermentação e o consumo dos açúcares. No início da fermentação os valores de glicose, sacarose e frutose foram iguais para todas as amostras (39,91 g/L; 159,62 g/L; 44,77 g/L respectivamente). Ao final das 24 horas foi possível constatar que as 4 leveduras (C2, C45, C145 e UFMG-CM-1007) apresentaram os melhores valores em relação a capacidade fermentativa pois consumiram quase todo o açúcar presente no meio e produziram quantidades significativas de etanol. A leveduras C45 foi a que consumiu mais açúcares, restando apenas 0,10g/L de glicose e 0,67g/L de frutose. Segundo ROSA et al. (2016), o mosto após a fermentação apresenta cerca de 8% de etanol, sendo assim, os valores de 7,14%, 7,2%, 7,91% e 7,26% de etanol produzido pelas leveduras C2, C45, C145 e UFMG-CM-1007, respectivamente, estão de acordo com o esperado, conforme a Tabela 8.

**Tabela 8** – Concentração em g/L dos compostos encontrados no início (T0) e no fim da fermentação (T24) por CLAE.

Amostra	T0			T24				
	Glicose	Sacarose	Frutose	Glicose	Sacarose	Frutose	Glicerol	Etanol
C2	39,91	159,62	44,77	9,13	0,08	27,83	10,20	71,44
C45	39,91	159,62	44,77	0,10	ND	0,67	12,01	72,03
C145	39,91	159,62	44,77	0,10	4,02	7,62	17,45	79,10
1007	39,91	159,62	44,77	0,16	0,46	12,91	12,48	72,61

A formação de glicerol, composto inicialmente ausente no caldo de cana, foi detectada após 20 horas de fermentação. Este composto é responsável pela formação do corpo das bebidas e quando em altas concentrações, pode contribuir com o sabor adocicado (NIEUWOUDT *et al.*, 2002). Nas cachaças, a concentração de glicerol pode atingir cerca de 10% da concentração de etanol (MAIA et al., 1994; GERVASIO et al., 2002). A levedura C145 foi capaz de produzir maior quantidade deste composto (17,45 g/ml) o que pode influenciar positivamente no sabor e aspecto global da bebida; no entanto, quando a produção do glicerol é muito alta, há uma redução do rendimento, devido ao desvio de grande parte do açúcar para sua produção. Em contrapartida, o mosto fermentado com a levedura C2 foi o que apresentou menor formação de glicerol (10,2 g/ml).

## 5.7. Produção das Cachaças em Escala Piloto

Após o teste de fermentação, as leveduras que apresentaram melhor desempenho, C2, C45, C145 e a levedura controle UFMG-CM-1007, foram utilizadas para a produção de cachaça em dornas de 20L. Todas as quatro fermentações foram iniciadas a 15°brix e temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). A fermentação durou cerca de 48 horas, e ao longo deste período, a temperatura e o brix dos mostos foram mensurados. Ao final da fermentação, a dorna com menor brix foi aquela inoculada com a levedura C145 (3,5°Brix), seguida da UFMG-CM-1007 e C45 (5°Brix), e por último a C2 (5,5°Brix).

Ao longo da fermentação com a levedura C145 foi possível observar que esta estava muito aromática, remetendo a características de um vinho frisante, onde foi facilmente identificado aromas frutados, levemente adocicado e a presença marcante de álcool. A formação de gás foi bem intensa, com formação de espuma mais clara, e durante a destilação, o aroma de banana foi perceptível.

Durante a fermentação utilizando a levedura controle, UFMG-CM-1007, houve a formação de muita espuma escura, que só foi desaparecer ao final do processo. O aroma era levemente frutado com presença discreta de álcool. A formação de gás era facilmente perceptível e ao ser destilada foi detectado aroma de banana.

A fermentação com a levedura C45 também apresentou formação de espuma escura que desapareceu ao final. Com 24 horas, o cheiro ainda era predominantemente doce remetendo apenas a açúcar. A formação de gás era facilmente identificada e ao ser destilada também apresentou odor de banana.

Como nas duas anteriores, a fermentação utilizando a levedura C2 também apresentou formação de espuma escura. Após 24 horas o aroma era doce, mais suave do que na C45, misturado ao odor de folhas verdes. Foi possível identificar a presença discreta do álcool, e a formação acentuada de gás. Como todas as outras, ao ser destilada também apresentou aroma de banana.

A acidez volátil do mosto antes da destilação, geralmente, é a 550 ml de ácido acético por 100 ml de álcool anidro (PEREIRA et al., 2006). Este valor é indicativo que a acidez volátil da cachaça destilada não ultrapassará o limite permitido na legislação

brasileira (PEREIRA et al., 2006). A acidez volátil dos quatro mostos fermentados estava dentro dos limites sugeridos acima (Tabela 9).

**Tabela 9** - Determinação de acidez e pH do mosto fermentado e da cachaça.

Levedura	Acidez*		pH	
	Mosto	Cachaça	Mosto	Cachaça
C2	378,95	81,45	3,72	4
C45	540	66,66	3,77	3,96
C145	365,22	88,88	3,68	3,89
1007	390	96,25	3,73	4,24

\* mg ácido acético/100ml

O pH do mosto fermentado foi ácido, sendo em média de 3,75. BONASSA *et al.* (2013) acompanharam as alterações de pH ao longo da fermentação da cachaça e os resultados encontrados por eles foram semelhantes aos aqui descritos.

Após a destilação, novamente a acidez volátil e o pH foram mensurados. De acordo com a Instrução Normativa número 13 de 29 de junho de 2005, a acidez volátil máxima permitida para cachaça é de 150 ml de ácido acético/100 ml, desta forma, todas as quatro cachaças produzidas estavam dentro do permitido, podendo então ser consumidas e testadas quanto à aceitação e intenção de compra na análise sensorial.

### **5.8. Análise por Cromatografia Gasosa das Cachaças Produzidas com as Linhagens Selecionadas**

Após o preparo das quatro cachaças, estas foram analisadas por cromatografia gasosa a fim de verificar o perfil de compostos voláteis. Foram encontrados compostos de diversas classes, dentre eles, álcoois, cetona, aldeídos, ácidos, alcanos, cicloalcanos e ésteres (Tabela 10). Ao analisar trabalhos de outros autores (FURTADO, 1995; GOMES, 2002, SILVA, 2009) é possível verificar semelhança com os compostos aqui descritos. No entanto, algumas divergências também são notadas e estas podem ser devido a diferença de origem das leveduras, as diferenças de preparo da fermentação e do material do destilador. FURTADO (1995), ao comparar sete cachaças recém destiladas, identificou em suas amostras acetaldeído, acetato de etila, metanol, etanol, n-propanol, 2-butanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico

e ácido acético. GOMES (2002) avaliou cachaças produzidas a partir de duas culturas iniciadoras de *S. cerevisiae* e observou a formação de álcoois (1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, 2,3-butanodiol, fenil etanol, etanol), ácido acético, acetaldeído e ésteres (acetato de etila, octano de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, caprioato de etila, caprilato de etila). SILVA et al. (2009), ao analisar os compostos voláteis produzidos por leveduras selecionadas durante o início, meio e fim da fermentação em uma destilaria, verificaram a formação de etanol, acetato de etila, ácido acético, acetaldeído, propanol e álcoois isobutílico, isoamílico e superiores.

**Tabela 10** – Compostos encontrados por Cromatografia Gasosa.

Nome	Classificação	Amostras
Álcool isoamílico	Álcool	C2, C45, C145, 1007
1-Propanol	Álcool	C2, C45, C145, 1007
Acetoína	Cetona	C2, C45, C145, 1007
Acetaldeído Dietil Acetal	Aldeído	C2, C45, 1007
Acetaldeído	Aldeído	C2, C45, C145, 1007
Butane-2,3-diol	Álcool	C2, C45, C145
Butanol	Álcool	C2, C45, C145, 1007
Etanol	Álcool	C2, C45, C145, 1007
Ácido acético	Ácido	C2, C45, C145, 1007
n-Hexane	Alcano	C2, C45, C145, 1007
Metilciclopentano	Cicloalcano	C2, C45, C145, 1007
Acetato de Etila	Éster	C145

O composto com maior área presente em todas as amostras foi o etanol, isso se deve ao fato de que as cachaças produzidas estavam com teor alcoólico em torno de 40,5%. Foi detectado hexano nas amostras, um hidrocarboneto alcano nocivo à saúde, no entanto, este composto não é proveniente da amostra, mas sim resíduo de limpeza da agulha de injeção do equipamento, devido ao protocolo de higienização empregado.

O acetato de etila, detectado apenas na cachaça produzida com a levedura C145, tem impacto positivo na qualidade da bebida, pois confere odor frutado semelhante ao encontrados nos vinhos. No entanto, quando em baixas concentrações, 75mg/L, seu odor não é detectado, e em concentrações superiores a

200mg/L confere aroma desagradável (SOUZA et al., 2012; ETIÉVANT, 1991). Segundo OLIVEIRA (2001), este éster é o predominante nas bebidas alcoólicas em geral, no entanto, sua maior formação ocorre durante o envelhecimento das bebidas (CARDOSO, 2014). Como as cachaças aqui estudadas não passaram por nenhum processo de maturação ou envelhecimento isso poderia justificar a pequena presença deste composto na cachaça produzida com a leveduras C145 e a ausência nas demais cachaças.

A presença do álcool isoamílico pôde ser facilmente notada durante a destilação das cachaças, pois todas apresentaram odor marcante de banana, aroma característico deste álcool (CZERNY et al. 2008). Juntamente com os ésteres, os álcoois superiores formados a partir de álcool isoamílico são responsáveis pela formação do aroma e sabor da cachaça, no entanto, quando em excesso, pode comprometer significativamente a qualidade de bebidas destiladas (CARDOSO et al., 2014).

O aroma doce associado a “grama recém cortada” e folhas verdes, observado durante a fermentação com a levedura C2 pode ser explicada pela presença de acetaldeído (MEILGAARD, 1975). NASCIMENTO e colaboradores (1997) caracterizaram por cromatografia líquida 56 cachaças quanto à formação de aldeídos, e observaram que o aldeído presente em maior quantidade foi o acetaldeído.

O 1-propanol foi identificado em todas as amostras analisadas e a sua presença pode ser associada a bebidas de baixa qualidade (BOZA & HORII, 2001). No entanto, é necessário realizar a quantificação deste composto para que tal relação seja considerada.

## **5.9. Análise Sensorial**

A análise sensorial de cachaça foi realizada com 71 provadores não treinados a fim de verificar a aceitação e intenção de compra. O perfil dos participantes foi, cerca de 53,5% homens e 46,5% mulheres, a maioria com idade entre 18 e 25 anos (56,34%), e com frequência de consumo de cachaça esporádico (66,2%) conforme descrito na Tabela 11. Após a análise dos resultados, conforme descrito na Tabela 12, foi possível observar que a cachaça produzida com a levedura C145 foi a que apresentou maior média de notas para os quesitos cor, aroma e impressão global



(5,34 ± 1,15; 5,07 ± 1,28; 4,93 ± 1,35 respectivamente) com notas entre “gostei” e “gostei muito”. Já para aroma, a cachaça produzida com a leveduras controle, UFMG-CM-1007, foi a que obteve maior média (4,87 ± 1,31, “não gostei nem desgostei” e “gostei”). Com relação a intenção de compra duas amostras apresentaram médias estatisticamente semelhantes (3,20 ± 1,15 e 3,17 ± 1,18) indicando “talvez comprasse, talvez não comprasse” e “possivelmente compraria”, sendo elas as produzidas com a leveduras C45 e C145. No entanto, a diferença significativa dos valores encontrados ocorreu apenas no atributo cor para a cachaça produzida com a levedura C145 quando comparada com cachaça produzida com a levedura controle (UFMG-CM-1007). Para todos os demais atributos estudados, aroma, sabor, impressão global e intenção de comprar, todas as notas não se diferenciaram significativamente, indicando que as cachaças produzidas com as leveduras ambientais selecionadas ao longo deste trabalho, apresentaram aceitação e intenção de compra similares a cachaça produzida com a levedura controle.

**Tabela 11** – Informações socioeconômicas dos participantes da análise sensorial.

<b>Perfil</b>	<b>Classificação</b>	<b>Distribuição</b>	<b>%</b>
Sexo	Masculino	38	53,5
	Feminino	33	46,5
Idade	Menor que 18 anos	0	0
	Entre 18 e 25 anos	40	56,3
	Entre 26 e 35 anos	23	28,2
	Entre 36 e 45 anos	5	7,04
	Entre 46 e 55 anos	2	2,82
	Entre 56 e 65 anos	1	1,41
	Ensino médio incompleto	1	1,41
Escolaridade	Ensino médio completo	6	8,45
	Ensino superior incompleto	23	32,39
	Ensino superior completo	8	11,27
	Mestrado/Doutorado	31	43,66
	Especialização	2	2,81
Renda	Entre 1 e 5 salários mínimos	39	54,93
	Entre 5 e 10 salários mínimos	15	21,13
	Entre 10 e 20 salários mínimos	16	22,53

Continua

Perfil	Classificação	Distribuição	Conclusão
			%
Gosta de cachaça?	SIM	54	76,06
	NÃO	17	23,94
Frequência de consumo?	Raramente	20	28,17
	Esporadicamente	47	66,2
	Frequentemente	2	2,81
	Nunca	2	2,81
	Diariamente	0	0

**Tabela 12** – Média e desvio padrão das notas para cada quesito avaliado na análise sensorial.

Amostra	Cor	Aroma	Sabor	Impressão global	Intenção de compra
C2	5,12 ± 1,28	4,69 ± 1,42	4,53 ± 1,42	4,64 ± 1,27	3,07 ± 1,07
C45	5,33 ± 1,18	4,96 ± 1,29	4,80 ± 1,29	4,99 ± 1,27	3,20 ± 1,15
C145	5,34 ± 1,15 <sup>a</sup>	5,07 ± 1,28	4,77 ± 1,54	4,93 ± 1,35	3,17 ± 1,18
1007	4,90 ± 1,4	4,76 ± 1,29	4,87 ± 1,31	4,88 ± 1,06	3,13 ± 1,08

<sup>a</sup>: p>0,05

## 6. CONCLUSÕES

Após a realização de todos os testes propostos neste trabalho, incluindo análise sensorial para verificar a aceitação e intenção de compra das cachaças produzidas é possível afirmar que, as *S. cerevisiae* ambientais são capazes de suportar diferentes condições de estresse, semelhantes ao encontrado ao longo do processo de fermentação da cachaça.

As leveduras ambientais, comparadas à UFMG-CM-1007, também apresentaram bom desempenho nos testes de fermentação tanto a nível de bancada quanto a nível piloto.

As cachaças produzidas com as três linhagens ambientais selecionadas apresentaram produção de compostos aromáticos e análise sensorial semelhante à linhagem comercial controle utilizada, sendo assim, é possível afirmar que as leveduras ambientais, C2, C45 e C145, apresentam grande potencial para serem utilizadas como culturas iniciadoras para a produção de cachaça.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A fermentação da cachaça de alambique. **Mapa da Cachaça**, 2019. Disponível em: <<https://www.mapadacachaca.com.br/artigos/a-fermentacao-da-cachaca-de-alambique/>>, Acesso em: 05 de mai. de 2019.

AMERINE, M. A.; CRUESS, W. V.; BERG, H. W. The Technology of Wine Making: 3d Ed., 1972.

AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v. 85, p. 76-83, 2016.

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

ARAÚJO, T. M. et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-18, 2018.

BADOTTI, F. et al. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 205-213, 2010.

BADOTTI, F. et al. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 579-587, 2010.

BARBOSA, E. A. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1038-1051, 2016.

BARBOSA, R. et al. Multiple Rounds of Artificial Selection Promote Microbe Secondary Domestication - The Case of Cachaça Yeasts. **Genome biology and evolution**, v. 10, n. 8, p. 1939-1955, 2018.

BARNETT, J. A. The Utilization of Disaccharides and Some Other Sugars RY Yeasts<sup>1</sup>. In: **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. Academic Press, 1981. p. 347-404.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. ed. 1999.

BELLOCH, C. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1, p. 188-195, 2008.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2705-2712, 2008.

BERRY, D. R.; SLAUGHTER, J. C. Alcoholic beverage fermentations. In: **Fermented beverage production**. Springer, Boston, MA, 2003. p. 25-39.

BONASSA, G. et al. Análise da Influência do pH e da Temperatura no Processo de Fermentação de Caldo de Cana. **III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência, Toledo, Paraná**, 2013.

BRASIL. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Instrução Normativa n.13, de 29/06/2005. ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E. Brasília 2005.

CANUTO, M. H. Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado. 2013. p.103. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência – Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARDOSO, K. C. R. Envelhecimento de Cachaça Orgânica em Barris de Diferentes Madeiras. 2014. 85f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CARDOSO, M. G. Produção de Aguardente de Cana. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 445p. 2006.

CARDOSO, M. G. Produção de Aguardente de cana-de-açúcar. Lavras: Editora UFLA, 2001.

Conab divulga 2º levantamento da safra 2018/19 de cana-de-açúcar. Nova Cana, 2018. Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-safra-2018-19-cana-de-acucar-210818>>, Acesso em: 09 de nov. de 2018.

CONCEIÇÃO, L. E. F. R. et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 237-246, 2015.

CZERNY, M. et al. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 265-273, 2008.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-Saccharomyces yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 175-194, 2013.

ETIÉVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. Cap. 14, p. 483-546.

FIEDUREK, J.; PIELECKI, J.; SKOWRONEK, M. Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenized cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 40, n. 2, p. 111-118, 2000.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. **Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônomo**, p. 31-44, 2008.

FLEET, G. M. Yeasts-growth during fermentation. **Wine Microbiology & Biotechnology**, p. 27-54, 1993.

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. 99p. 1995. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) –Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GERVASIO, A. P. G. et al. Potentiometric flow injection determination of glycerol in distilled spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74-77, 2002.

GOES, T.; ARAUJO, M.; MARRA, R. Novas fronteiras tecnológicas da cana-de-açúcar no Brasil. **Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

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

GOMES, F. C. O. et al. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 486-492, 2010.

GOMES, F. C. O. et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2438-2447, 2007.

GONÇALVES, C. M. et al. Uso de levedura selecionada em escala piloto para a produção de cachaça de alambique. 2015.

GRIVET, L. et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 2, p. 009-017, 2004.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2002.

GUERRA, J. B. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.

GUTIÉRREZ, A. R. et al. Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. **International journal of food microbiology**, v. 36, n. 2-3, p. 241-245, 1997.

HART, H.; SCHUETZ, R. D. Química Orgânica. Trad. Regina SV Nascimento. RJ. 1983.

HOLZAPFEL, W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. **Food control**, v. 8, n. 5-6, p. 241-258, 1997.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: **The yeasts**. Elsevier, 2011. p. 21-44.

KARKAŞ, T.; ÖNAL, S. Characteristics of invertase partitioned in poly (ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 142-150, 2012.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: **The yeasts**. Elsevier, 2011. p. 87-110.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BARZANI, W.; SCHMIDKEK, W. Biotecnologia: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap.5: Cachaças. V.4.p. 145-207.

LIMA, U. de A. et al. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 3, p. 1-43, 2001.



LIZ, C. N. et al. PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL E SEU CONTEXTO: um estudo de caso com alambiques do sul de Minas Gerais. **Revista da UIIPS**, v. 4, n. 4, p. 20, 2016.

LLISTO, A. M. S. M.; DE SOUZA, L. G.; MISCHAN, M. M. Alguns componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de cana: ésteres. **Brasil açucareiro**, 1979.

LOPEZ, V. et al. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 81, n. 1, p. 63-71, 2003.

MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB. Belo Horizonte**, v. 12, n. 6, p. 29-33, 1994.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, Eduardo Antônio Pinto. Tecnologia da cachaça de alambique. **Belo Horizonte: SEBRAE/MG: SINDBEBIDAS**, 2006.

MAIA, A. B.; PEREIRA, A. R.; SCHWBE, W. K. Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade. **Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Otoni**, p. 75-93, 1994.

MARTINS, M. F. et al. Gestão e tecnologia em engenhos produtores de cachaça no brejo da Paraíba-Brasil. **Revista Gestão Industrial**, v. 14, n. 3, 2018.

MEILGAARD, M. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavour and threshold of 239 aroma volatiles. **Master Brewers Association of the Americas**, v.12, 1975, p. 151-168.

Mercado interno. Ibarc, 2018. Disponível em: <<https://tecnoblog.net/247956/referencia-site-abnt-artigos/>>. Acesso em: 16 de out. de 2018.

MORAIS, P. B. et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugarcane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 241-243, 1997.

MORO, E. et al. A rapid and simple method for simultaneous determination of glycerol, fructose, and glucose in wine. **American journal of enology and viticulture**, v. 58, n. 2, p. 279-282, 2007.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente de Cana. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas**. São Paulo: ed. Blucher, 2016. p.307-347.

NASCIMENTO, R. F. do; NETO, B. S. L.; FRANCO, D. W. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. **Engarrafador Moderno**, v. 49, p. 75-77, 1997.

NETTO, O. V. C; ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. Identificarion of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16s rDNA gene sequencing. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 508-515, 2008.

NIEUWOUDT, H. et al. Glycerol and wine quality: fact and fiction. **Wynboer: a technical Guide for Wine Producers**, 2002.

NOVAES. F. V. **Tecnologia da aguardente**. Piracicaba: Centro Acadêmico Luiz de Queiroz, 1974. 143p.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed). **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991. p.548-580.

NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Springer Science & Business Media, 1983.

OLIVEIRA, E. S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004.

OLIVEIRA, E. S. et al. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 707-715, 2005.

OLIVEIRA, E. S. Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da cachaça de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. 2001. 135f. 2001. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OTTERSTEDT, K. et al. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO reports**, v. 5, n. 5, p. 532-537, 2004.

PATARO, C. et al. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 202-208, 2002.

PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 24-31, 2000.

PAULO, C. S. et al. Produção de cachaça artesanal com cepas de leveduras selvagens. *Nativa-Revista de Ciências Sociais do Norte de Mato Grosso*, v. 5, n. 2, 2016.

PEREIRA, A. F. et al. Adição de fontes de nitrogênio e duas linhagens de levedura na fermentação alcoólica para produção de cachaça. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 1, n. 1, p. 45-59, 2015.

PEREIRA, J. A. M.; ROSA, C. A.; FARIA, J. B. Cachaça de alambique. **Tecnologia Fácil-8. Brasília: LK Editora**, 2006.

PEREIRA, N. E. et al. Compostos Secundários em Cachaças Produzidas no Estado de Minas Gerais Secondary Compounds in Brazilian Sugar-Cane Spirits ("Cachaça") Manufactured in Minas Gerais State. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, 2003.

PINHEIRO, S. H. M. *Perfil da qualidade da cachaça do Ceará*. Fortaleza: Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, 1999. 133p. (Dissertação de Mestrado)

RAMOS, J.; GONÇALVES, D. B. PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE CACHAÇA ARTESANAL. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 16, n. 1, 2018.

RIBEIRO, M. L. D. et al. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n. 3, p. 458-463, 2017.

RIBEIRO, M. L. D. Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento. 2016.

ROMANO, P. et al. Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003.

ROSA, C. A.; JÚNIOR, A. M. S.; FARIA, J. B. Cachaça de Alambique. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas Alcoólicas*. São Paulo: ed. Blucher, 2016. p.359-368.

SAFAR, S. V. B. Diversidade molecular e fisiológica de isolados indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de diferentes ecossistemas brasileiros. 2013. 100p. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia) – Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

SANTOS, A. A. et al. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

SEBRAE. Cachaça brasileira, os números de um mercado em expansão. SEBRAE, 2014. Disponível em <http://www.sebraemercados.com.br/cachaca-brasileira-os-numeros-de-um-mercado-em-expansao>. Acesso em: 12 de dez. de 2018.

SEBRAE-MG. Cachaça Artesanal. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais 2013.

SILVA, C. L. C.; ROSA, C. A.; OLIVEIRA, E. S. Studies on the kinetic parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydrogen sulfide-producing strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 857-863, 2006.

SILVA, C.L. et al. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International journal of food microbiology**, v. 131, n. 2, p. 203-210, 2009.

SIPICZKI, M. et al. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, p. 97-105, 2001.

SORATTO, A. N. et al. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n.4, p. 681-687, 2007.

SOUZA, A. P. G. et al. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 379-392, 2012.

SOUZA, R. L. Cachaça, vinho, cerveja: da Colônia ao século XX. **Revista Estudos Históricos**, v. 1, n. 33, p. 56-75, 2004.

STROPPIA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1978-1983, 2009.

TEIXEIRA, V. Efeito da clarificação na microbiota e qualidade da cachaça orgânica. 2016.

VALÉRIO, M. F. R. J. et al. Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). 2018.

VALERO, E. et al. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 10, p. 959-969, 2005.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5a Ed. Elsevier. v. 1. p. 733-746, 2011.

VIANNA, C. R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaca: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 1-2, p. 205-217, 2008.

WILLIAMS, K. M.; LIU, P.; FAY, J. C. Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments. **Evolution**, v. 69, n. 8, p. 2079-2093, 2015.

YOKOYA, F. Fabricação de cachaça de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello, 1995.

ZAMBONELLI, C.; SOLI, M. G.; GUERRA, D. A study of H<sub>2</sub>S non-producing strains of wine yeasts. **Annali di microbiologia ed enzimologia**, v. 34, p. 7-15, 1984.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1074-1077, 2002.

RIBEIRO, M. L. D. et al. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 458-463, 2017.

SILVA JÚNIOR, A. O.; GRIGOLI, A. A.; MACENA, D. A. Quantificação e análise comparativa do teor de metanol em amostras de cachaças de diferentes origens. **Colloquium Exactarum**. p. 59-67, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Ficha de Análise Sensorial: Aceitação e Intenção de Compra

#### Ficha de Avaliação do Teste de Aceitação e Intenção de Compra da Cachaça

**Amostra:**

**Provedor:**

**Nome:**

**Data:**

#### **Você está recebendo uma amostra de cachaça.**

Por favor, observe-a primeiro sem prová-la. Em seguida, marque na escala abaixo o quanto você gostou do produto em relação à **cor** (aparência).

- ( ) Desgostei extremamente
- ( ) Desgostei muito
- ( ) Desgostei
- ( ) Não gostei nem desgostei
- ( ) Gostei
- ( ) Gostei muito
- ( ) Gostei extremamente

Por favor, cheire-a, em seguida coloque-a na boca sem engolir, aguarde 30 segundos e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação ao **aroma característico de cachaça**.

- ( ) Desgostei extremamente
- ( ) Desgostei muito
- ( ) Desgostei

- Não gostei nem desgostei
- Gostei
- Gostei muito
- Gostei extremamente

Por favor, marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação ao **sabor característico de cachaça**.

- Desgostei extremamente
- Desgostei muito
- Desgostei
- Não gostei nem desgostei
- Gostei
- Gostei muito
- Gostei extremamente

Com base em sua opinião sobre esta amostra, marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à **impressão global (aparência, aroma, sabor e textura considerados em conjunto)**.

- Desgostei extremamente
- Desgostei muito
- Desgostei
- Não gostei nem desgostei
- Gostei
- Gostei muito
- Gostei extremamente



Agora, por favor, responda:

Quais **características sensoriais** você mais **gostou** neste produto?

Aparência

Aroma

Sabor

Por quê? \_\_\_\_\_

Quais **características sensoriais** você mais **desgostou** neste produto?

Aparência

Aroma

Sabor

Por quê? \_\_\_\_\_

Com base em sua opinião sobre esta amostra, indique na escala abaixo sua **intenção de compra**. Qual seria sua atitude de compra em relação a esta cachaça?

- ( ) Certamente não compraria
- ( ) Possivelmente não compraria
- ( ) Talvez comprasse, talvez não comprasse
- ( ) Possivelmente compraria
- ( ) Certamente compraria

Por quê? \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

ANEXO 2 -Tabela com os resultados dos testes de Lisina e produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) para todas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas no presente trabalho.

Leveduras	Lisina	H <sub>2</sub> S <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>3</sup>
C1	-	-	-	-
C2	-	-	-	-
C3	-	-	-	-
C4	-	-	-	-
C37	-	-	-	-
C38	-	+	+	+
C39	-	+	+	+
C40	-	+	+	+
C41	-	-	-	-
C42	-	-	-	-
C43	-	-	-	-
C45	-	-	-	-
C46	-	-	-	-
C47	-	-	-	-
C48	-	-	-	-
C49	-	-	-	-
C51	-	-	-	-
C52	-	-	-	-
C53	-	+/-	+/-	+/-
C54	-	-	-	-
C55	-	+/-	+/-	+/-
C109	-	-	-	-
C111	-	-	-	-
CTP2a	-	-	-	-
CTP2b	-	-	-	-
C129	-	-	-	-
C130	-	-	-	-
C132	-	-	-	-
C133	-	-	-	-
C134	-	-	-	-
C139	-	-	-	-

Continua				
Continuação				
Leveduras	Lisina	H <sub>2</sub> S <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>3</sup>
C140	-	-	-	-
C141	-	-	-	-
C145	-	-	-	-
C146	-	-	-	-
C147	-	+/-	+/-	+/-
C148	-	-	-	-
C149	-	+/-	+/-	+/-
C158a	-	-	-	-
C161a	-	-	-	-
C161b	-	-	-	-
C162	-	-	-	-
C163	-	-	-	-
C164	-	-	-	-
C166	-	-	-	-
C167	-	-	-	-
C168	-	-	-	-
C203	-	-	-	-
C204	-	-	-	-
C205	-	-	-	-
C229	-	-	-	-
C230	-	-	-	-
C231	-	-	-	-
YEFO36L	-	+	+	+
YEFO34	-	+	+	+
CAR 49.30	-	-	-	-
CAR 50.30	-	-	-	-
ID 38.2	+	+	+/-	-
FH 31.1	+	-	-	+/-
RD 10.3	-	+	+	+
IH 22.1	-	+	+	+
ID 23.3	+	+/-	+/-	-
R1CS 22.2	-	+/-	+/-	+
FTD 13	-	+/-	+	+

Continua				
Conclusão				
Leveduras	Lisina	H <sub>2</sub> S <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>3</sup>
FTD 14	-	+/-	+	+
FTD 24	-	+/-	+	+
R1CS 6.3	-	+/-	+	+
R1CS 7	-	+/-	+	+
CG 194	-	-	+/-	-
CG 195	-	+/-	+/-	+/-
CG 196	-	+/-	+/-	+/-
SIG 3.1	-	+	+	+
CG 192	-	+/-	+/-	+/-
CG 193	-	+/-	+/-	+/-
1007	-	+	+	+

1, 2 e 3: primeira, segunda e terceira repetição do experimento, respectivamente

ANEXO 3 – Tabela com média dos resultados dos testes de estresse para todas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas no presente trabalho.

Leveduras	pH			Glicose (%)			Sacarose (%)			Etanol (%)				Temperatura (C)						Critério por Condição	Critério Global
	2,8	3	3,2	20	25	30	10	15	20	8	10	12	15	10	15	25	30	37	42		
C203	6	6	5,5	3,5	3	1,5	6	6	6	6	6	6	6	0	0	2,5	6	6	6	1	28
C51	6	5,5	5	4	3,5	2,5	6	5,5	6	6	5,5	5,5	5,5	0	0	3,5	6	5,5	5,5	1	27
C204	6	5,5	5	4	3	1,5	6	6	5,5	5,5	6	6	6	0	0	2,5	6	6	5,5	1	26
CTP2b	4,5	4	4,5	2,5	2	1,5	5	6	5,5	5,5	5	5,5	6	0	0	1,5	4,5	4	5	1	12,5
C140	5	5	5	4	3	2	6	5,5	5,5	6	6	6	3	0	0	3,5	6	6	6	0,947368	23,5
C146	5,5	5,5	6	3	2,5	1,5	6	5,5	5,5	6	6	6	3	0	0	3	6	6	6	0,947368	23
C131	4,5	4,5	6	4,5	4,5	1,5	5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	3	0	0	3	5,5	6	6	0,947368	22
C48	5	4,5	6	3,5	3	2,5	5,5	5,5	5	6	5,5	5,5	5	0	0	3,5	5	6	5	0,947368	22
C41	5	5	5	3,5	3	2,5	5,5	5,5	5,5	5,5	6	6	4	0	0	3,5	5,5	4,5	6	0,947368	21,5
C229	4,5	5	5	3,5	2	2	5,5	5,5	5,5	5	6	5,5	6	0	0	2	5	4,5	4,5	0,947368	17
C54	3,5	4	4,5	3	2,5	1,5	5	5,5	5	4,5	5,5	5,5	5,5	0	0	3	4,5	4,5	4	0,947368	11,5
C47	5,5	4,5	5	4,5	2,5	2,5	5,5	5,5	6	4,5	4,5	5,5	5,5	0	0	3,5	5,5	5,5	5	0,894737	21
C49	5	4	5	4	3,5	2,5	6	5,5	4	5,5	5,5	5	5,5	0	0	3,5	4,5	5	5,5	0,894737	19,5
C3	5	6	5,5	4,5	3	2	6	5,5	6	6	5,5	4,5	0,5	0	0	3,5	4	5,5	6	0,894737	19
C46	4,5	4	4,5	3,5	3	2,5	6	5,5	5	5	5,5	5,5	4	0	0	3	5	5	6	0,894737	17,5
CAR 50.30	5	4,5	3,5	3,5	4	2	6	5	5	6	5,5	6	5	0	0	2	5	4,5	5	0,894737	17,5
C167	4	4	4	3,5	3	1,5	6	5	5	6	5,5	5	5,5	0	0	2,5	4	5	5,5	0,894737	15
C1	4	5,5	4	3,5	3	2	5	6	5	5,5	5	5	0,5	0	0	3,5	5	6	4,5	0,894737	13

Continua  
Continuação

Leveduras	pH			Glicose (%)			Sacarose (%)			Etanol (%)				Temperatura (C)				Critério por Condição	Critério Global		
	2,8	3	3,2	20	25	2,8	3	3,2	20	25	2,8	3	3,2	20	25	2,8	3			3,2	20
C230	4,5	3,5	4	3,5	2	1,5	5,5	5,5	4,5	5	5,5	6	5,5	0	0	1	3,5	4	4,5	0,894737	9,5
C161b	5,5	5,5	5	5	1,5	1,5	5	6	6	5,5	5,5	5	4	0	0	2	5	6	6	0,842105	20
C45	5,5	4,5	4,5	3,5	3	2,5	5,5	4,5	4,5	6	5,5	5,5	4	0	0	3	5,5	6	6	0,842105	19,5
C43	5,5	4,5	4,5	3,5	3	2,5	5	4,5	4,5	5,5	5	5,5	4	0	0	3	5,5	5	5	0,842105	16
C133	4	5,5	5	2,5	2,5	2,5	5	5,5	5	5	4,5	5,5	3,5	0	0	2,5	5,5	6	5,5	0,842105	15,5
C4	5,5	6	5	4	3	2	5,5	4,5	5,5	5,5	5,5	5	0,5	0	0	3,5	4	4,5	5,5	0,842105	15
C42	4,5	4	4,5	3,5	2,5	2,5	4,5	5,5	5	5	5,5	5,5	3,5	0	0	2,5	5,5	5	5,5	0,842105	14,5
CAR 49.30	4,5	5	4,5	4	2,5	2	5,5	5	5	5,5	5,5	4,5	4,5	0	0	2	4,5	4,5	5	0,842105	14
C163	4,5	5,5	4	3	2	1,5	5,5	5,5	5,5	4,5	5,5	4,5	3,5	0	0	2,5	5	5,5	5	0,842105	13
C231	4	3	4,5	4	2,5	2	5,5	5	5	5	5,5	5,5	5,5	0	0	1,5	4	5,5	5	0,842105	13
C168	3,5	4	4	3,5	2,5	1,5	4,5	4	4	6	5,5	6	5,5	0	0	2,5	4,5	5	6	0,842105	12,5
C37	5,5	5,5	4,5	4,5	3	1,5	5	4,5	5	5,5	5	4,5	0,5	0	0	3,5	4,5	4,5	5,5	0,842105	12,5
C164	5	5,5	5	3,5	1,5	1,5	5,5	6	5,5	5	5,5	5	4	0	0	3	6	6	6	0,789474	19,5
C134	3,5	4	5	4	3,5	2	4,5	5	5	6	6	5	3	0	0	3	5	5,5	5,5	0,789474	15,5
C2	5,5	5,5	5	4	3	2	5	4,5	4,5	4,5	5,5	5,5	2	0	0	3,5	4	5,5	6	0,789474	15,5
C139	4	5,5	4,5	2,5	4	2	5,5	4	5,5	5	5,5	4,5	3,5	0	0	2,5	6	5	5	0,789474	14,5
C145	5,5	5	4,5	3,5	2	1,5	4,5	4,5	4,5	5,5	5,5	4,5	3	0	0	3	5,5	5,5	5	0,736842	13
C130	4,5	4	4,5	3	2,5	1	4	4	4,5	5	4,5	5,5	5,5	0	0	3	6	5,5	4	0,736842	11
C129	4	3,5	4	3	2	1	5	4,5	4,5	4	4,5	5,5	5	0	0	3	4,5	4,5	4	0,736842	6,5

Continua  
Conclusão

Leveduras	pH			Glicose (%)			Sacarose (%)			Etanol (%)				Temperatura (C)						Critério por Condição	Critério Global
	2,8	3	3,2	20	25	2,8	3		2,8	3	3,2	20	25	2,8	3		2,8	3	3,2		
C109	4,5	4,5	4	3	3	2	4,5	5	5	4,5	4,5	4,5	5	0	0	3	4,5	5	4,5	0,684211	11
C111	3	3	2,5	2	2	1	4,5	4	4	4,5	5,5	5	3,5	0	0	2	3,5	4,5	3,5	0,526316	-2
C52	3	2,5	2,5	2	1,5	1	5	4,5	4,5	5,5	6	3,5	2,5	0	0	2	3	4,5	3,5	0,526316	-3
C132	3	3	3	2	1,5	1	4,5	5,5	4,5	4	4,5	3,5	2,5	0	0	1	5	5	4	0,473684	-2,5
CTP2a	2,5	2	3	1,5	1	0,5	5	5	4,5	6	5,5	5,5	6	0	0	0,5	3	1	2	0,421053	-5,5
C205	2,5	2,5	2,5	1,5	1	0,5	4	4,5	4,5	6	5,5	5	5	0	0	1	3	2,5	3	0,368421	-5,5
C141	3	3	2,5	1,5	1	0,5	5,5	5	5	4,5	3,5	5	2,5	0	0	1	3	4	3,5	0,368421	-6
C161a	2	2,5	3	1	1	0	5,5	5	5,5	5	4,5	3,5	3	0	0	1	2	5,5	3	0,368421	-7
C166	2	2,5	2	1	1	0	4,5	5	4,5	4,5	3,5	3	2,5	0	0	2,5	4	4,5	5,5	0,315789	-7,5
C158a	2	2	2	1	0,5	0	5	3	4	5	4	3,5	3	0	0	1	2,5	3	3	0,315789	-15,5
C148	2	2	2	1	0,5	0	3,5	4,5	4	3	4	3,5	2,5	0	0	1	3	3	3,5	0,263158	-17

Anexo 4 – Tabela com resultado do teste de floculação para todas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas no presente trabalho.

<b>Leveduras</b>	<b>Floculação <sup>1</sup></b>	<b>Floculação <sup>2</sup></b>	<b>Floculação <sup>3</sup></b>	<b>Média</b>	<b>Atividade de Floculação</b>
C42	96,58112	96,18744	96,13888	96,3±0,2	NF
C43	96,70458	97,00599	95,16074	96,3±1	NF
C45	95,51547	95,77213	96,66965	93±0,6	NF
C41	96,57445	95,45122	95,84827	96±0,6	NF
C4	95,3835	93,17277	97,5912	95,4±2,2	NF
C145	95,58964	95,25463	95,09259	95,3±0,3	NF
C3	94,64247	95,7402	95,4065	95,3±0,6	NF
C109	94,84244	94,99423	95,6289	95,1±0,4	NF
C146	94,6648	95,16779	95,23496	95±0,3	NF
C131	93,37567	95,30072	95,46483	94,7±1,2	NF
C139	94,6601	94,27629	94,14291	94,4±0,3	NF
C48	94,42356	94,28968	93,30107	94±0,6	NF
C161b	93,52013	94,03756	93,93579	93,8±0,3	NF
C230	93,91837	93,73044	93,65342	93,8±0,1	NF
C2	93,44054	93,80311	93,99529	93,7±0,3	NF
C167	92,65241	93,43882	94,75289	93,6±1,1	NF
C203	92,14271	93,85214	94,67704	93,6±1,3	NF
C54	93,98551	93,25983	93,28866	93,5±0,4	NF
C164	93,56942	93,30913	93,26841	93,4±0,2	NF
C140	93,93444	93,22327	92,82607	93,3±0,6	NF
C51	93,88874	92,02898	93,47891	93,1±1	NF
C204	93,1006	92,70897	93,35957	93,1±0,3	NF
C129	93,22033	92,96268	92,86391	93±0,2	NF
C46	92,43394	92,82367	93,78378	93±0,7	NF
CTP2b	92,38594	92,98851	93,44681	92,9±0,5	NF
C133	93,14618	92,51972	92,59318	92,7±0,3	NF
C163	93,33079	91,96019	92,79536	92,7±0,7	NF
C130	93,19924	91,82692	92,95356	92,7±0,7	NF
C134	93,29172	91,38233	93,18546	92,7±1,1	NF
C47	91,36647	91,93432	94,18336	92,5±1,5	NF
C37	92,09453	92,64106	92,61605	92,5±0,3	NF



					Continua Conclusão
<b>Leveduras</b>	<b>Floculação <sup>1</sup></b>	<b>Floculação <sup>2</sup></b>	<b>Floculação <sup>3</sup></b>	<b>Média</b>	<b>Atividade de Floculação</b>
C168	91,78961	92,75117	92,50375	92,3±0,5	NF
CAR 50.30	91,43503	91,4355	93,66664	92,2±1,3	NF
C231	91,13309	93,25352	92,08854	92,2±1,1	NF
C229	88,73098	91,61291	92,81652	91±2,1	NF

1, 2 e 3: primeira, segunda e terceira repetição do experimento, respectivamente.