



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DJAILTON RAMOS DE FIGUEIREDO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA NA REGIÃO DO BREJO
PARAIBANO**

CAMPINA GRANDE - PB

2020

DJAILTON RAMOS DE FIGUEIREDO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA NA REGIÃO DO BREJO
PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias. Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento de plantas.

Área de concentração: Agrobioenergia e Agricultura Familiar

Orientador: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder

**CAMPINA GRANDE – PB
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F475i Figueiredo, Djailton Ramos de.
Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras da cana-de-açúcar para produção de cachaça na região do brejo paraibano [manuscrito] / Djailton Ramos de Figueiredo. - 2020.
53 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder, Departamento de Agroecologia e Agropecuária -CCAA."
1. Aguardente. 2. Cana-de-açúcar. 3. Leveduras fermentadoras. 4. Produção da cachaça. I. Título
21. ed. CDD 633.61

DJAILTON RAMOS DE FIGUEIREDO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA NA REGIÃO DO BREJO
PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias. Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento de plantas.

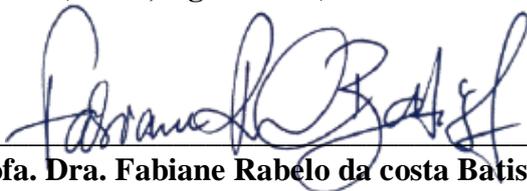
Área de concentração: Agrobioenergia e
Agricultura Familiar

Aprovada em 21 de dezembro de 2020

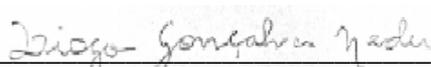
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr: José Félix de Brito Neto
(D. Sc., Agronomia) – UEPB



Profa. Dra. Fabiane Rabelo da Costa Batista
(D. Sc., Genética e Melhoramento de plantas) – INSA



Prof. Dr: Diogo Gonçalves Neder
(D. Sc., Genética e Melhoramento de plantas) – UEPB
Orientador

Ao meu irmão, Jailton Ramos de Figueiredo (*In memoriam*), referência na busca pelo conhecimento, na determinação, na vontade de querer ir sempre além. Parceiro de intelecto.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem de sempre querer ir à busca de novos conhecimentos.

À minha família, pai, mãe, irmão, por ser a base do que sou, por me transmitirem os princípios necessário ao meu desenvolvimento pessoal e pelo apoio incondicional em cada etapa da minha vida.

Ao meu parceiro de vida, Isack, por ser meu maior apoiador, por me aturar em cada fase de estresse, mas também pelos incentivos e comemorações a cada conquista.

Aos meus amigos, parceiros de trabalho, de formação, de caminhada, que me acompanham em cada degrau alcançado. De modo especial, minha querida amiga e irmã científica Mikaelly. Um presente que a biologia me deu.

Aos nobres companheiros de laboratório, Larissa e Yuri pelo apoio fundamental na condução desse trabalho. Por compartilhar as alegrias e dificuldades que são inerentes a todo trabalho de pesquisa.

Ao meu orientador, Diogo Neder, pelos ensinamentos passados e por ser um guia em cada etapa.

“O papel do infinitamente pequeno é infinitamente grande.”

Louis Pasteur

RESUMO

O brejo paraibano tem se destacado no cenário nacional na produção de cachaça que ganha força ao longo do tempo não só pelo volume produzido como também pela qualidade do produto. Uma das principais etapas na elaboração da cachaça é a fermentação, um processo biológico realizado por leveduras nas dornas, estando a qualidade do produto final diretamente ligada as características da cepa atuante. Sabendo que leveduras de diferentes origens carregam marcas de sua regionalidade no metabolismo, surge a problemática no cenário em que as leveduras selecionadas disponíveis comercialmente são oriundas do centro-sul do país. O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras nativas do brejo paraibano que reúnam o melhor perfil de eficiência no processo fermentativo, permitindo potencializar a qualidade do produto local, consolidando a identidade regional. Todas as etapas da pesquisa foram realizadas no Complexo Agroindustrial da UEPB, no município de Lagoa Seca, Paraíba. A cana foi moída logo após coleta e o caldo foi reservado por 24 horas. O caldo foi então diluído e inoculado em placas de Petri, as quais foram incubadas por 48 horas em estufa microbiológica. As colônias isoladas foram coletadas e preservadas, sendo então submetidas aos testes de seleção. Os isolados passaram pelos testes de fermentação de glicose, de tolerância a etanol, de produção de sulfeto de hidrogênio e de resistência a alta temperatura, sendo selecionadas aquelas com caráter positivo para fermentação de glicose, tolerância a etanol e alta temperatura e com caráter negativo para produção de sulfeto de hidrogênio. Foram isoladas 158 colônias, que após realização de todos os testes de exclusão apenas uma cepa, o isolado B5, apresentou comportamento favorável em todos os testes. Os resultados confirmaram a grande diversidade metabólica nas leveduras nativas, reforçando a importância de explorar a microbiota regional.

Palavras-chave: Aguardente. Cana-de-açúcar. Leveduras fermentadoras. Produção da cachaça.

ABSTRACT

The Paraiba swamp has stood out on the national scene in the production of cachaça, which has gained strength over time not only due to the volume produced but also by the quality of the product. One of the main stages in the production of cachaça is fermentation, a biological process carried out by yeasts in the vats. The quality of the final product is directly linked to the characteristics of the strain in action. Knowing that yeasts from different origins carry marks of their regionality in the metabolism, the problem arises in the scenario in which the selected yeasts available commercially come from the south-central part of the country. The objective of this work was to select native yeasts from the Paraiba swamp that have the best efficiency profile in the fermentation process, allowing to enhance the quality of the local product, consolidating the regional identity. All stages of the research were carried out at the UEPB Agroindustrial Complex, in the municipality of Lagoa Seca, Paraiba. The cane was ground right after collection and the juice was reserved for 24 hours. The broth was then diluted and inoculated in Petri dishes, which were incubated for 48 hours. Isolated colonies were collected and preserved, and then subjected to selection tests. The isolates were analyzed by the glucose fermentation, ethanol tolerance, hydrogen sulfide production and high temperature resistance tests, and those with a positive character for glucose fermentation, ethanol and high temperature tolerance and negative for production of hydrogen sulfide were selected. 158 colonies were isolated, which, after all exclusion tests were performed, only one strain, isolate B5, showed favorable behavior in all tests. The results confirmed the great metabolic diversity in native yeasts, reinforcing the importance of exploring the regional microbiota.

Keywords: Spirit. Sugar cane. Fermenting yeasts. Cachaça production.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores máximos permitidos de congêneres e contaminantes orgânicos e inorgânicos na cachaça determinados pela instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) com alterações.....	21
Tabela 2	Número de colônias isoladas em cada grupo.....	31
Tabela 3	Cepas submetidas ao teste de produção de H ₂ S divididas conforme produção ou não.....	39
Tabela 4	Visão geral da produção e H ₂ S pelas cepas testadas em diferentes momentos.....	40
Tabela 5	Desenvolvimento das cepas nas diferentes concentrações de etanol.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Volume de produção de cana-de-açúcar em milhões de toneladas, dos 10 maiores produtores mundiais no ano de 2018. Fonte: FAO, 2020.....	15
Figura 2	Principais produtos agrícolas brasileiros por volume de produção em milhões de toneladas no ano de 2018. Fonte: FAO.....	15
Figura 3	Esquema geral da fermentação alcoólica.....	24
Figura 4	Esquema do sistema de poços realizado no meio solidificado, aplicado nos testes de produção e tolerância a etanol. Fonte: O autor, 2020.....	33
Figura 5	Esquema de leitura para o teste de fermentação. Fonte: O autor, 2020.....	34
Figura 6	Esquema para inoculação do teste de crescimento a 37 °C. Fonte: O autor, 2020.....	36
Figura 7	Esquema para inoculação do teste de crescimento a 37 °C. Fonte: O autor, 2020.....	42
Figura 8	Perfil de fermentação de todas as cepas testadas durante o período de teste. Fonte: Dados da pesquisa.....	44
Figura 9	Desenvolvimento das leveduras a 37 °C. Fonte: Dados da pesquisa.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	14
2.1	A cana de açúcar	14
2.2	Cachaça, identidade do Brasil	16
2.3	Produção da cachaça	18
2.4	Composição química e perfil de qualidade da cachaça	20
2.5	Leveduras: usinas biotecnológicas	22
2.6	Leveduras fermentadoras	24
2.7	Leveduras na produção da cachaça	25
3	HIPÓTESE	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Meios de cultivo	30
4.2	Isolamento das leveduras	30
4.3	Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)	32
4.4	Teste de fermentação	33
4.5	Teste de tolerância a etanol	34
4.6	Crescimento a 37 °C	33
4.7	Fermentação e destilação em laboratório	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Isolamento das leveduras	38
5.2	Produção de sulfeto de hidrogênio	39
5.3	Teste de fermentação de glicose	41
5.4	Teste de tolerância a etanol	45
5.5	Crescimento a 37 °C	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

Um dos produtos agrícolas brasileiros mais representativos atualmente é sem sombra de dúvidas a cachaça. Considerada como a bebida de identidade nacional, estando para o Brasil assim como o uísque está para a Escócia, a tequila para o México, e a vodca para a Rússia, por exemplo, a cachaça vem conquistando cada vez mais apreciadores ao longo do tempo garantido a posição de segundo destilado mais consumido no mundo.

Aparecendo nesta terra ainda no período do Brasil colônia nos engenhos de cana-de-açúcar, a aguardente de cana era popular dentre as classes menos favorecidas da sociedade naquela época, ou seja, em geral grupos de menor poder aquisitivo. A princípio a elaboração da bebida era basicamente a fermentação espontânea do caldo seguida de destilação em alambique do vinho produzido, sem muita preocupação com padronização.

Aos poucos a bebida foi se espalhando e caindo no gosto de outras camadas sociais. E com a crescente popularização da bebida surgiu a necessidade de se definir padrões de qualidade e, sobretudo de estabelecer limites na concentração de compostos potencialmente danosos à saúde dos consumidores. Desse modo a cachaça ganhou regulamentação própria e reconhecimento legal, sendo definida por lei com a “bebida típica e exclusiva do Brasil, elaborada a partir da fermentação do caldo de cana seguida de destilação simples, apresentando teor alcoólico de 38% a 48%” (BRASIL, 2005).

A matéria prima para produção de cachaça é a cana-de-açúcar, um dos produtos agrícolas de maior importância do país. A cultura da cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil pelos colonizadores ainda nos primeiros anos da ocupação, que de cara já apresentou ótima adaptação às condições climáticas e composição do solo neste novo mundo. Isso é refletido pela presença de áreas de cultivo destinadas à cana em todas as regiões do país, seja em maior ou menor escala. Hoje o volume de produção de cana no Brasil posiciona o país, com folga, na primeira colocação mundial dentre as nações produtoras (FAO, 2020).

Dentre as cinco regiões brasileiras o sudeste concentra as maiores áreas de cultivo de cana e conseqüentemente apresenta as maiores taxas de produção de seus derivados, tais como açúcar, etanol, bem como a cachaça (BRASIL, 2019). O nordeste apresenta uma produção total relativamente pequena, correspondendo a aproximadamente 8% da produção nacional, sendo os estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba os principais produtores da região.

O subproduto da cana-de-açúcar de maior destaque na Paraíba é a cachaça que apresenta forte representatividade na região do brejo paraibano, onde estão instalados vários engenhos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2019 havia 34 registros de

estabelecimentos produtores de cachaça no estado, respondendo por 145 produtos registrados, ou marcas registradas. Só o município de Areia apresenta sete estabelecimentos produtores registrados. Recebendo destaque também para o número de cachaças registradas, 36 registros, seguida por Campina Grande com 33 registros (BRASIL, 2019).

Considerando a crescente tendência nas exportações de cachaça para diversos países, especialmente destinos mais tradicionais como os europeus, a produção paraibana apresenta forte potencial de participação na economia regional (PAIVA et al, 2017), o que torna imprescindível a aplicação de práticas de padronização e aprimoramento da qualidade sensorial da bebida.

A produção da cachaça é o resultado de dois processos básicos, fermentação e destilação. A fermentação consiste na conversão do açúcar contido no caldo da cana em álcool e dióxido de carbono, um mecanismo biológico realizado por leveduras que são fungos unicelulares com reconhecida atividade fermentativa com aplicação em diversos segmentos, com destaque para linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. A garantia da qualidade de um produto depende da aplicação de técnicas padronizadas na sua produção, tais como a utilização de matéria prima de qualidade e de cepas eficientes no processo.

As produções em grande escala, principalmente quando realizada em grandes destilarias, são utilizadas leveduras comerciais. Leveduras comerciais são cepas selecionadas que apresentam boa eficiência na condução do processo, tolerância às variações físico-químicas ocorridas no curso da fermentação e produção de compostos secundários dentro do estabelecido em lei. Isso permite que se mantenha o perfil de qualidade do produto final de modo mais uniforme, sem grandes diferenças na concentração de congêneres como se observa em fermentação espontânea (BADOTTI et al, 2014).

Cada região apresenta suas peculiaridades ambientais próprias, assim como uma microbiota característica dessa região. Isso implica dizer que as leveduras autóctones podem atribuir características sensoriais distintivas da localidade que a originou (BARBOSA et al, 2018). A reconhecida qualidade das cachaças produzidas no brejo paraibano pode ser resultado da microbiota de leveduras desta região, ainda não explorada cientificamente.

As linhagens comerciais disponíveis no mercado atualmente, em sua maioria são resultado de seleção de leveduras realizadas em engenhos da região sudeste do país. Destaque para as linhagens Pedra-2 (PE-2), Catanduva-1 (CAT-1) e Barra Grande-1 (BG-1), as mais utilizadas no Brasil (MOREIRA et al, 2015). Esta observação alerta para a importância de investigar a diversidade de levedura das diferentes regiões, a fim de selecionar cepas que melhor caracterize a bebida local. Com essa visão buscou-se neste trabalho explorar a microbiota da

cana-de-açúcar na região tipicamente cachaceira do estado da Paraíba, a fim de isolar e selecionar leveduras com enfoque na produção de cachaça.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 A cana de açúcar

Pertencente à família Poaceae a cana-de-açúcar é o nome popular para um conjunto de espécies que compõem o complexo do gênero *Saccharum*, subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae. Trata-se de um grupo vegetal de expressiva importância agrônômica, que juntamente com outros membros da mesma família como sorgo e milho, constituem algumas das culturas mais produtivas do planeta. Sua fisiologia apresentando metabolismo C4, que representa um dos principais mecanismos de concentração de carbono utilizado para compensar baixos níveis de CO₂ atmosférico (TAIZ et al., 2017), pode explicar o sucesso de adaptação em praticamente todos os continentes.

As espécies deste gênero são reconhecidas pelo alto nível de poliploidia e facilidade de hibridação, ou seja, o potencial de intercruzamento entre indivíduos de espécies distintas, fator que contribui fortemente na manutenção de um genoma altamente complexo, típico do grupo (THIRUGNANASAMBANDAM et al., 2018). Quanto à organização do genoma, a cana-de-açúcar é uma planta alopoliplóide apresentando genoma duplicado e híbrido de espécies diferentes, o que resulta em diferenças fenotípicas em relação aos seus progenitores, bem como atribuindo maior vigor e produtividade (TAIZ et al. 2017).

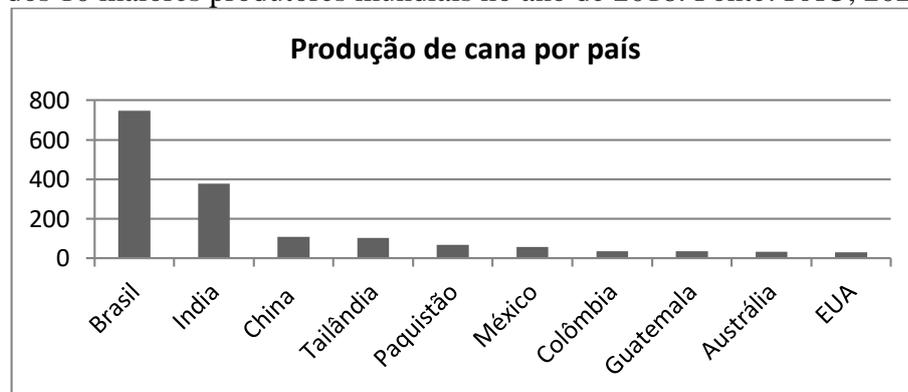
Acredita-se que a domesticação da cana-de-açúcar se deu na Nova Guiné há cerca de 10.000 anos (ARRO et al., 2016). As variáveis cultivadas atualmente são resultado de constante processo de melhoramento, tendo como ancestrais principais as espécies *S. officinarum*, notável pela sua capacidade de armazenamento de açúcar, e a *S. spontaneum*, que contribuiu com vigor e resistência a estresses bióticos e abióticos (XU et al., 2019). Além disso, ainda ocorrem recombinações interespecíficas com outras espécies do gênero, o qual comporta mais quatro espécies incluindo *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustus* e *S. edule*. Tudo isso resulta na composição de um genoma poliploide interespecífico altamente complexo (THIRUGNANASAMBANDAM et al., 2018; XU et al., 2019).

As cultivares mais difundidas atualmente são híbridos que fazem parte do chamado “complexo *Saccharum officinarum*” o qual reúne um grande número de cultivares comerciais além das demais espécies do gênero.

O cultivo de cana-de-açúcar é amplamente disseminado por todo o planeta, com campos de produção em praticamente todos os continentes, contando com representantes do “top 20 maiores produtores” pela Food and Agriculture Organization (FAO) nos quatro continentes. As

regiões de cultivo são preferencialmente os trópicos e subtropicais. Ainda segundo a FAO (2020) dos 20 maiores produtores de cana no mundo 9 são países americanos e 8 são asiáticos. A lista dos 10 maiores produtores mundiais, apresentada na figura 1, é encabeçada pelo Brasil com produção superior a 746 milhões de toneladas em 2018, seguido da Índia com produção total próxima dos 377 milhões de toneladas.

Figura 1. Volume de produção de cana-de-açúcar em milhões de toneladas, dos 10 maiores produtores mundiais no ano de 2018. Fonte: FAO, 2020

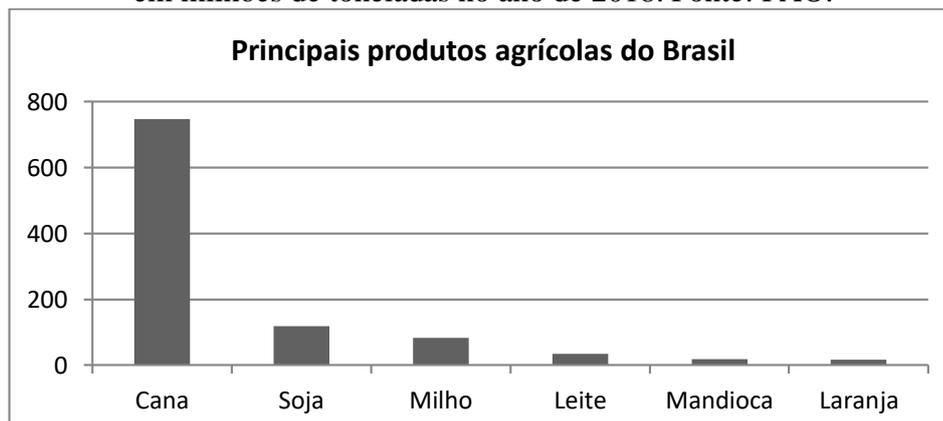


Fonte: FAO, 2020

O volume total de cana-de-açúcar produzida no Brasil se destaca também dentre as principais representantes da força agrícola do país, a frente da soja, milho e café, por exemplo, despontando com folga em relação a outras importantes culturas nacionais como observado na figura 2.

A importância da cana-de-açúcar para o cenário econômico mundial se deve a seus produtos derivados com fins alimentícios, açúcar principalmente, e energéticos sendo importante matéria prima na produção de etanol. O açúcar da cana corresponde a mais de 78% da produção de açúcar consumido no mundo (XU et al., 2019).

Figura 2. Principais produtos agrícolas brasileiros por volume de produção em milhões de toneladas no ano de 2018. Fonte: FAO.



Fonte: FAO, 2018

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a área de cultivo da cana-de-açúcar tem sofrido leve redução nos últimos anos, seja para ceder espaço para outras culturas ou devido a melhorias das técnicas de colheita. No entanto a produção final não tem sofrido tanto com essa redução. A produção nacional estimada para a safra 2019/20 é de 642,7 milhões de toneladas representando um aumento de 3,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

A região Centro-sul é responsável pela maior produção no país com o equivalente a 92% de toda produção, enquanto o Norte/Nordeste contribui com 8% da produção nacional. Dentre os estados do Centro-Sul, São Paulo registra os maiores volumes (340,9 milhões de toneladas) seguido de Goiás (75,8 milhões de toneladas) e Minas Gerais (68 milhões de toneladas). Já entre os estados do Norte/Nordeste os estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba são os três maiores produtores nesta ordem (CONAB, 2019).

Na Paraíba a produção obtida na safra 2018/19 foi de 5.589 milhões de toneladas com previsão de produção de 6.719 milhões de toneladas para a safra 2019/20, um aumento de 20,2% em relação à safra anterior, o que representa 13,4% da produção de cana no Nordeste (CONAB, 2019). Maior parte do que é colhido destina-se ao setor sucroenergético (85%) e o restante, cerca de 15% é utilizado na produção de açúcar. Em menor proporção fica a produção de cachaça que se desenvolve em vários engenhos.

Segundo Coutinho et al., (2016) a produção de cana-de-açúcar na Paraíba apresenta uma forte contribuição para a economia do estado, gerando 50 mil empregos, diretos e indiretos, com uma injeção de 400 milhões de reais na economia local. Os produtores apontam como principais entraves para o aumento da produção, frente à baixa produtividade por hectare no estado, à desregulação do setor e ao custo elevado da cultura, além das conhecidas condições climáticas da região.

2.2 Cachaça, identidade do Brasil

A cachaça é a aguardente mais conhecida popularmente, resultante da fermentação e destilação do caldo natural da cana-de-açúcar produzida no Brasil. Foi descoberta em meados do século XVI pelos escravos que trabalhavam nos engenhos de açúcar naquela época. Ao longo do tempo a cachaça veio tomando cada vez mais espaço no gosto popular e se espalhando para além das fronteiras nacionais, representando assim um produto de identidade cultural para o país.

Esse crescimento e conquista de cada vez mais espaço no gosto de apreciadores de bebidas, alertou para a necessidade de criação de regulamentações técnicas e legislações específicas, a fim de definir os padrões de qualidade da bebida, criando assim a identidade da bebida típica brasileira e garantindo o controle nos níveis de compostos potencialmente nocivos à saúde dos consumidores. A lei 8.918 de 14 de julho de 1994, regulamentada pelo decreto 6.871 de 4 de junho de 2009, é uma das principais ferramentas nesse sentido.

Conforme regulamentação técnica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa Nº 13 de 29 de junho de 2005, aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% a 20°C, podendo ser adicionada de açúcares, enquanto a cachaça, por definição, é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcóolica entre 38% e 48% podendo ter até 6g/l de açúcar (BRASIL, 2005). Diferenças sutis entre as duas denominações, mas que definem as características próprias e asseguram a qualidade desta bebida que é a identidade do país. Nesta IN são também definidos os limites dos compostos secundários e, sobretudo de contaminantes tolerados na bebida.

Em nível de consumo a cachaça já é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo. No Brasil ocupa a liderança entre os destilados representando 87% do consumo nesta categoria, ocupando ainda a segunda posição entre as bebidas alcoólicas de modo geral, ficando atrás apenas da cerveja (BARBOSA, 2016).

Cunha e Matos (2017) apontam ainda um uso alternativo para a cachaça como potencial solvente em experimentos de química orgânica, onde se mostrou viável na síntese de dibenzalacetona e benzalacetofenona, bem como na extração de pigmentos das sementes de urucum, atendendo aos princípios da química verde.

Analisando o volume de exportação da cachaça entre os anos de 1997 e 2015, observa-se um aumento gradual no valor arrecadado, passando de \$6,73 a \$13,37 milhões de Dólares neste intervalo. Contudo não houve o mesmo aumento em volume físico da bebida comercializado. Dentre os estados brasileiros, São Paulo, Pernambuco, Paraná e Rio de Janeiro, nesta ordem, são os maiores exportadores de cachaça, em volume bruto, segundo dados de Paiva *et al.* (2017). Salientando que essa informação considera, sobretudo, a cachaça de coluna, produzida em escala industrial.

Os estabelecimentos produtores de cachaça no país se concentram em grande maioria no estado de Minas Gerais com 421 estabelecimentos registrados, seguido de São Paulo com 126 pontos de produção. Os quatro estados do sudeste contam com os maiores números de estabelecimentos registrados. Logo em seguida está o Rio Grande do Sul, quinto colocado, com

49 estabelecimentos registrados e a Paraíba assumindo a sexta posição neste ranking, e conquistando destaque na região nordeste (BRASIL, 2019).

A Paraíba também se destaca como o estado nordestino com o maior número de marcas de cachaça registrada, ocupando a sexta colocação no país nesse quesito. Esses dados ganham maior importância levando em consideração o tipo de produção realizado nesse estado, consistindo em grande parte no modelo artesanal, em alambiques. Modelo que eleva a qualidade sensorial do produto.

2.3 Produção da cachaça

A elaboração da cachaça envolve uma série de etapas desde a moagem da cana até a obtenção do produto final bruto ou envelhecido em barris apropriados.

Tudo inicia com a colheita da cana-de-açúcar, matéria prima para a cachaça. Para muitos, no entanto, a escolha de variedades com bons perfis de qualidade ainda no plantio representa o início de fato da cadeia de fatores que contribuem para a qualidade final do produto. Realizada a colheita o material é transportado para o engenho onde ocorre a prensagem da cana e obtém-se o caldo.

O caldo de cana bruto pode apresentar teor de açúcar de até 25 °Brix, escala que mede o teor de sólidos solúveis em soluções, considerada para o caldo de cana como o percentual de açúcar contido no caldo. Esta proporção varia muito conforme a variedade da cana utilizada e, sobretudo, conforme seu estágio de maturação. Canas mais maduras apresentam grau Brix mais altos enquanto canas menos maduras apresentam menos teor de açúcares. Existe ainda variação na composição de açúcar numa mesma planta em diferentes posições do caule, sendo maior no sentido da base ao ápice.

Uma vez obtido o caldo a partir da moagem da cana, faz-se necessário ajustar seu brix para 14 a 16, valor no qual a fermentação na dorna tem prosseguimento. Esse ajuste é feito pela adição de água potável ao caldo até atingir o valor desejado. O ajuste do grau Brix do caldo é importante para evitar o choque osmótico nas células fermentadoras o que comprometeria o curso da fermentação e a qualidade do produto final. Normalmente são realizados também ajustes no pH visando um ambiente ligeiramente ácido o que garante um meio mais propício para o metabolismo das leveduras e, por outro lado, inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejados no processo.

Bonassa et al., (2015) destaca alguns fatores que podem influenciar na eficiência cinética do processo de fermentação, com destaque para o pH e o Brix que apresentaram efeito

significativo no tempo total da fermentação, de forma diretamente proporcional. Quanto à relação entre as concentrações de substrato e produto, apenas o brix, ou seja, o nível de açúcares, representa importância significativa.

A adição de suplementos nutricionais, como fontes de nitrogênio no mosto deve ser evitada, pois podem influenciar na composição dos congêneres do produto final e, conseqüentemente, a qualidade da bebida (PEREIRA et al., 2015). Há relatos de que a suplementação de ureia no caldo antes da fermentação tem relação direta com a alta concentração de carbamato de etila no produto final (BORTOLETTO et al., 2015).

O caldo com todos os ajustes pertinentes é então conduzido para as dornas (biorreatores onde a fermentação ocorre) nas quais já se encontra o “pé de cuba”. O pé de cuba nada mais é que o fermento ativado responsável pela fermentação dos açúcares do caldo, correspondendo, normalmente, a 20% do volume total da dorna. Em alambique o caldo é adicionado ao pé de cuba de forma gradativa até atingir o volume máximo, não adicionado todo o volume de uma só vez para que não ocorra perda das leveduras por choque osmótico e, conseqüentemente, redução na eficiência do processo. O mosto, modo como se denomina a mistura do caldo com o pé de cuba, chegando ao volume máximo da dorna acompanha-se o andamento da fermentação através da medição do Brix ao longo do processo até atingir grau 0 (zero), o que indica que todo o açúcar contido no mosto já foi consumido pelas leveduras.

A fermentação em âmbito industrial pode ser classificada em contínua e descontínua (batelada) que por sua vez pode variar em batelada simples e alimentada. No processo contínuo, as dornas são alimentadas constantemente com mosto fresco, ocorre então a fermentação e o mosto é retirado na mesma vazão que entra na dorna. Nesse modelo as dornas são dispostas em série permitindo o fluxo contínuo em cascata. Segundo Amorim et al. (2013) o processo contínuo é utilizado em 15% das unidades industriais, as quais contam com mais estrutura e maior fluxo de produção.

De forma similar, no processo de batelada alimentada o caldo da cana e as leveduras são introduzidos na dorna simultaneamente, de forma controlada. Este método é considerado mais produtivo visto que é possível controlar a vazão de entrada do substrato na dorna, modelando a produção gerada no processo. Estima-se que esse mecanismo seja empregado por 85% das destilarias brasileiras (AMORIM et al., 2013).

Por sua vez, no processo de batelada simples as dornas são preenchidas com o mosto e só então é adicionado o fermento. Depois de ocorrida a fermentação o conteúdo é direcionado para a destilação e procede-se a assepsia da dorna para início de novo ciclo. Essa é a modalidade utilizada em pequenas destilarias na produção artesanal de aguardentes.

Finalizada a fermentação de todo o açúcar do mosto, o vinho fermentado é canalizado para o alambique onde ocorre a destilação. Fabricado normalmente em cobre, o alambique funciona basicamente como uma grande panela de pressão onde o vinho é aquecido para evaporação e conseqüente separação dos componentes de acordo com seus diferentes pontos de ebulição. Iniciando o sistema temos uma caldeira, no topo da qual esta acoplado um de tubo de cobre que conduz o vapor gerado pelo aquecimento do líquido através de uma serpentina, a qual passa por um condensador, um recipiente com água que resfria o vapor contido no interior do tubo e no final obtemos a aguardente de primeira geração ou aguardente mono destilada, a cachaça.

Do volume total de um alambique apenas um pequeno percentual é considerada como cachaça ao final da destilação. Durante o processo são separadas três frações denominadas “cabeça”, “coração” e “cauda”. A cabeça corresponde a 1-2% do volume útil da caldeira, apresentando alto teor alcoólico e grande concentração de compostos voláteis indesejados que interferem na qualidade sensorial da bebida e, portanto é descartada. A fração destilada na sequência, até que se atinja um teor de 38% a 40% de teor alcoólico na saída do condensador corresponde ao coração que é a fração desejada. A porção restante até a ausência de etanol na saída do condensador corresponde à cauda, e assim como ocorre na cabeça também é descartada por apresentar substâncias indesejadas (ALCARDE, 2017).

2.4 Composição química e perfil de qualidade da cachaça

A cachaça é composta basicamente de água e etanol. Em menor proporção estão presentes outras substâncias como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores que são responsáveis pelo sabor e aroma que conferem as características sensoriais particulares de cada produto. Para que a bebida seja devidamente registrada e comercializada, esses compostos secundários (congêneres) bem como eventuais contaminantes orgânicos e inorgânicos, devem obedecer aos limites máximos estabelecidos em regulamentação própria, que garantem o padrão de identidade e qualidade da bebida. (Tabela 1).

Tabela 1: Valores máximos permitidos de congêneres e contaminantes orgânicos e inorgânicos na cachaça determinados pela instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) com alterações. ¹ Valores por 100 ml de álcool anidro.

Congêneres		Contaminantes	
	Máximo	Orgânicos	Máximo
Acidez volátil	150 mg ¹	Álcool metílico	20 mg ¹
Ésteres totais	200 mg ¹	Carbamato de etila	210 µg/l
Aldeídos	30 mg ¹	Acroleína	5 mg ¹
Furfural e hidroximetilfurfural	5 mg ¹	Álcool sec-butílico	100 mg ¹
Soma dos álcoois superiores	360 mg ¹	Inorgânicos	
		Cobre	5 ml/l
		Chumbo	200µg/l
		Arsênio	100 µg/l

A qualidade sensorial determinada por fatores como aparência, aroma, gosto e acidez, são garantidos pela constituição de congêneres na bebida. Os ésteres conferem sabor adocicado e aroma de frutas e flores, enquanto álcoois superiores resulta em aroma e sabor de coco e mel além de notas de rosa. Por outro lado, a presença de aldeídos na bebida é responsável pela ressaca gerada por seu consumo (AMORIM et al., 2016). Teor de aldeídos e acidez são fatores que depreciam a qualidade sensorial da bebida, enquanto ésteres e álcool aumentam o valor sensorial, desde que de modo equilibrado.

A contaminação bacteriana do caldo durante a fermentação é muitas vezes responsável pelos altos teores de aldeído e ácido acético, cobre e carbamato de etila (CE), que depreciam a qualidade do produto (BORTOLETTO et al., 2015). O CE tem efeito carcinogênico e seu consumo representa riscos à saúde. Por regulamentação, a concentração máxima, que de início era de 150 µg/l, foi alterada para 210 µg/l pela IN nº 28, de 8 de agosto de 2014 (BRASIL, 2014).

Conforme estudo de Bortoletto e Alcarde (2016) investigando a concentração de CE em diversas cachaças disponíveis no mercado, foi observado que 24% das bebidas analisadas não estavam em conformidade com a lei neste ponto, sendo os maiores valores registrados nos produtos elaborados em grandes destilarias com sistema de coluna contínua (média de 200µg/l), enquanto as cachaças de alambiques apresentaram maior efetividade no controle desse composto, com média de 74µg/l. D'Ávila et al., (2016) também encontraram resultado similar com cachaças produzidas em alambiques de Minas gerais, quando todas as amostras estudadas apresentaram níveis de CE bem abaixo do limite estabelecido.

As variações na composição de compostos secundários tem ligação direta com a linhagem da levedura responsável pelo processo fermentativo. Isso reflete a importância de utilizar leveduras selecionadas possibilitando padronização na produção. Conforme observado por Badotti et al. (2014), cachaças produzidas com fermentação espontânea apresentaram grande variação nos compostos constituintes, enquanto em produções com cepas selecionadas apresentaram uniformidade na sua composição.

Além dos congêneres formados durante a fermentação, uma possibilidade de refinar a qualidade da bebida é por meio do seu envelhecimento, de preferência em barris de madeira. Tradicionalmente o envelhecimento em barris de carvalho ganhou mais destaque, mas no caso da cachaça a busca por madeiras nativas tem sido uma alternativa para agregar compostos da flora local, bem como uma forma de cortar custos com importação do carvalho. A permanência da bebida em contato com a madeira permite a formação de novos compostos químicos que agregam valor à qualidade sensorial.

Sabe-se ainda que barris de carvalho de diferentes origens podem apresentar diferenças nos compostos resultantes, ditos marcadores de envelhecimento, como ácido serérico, ácido vanílico, furfural, dentre outros. A intensidade da tosta da madeira na confecção do barril também apresenta influência significativa na cor, nos compostos fenólicos totais e na maturação dos congêneres em geral, com exceção do ácido gálico, sendo o período ideal de envelhecimento entre 15 e 20 meses (BORTOLETTO e ALCARDE, 2015; BORTOLETTO et al., 2016).

2.5 Leveduras: usinas biotecnológicas

Leveduras são fungos unicelulares amplamente disseminados no ambiente, atualmente agrupados no sub-reino Dikaria, com representantes ocupando os dois filos que o compõem: Ascomycota e Basidiomycota (KURTZMAN et al, 2011). O termo “levedura” está relacionado ao modo de vida e morfologia do organismo, não representa uma classificação taxonômica, ou seja, é um grupo artificial. Ascomycota e Basidiomycota são os filos mais amplamente estudados do reino, comportando mais de 95% das espécies de fungos descritas. Ambos podem apresentar a formação de hifas regularmente septadas e diferem entre si pelo tipo de estrutura reprodutiva que desenvolvem, ou seja, ascos no caso dos ascomicetos e basídio no caso dos basidiomicetos (SANTOS, 2019).

Considerando a biologia desse grupo com características metabólicas similares ao grupo dos animais, a *Saccharomyces cerevisiae*, membro dos Ascomicetos, tem sido estudada há anos

como um organismo modelo dos eucariotos, sendo o primeiro organismo desse domínio a ter seu genoma inteiramente sequenciado (MADIGAN et al., 2010). Este grande marco informacional revolucionou os conhecimentos em genômica, proporcionando o entendimento de diversos processos fisiológicos e correlatos do metabolismo humano, por exemplo, baseados em sua biologia molecular (SANTOS, 2019).

A maior contribuição das leveduras para a humanidade talvez seja sua participação como ferramenta biotecnológica. Há milênios a fermentação vem se estabelecendo como o processo mais primário das leveduras, respondendo pela produção de diversos gêneros alimentícios tais como pães, queijos, vinhos, cervejas, bebidas destiladas, dentre outros. Além disso, vários outros ramos se desdobram em outros setores socioeconômicos como a produção de insumos farmacêuticos, de proteínas heterólogas, controle biológico e nutrição agrícola, bem como na biorremediação ambiental (KURTZMAN et al., 2011).

As técnicas de engenharia genética amplia ainda mais o leque de possibilidades nesse campo promissor. Aliando os conhecimentos em genômica de rotas metabólicas, somado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas de engenharia molecular é possível programar leveduras para gerar produtos desejados. O rápido desenvolvimento de microrganismos torna a prática viável, sendo a *S. cerevisiae* a melhor escolha, em detrimento de procariotos, por ser mais robusta industrialmente, ser menos susceptível e por expressar citocromo P450, enzima envolvida na síntese de muitos derivados vegetais. Compostos como Acetil-CoA, isoprenóides e aminoácidos aromáticos são exemplos dessa tecnologia (KRIVORUCHKO e NIELSEN, 2015).

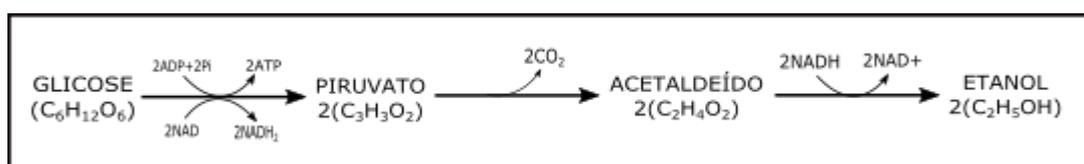
Seguindo o esquema de um sistema biotecnológico industrial temos como peça central o reator, onde são introduzidos os agentes de transformação juntamente com o meio a ser processado, após o processamento obtém-se o produto final. Nesse caso quando os agentes de transformação são microrganismo o processo é denominado “processo fermentativo” e o reator é a conhecida “dorna”. Em outros termos, fermentação é um termo genérico que denomina a atividade de microrganismos sobre determinado substrato objetivando a obtenção de produtos resultantes do metabolismo desse organismo.

De forma mais direta, a produção de leveduras ainda pode atuar como um recurso alimentício *per se* como alimento ou suplemento alimentar, como observou Bertolo et al. (2019) em estudo sobre o potencial nutricional de *S. cerevisiae*. Mostrando assim que estas leveduras podem ser consideradas excelentes fontes de proteínas com potencial destinação alimentar.

2.6 Leveduras fermentadoras

Do ponto de vista bioquímico a fermentação alcoólica é o processo anaeróbico no qual a glicose é convertida a álcool e dióxido de carbono (figura 3), um mecanismo metabólico de obtenção de energia alternativo a respiração. Na fermentação o piruvato (ácido pirúvico) formado no final da glicólise é convertido em acetaldeído pela piruvato descarboxilase com consequente liberação de dióxido de carbono na reação. O acetaldeído então é convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase.

Figura 3. Esquema geral da fermentação alcoólica.



Para cada mol de glicose que inicia a reação são formados dois mols de etanol e dois mols de dióxido de carbono. Durante o curso da fermentação pode ocorrer interferência de bactérias acéticas que convertem o etanol em ácido acético ($C_2H_4O_2$), reduzindo o rendimento alcoólico e aumentando a acidez total que, em se tratando da produção de bebidas, resulta na depreciação do produto.

Leveduras são verdadeiras usinas fermentativas vivas. Elas são capazes de realizar fermentação alcoólica, um processo conhecidamente anaeróbico, mesmo na presença de oxigênio. Fenômeno conhecido como “efeito Crabtree”. Segundo Kayikci e Nielsen (2015) a presença de glicose no ambiente de desenvolvimento da levedura inativa a proteína quinase Snf1, que por sua vez medeia a supressão transcricional de vários genes ligados ao balanço energético celular como a gliconeogênese, a respiração e a utilização de açúcares não fermentáveis.

Na produção de bebidas, tanto fermentadas quanto destiladas, a fermentação corresponde ao mecanismo central do processo. Como responsáveis por esse mecanismo, dentre as várias espécies de levedura fermentadoras, as espécies do gênero *Saccharomyces* são as mais comumente relatadas. De modo mais particular a espécie *S. cerevisiae* possui um papel de referência na elaboração dos vários tipos de bebidas alcoólicas (KURTZMAN et al., 2011). Na prática quando pensamos em levedura para obter etanol, falamos em *S. cerevisiae*.

O mecanismo da fermentação na elaboração de bebidas é algo antigo, e ao longo dos anos ganhou ajustes e melhorias no processo. No Brasil o surgimento da bebida como um

subproduto da cana, ocorreu de forma paralela a implantação dos primeiros engenhos pelos portugueses, a partir de 1532 (ALCARDE, 2017). A fermentação espontânea da garapa seguida da destilação do fermentado deu origem a “aguardente de cana”. Nome este atribuído devido a aparência com água e a sensação de ardência após o consumo. O aprimoramento da produção buscando a padronização na qualidade e a elaboração de regulamentação própria criou o perfil de identidade da cachaça.

O fenômeno de fermentação espontânea é comum em qualquer líquido açucarado, o que ocorre naturalmente devido à presença de leveduras em praticamente todos os ambientes. A *S. cerevisiae* foi o primeiro microrganismo relacionado com fermentação alcoólica de frutas, o que foi atribuído como nicho ecológico do grupo. A descoberta do efeito Crabtree no mesmo período geológico da disseminação das plantas frutíferas suporta esta teoria, ainda que a ideia de um nicho específico para a espécie não seja bem definida, visto que há poucas evidências que a apoiem. Por outro lado a análise genômica de *S. cerevisiae* aponta um comportamento generalista, tendendo a um nicho nômade ou neutro (GODDARD e GREIG, 2015).

Segundo Araújo et al. (2018) as dornas de fermentação de cachaça representa um nicho com alta diversidade ecológica para seleção de leveduras, dotadas de propriedades específicas importantes no âmbito industrial, e que podem ser positivamente aplicadas também nos processos fermentativos da produção de cerveja e de bioetanol. Essa variedade de destinos que as leveduras da cachaça podem alcançar tem relação com sua conformação genômica, de característica polifilética. A origem relativamente recente da cachaça, em detrimento de outros tipos de fermentados como vinho e cerveja, com histórico consideravelmente mais antigo, ainda não permitiu a conformação de uma população típica de leveduras deste campo. A propósito, de acordo com análises filogenéticas, leveduras da cachaça são derivadas de leveduras do vinho, ditas de domesticação primária (BARBOSA et al., 2018).

2.7 Leveduras na produção da cachaça

A produção de cachaça em alambiques, em pequena escala, teve sua origem a partir da fermentação espontânea, na qual se observa uma grande flutuação de populações de leveduras, que sofrem influências edafoclimáticas e de ação do operador, e nem sempre ocorre dominância da *S. cerevisiae*. Neste processo várias espécies contribuem com algum componente diferente que define o perfil sensorial final (PORTUGAL et al., 2016).

Ao longo do tempo a necessidade de obter produtos que mantivessem sempre os mesmos níveis de componentes secundários, seguindo um padrão produtivo, induziu a busca

por linhagens próprias de fermento para conduzir o processo. A composição de congêneres na bebida é resultado da atividade metabólica da levedura responsável pela fermentação. Isso pode variar de safra a safra, de um engenho para outro ou entre diferentes regiões.

Uma forma de minimizar essa variação é através da manutenção de cepas selecionadas a disposição. De acordo com Badotti et al. (2014) cepas selecionadas apresentam maior dominância e persistência ao longo do processo, em detrimento de microrganismos contaminantes. Além de apresentar uniformidade nos níveis de componentes.

Gonçalves et al. (2016) observou que a fermentação conduzida por levedura selecionada resultou em uma cachaça com acidez volátil significativamente inferior em comparação com a fermentação espontânea. Além de apresentar níveis de 1-propanol, 1-butanol e 2-butanol abaixo do limite de detecção.

A interação de microrganismos visando a obtenção de um produto com características pré-definidas pode ser uma estratégia promissora. Um estudo realizado por Carvalho et al. (2015) associando *Lactococcus lactis* e *S. cerevisiae* na fermentação apresentou acidez volátil mais alta em comparação com a levedura pura, contudo ainda dentro do limite estabelecido na regulamentação. Porém a avaliação sensorial apresentou alto valor para aroma, uma característica que valoriza o produto. No referido estudo a atividade da bactéria não causou interferências na atividade metabólica da levedura. A *L. lactis* é uma bactéria Gram-positiva empregada na indústria de laticínios, sendo o primeiro organismo geneticamente modificado usado vivo no tratamento de uma doença humana.

A associação de microrganismo na condução do processo fermentativo pode ser vantajosa em alguns aspectos. Como visto, bactérias nem sempre estão relacionadas com impacto negativo no processo. De acordo com Reis (2016) o efeito da contaminação sobre a eficiência fermentativa, ou seja, a conversão de açúcar em etanol é mais pronunciável quando se fala em leveduras contaminantes em relação a contaminantes bacterianos, o que ocorre em razão da área superficial de leveduras que força uma competição por nutrientes de forma mais sensível.

Quando se trabalha com leveduras selecionadas o tratamento físico-químico prévio do caldo reduz o nível de impurezas e, sobretudo de organismo contaminantes, garantindo melhores condições para desenvolvimento das leveduras (RIBEIRO et al., 2017). O tratamento térmico por si só já demonstrou benefícios na redução de contaminantes microbianos como bactérias lácteas, leveduras totais e também não-*Saccharomyces*, favorecendo o desenvolvimento de maiores concentrações das leveduras adequadas a fermentação alcoólica,

sem ocorrer influências significativas na composição química no produto final (BORTOLETTO et al., 2015; ALVES et al., 2018).

Embora a *S. cerevisiae* seja a principal responsável pela fermentação das diversas bebidas alcoólicas existentes, não são as únicas. Leveduras não-*Saccharomyces* com características típicas de *Saccharomyces* podem contribuir de forma positiva durante a fermentação (ALVARES-AINZA et al., 2016). Há relatos de *Candida milleri*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia caribbica*, *Pichia fermentans*, *Zygosaccharomyces florentinus* durante fermentação espontânea da cachaça. A participação de outras espécies pode contribuir na diversidade de congêneres da bebida (VARELA, 2016).

A associação de cepas de *S. cerevisiae* e *Meyerozyma caribbica* na produção de cachaça resultou em ganho na qualidade do produto pelo aumento dos teores de ésteres e de álcoois superiores, que conferem os atributos sensoriais de destaque na bebida, além de reduzir o conteúdo de aldeídos e de ácido acético (AMORIM et al., 2016).

Conforme Petruzzi et al. (2017) a busca por leveduras não-*Saccharomyces* na vinificação é uma realidade crescente, que busca contribuir com diferenciais na qualidade sensorial de vinhos, o que tende a ser válido também na produção de cachaça.

Apesar da possibilidade de participação de outras espécies de levedura na produção da bebida, a superioridade da *S. cerevisiae* na condução do processo é reconhecida. Wang et al. (2016) comparando a efetividade de cultivo associando *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* observaram que estas reduzem sua representatividade ao longo do tempo, mesmo apresentando nível de crescimento populacional similar no primeiro momento. Essa capacidade de sobreposição da *S. cerevisiae* deve-se à produção de composto que interferem na atividade de outras leveduras no meio.

De todo modo, a qualidade final da bebida, apesar das diversas variáveis que possam interferir, passam pela seleção de cepas de leveduras que melhor se enquadrem no perfil de cada produtor. De forma simplificada, é desejável que se obtenha leveduras com ótimo perfil de eficiência na conversão de açúcares a etanol e que produzam compostos secundários que valorizem a bebida (WALKER e STEWART, 2016).

Segundo Portugal et al., (2017) cada cachaça apresenta íntima relação com o ambiente onde ela é produzida, agrupando princípios das práticas tradicionais e a herança regional, sendo a microbiota local um fator crucial na obtenção de um perfil químico distintivo dessa expressão regional.

Levando em consideração a marcante variabilidade genética dessas leveduras é possível correlacionar com suas atribuições e peculiaridades fisiológicas diferentes para cada local de

origem, conforme pontuado por Barbosa et al., (2018) sobre a importância de seleção de leveduras fermentadoras da cachaça, que acabam atuando como marcador natural de identidade biogeográfica de cada localidade de origem. As análises físico-químicas confirmam a importância da seleção proporcionando qualidade à bebida.

Conceição et al. (2015) trabalhando com isolamento de *S. cerevisiae* afirmaram que as leveduras isoladas em destilarias de cachaça são mais robustas, apresentando plasticidade fenotípica que as tornam propícias para a aplicação biotecnológicas, com bom aproveitamento na produção de etanol de primeira geração, de forma similar as cepas comerciais.

Mendes et al. (2017) observaram que cepas selecionadas da fermentação da cachaça, saquê e vinho, produzem maiores quantidades de compostos secundários favoráveis as qualidades sensoriais, como ésteres totais e álcoois superiores, em comparação com cepas de laboratório.

3 HIPÓTESE

Investigando a diversidade de levedura nativa na localidade objeto de estudo, é possível isolar e selecionar ao menos uma linhagem de levedura com propriedades fermentativas superiores visando à produção de uma cachaça com perfil elevado de qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para seleção das melhores leveduras do processo fermentativo foram realizados ensaios visando reconhecer aquelas com características desejadas, tais como capacidade de fermentação, observada pela fermentação de glicose, ausência de produção de sulfeto de hidrogênio, tolerância a altas concentrações de etanol e crescimento a 37 °C. O perfil fisiológico desejado foi filtrado através dos meios de cultura que variam conforme o teste aplicado. Os meios de cultivo utilizados neste trabalho estão apresentados na seção a seguir.

O ensaio de tolerância a alto teor de açúcar, comum nos trabalhos com seleção de leveduras fermentadoras, não foi realizado no presente trabalho visto que o isolamento das cepas na etapa inicial da pesquisa foi realizado em meio de cultura com alta proporção de glicose e, com isso, presume-se que todas as colônias desenvolvidas na etapa de isolamento sejam tolerantes quanto a este critério.

4.1 Meios de cultivo

Meio Agar YPG (isolamento, manutenção e tolerância a etanol)

Composição:

- Ágar1%
- Peptona.....0,3%
- Extrato de levedura0,3%
- Glicose2%
- Água destilada

O meio Ágar YPG foi utilizado na maioria dos procedimentos variando apenas a concentração de açúcar na fase de isolamento das leveduras (glicose a 30%) e a adição de álcool nas proporções desejadas no teste de tolerância a etanol.

Meio YPG líquido (teste de fermentação)

Composição:

- Peptona0,75%
- Extrato de levedura0,75%
- Glicose2%

- Água destilada

Meio Ágar LA (teste de produção de sulfeto)

Composição:

- Glicose4%
- Extrato de levedura0,5%
- Peptona0,3%
- Sulfato de amônio0,02%
- Acetato de chumbo neutro0,1%
- Ágar2%
- Água destilada

Em todos os meios trabalhados foram realizados ajustes do pH visando obter sempre um nível próximo de “4”, visto que o desenvolvimento de leveduras ocorre mais satisfatoriamente em meio ácido. Para isso fez-se uso de ácido cítrico diluído a uma concentração de 10% em água destilada.

Todos os meios de cultivo foram esterilizados após formulação em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos. As vidrarias utilizadas na condução do experimento, béqueres, placas de Petri, tubos, pipetas e provetas também foram esterilizadas nas mesmas condições.

4.2 Isolamento das leveduras

A cana para extração do caldo foi coletada diretamente do campo de uma área de plantio dentro do *Campus* II da UEPB localizado no município de Lagoa Seca – PB. As plantas foram cortadas e levadas para moagem logo em seguida na moenda do Complexo Agroindustrial da UEPB. O caldo obtido foi mantido em frascos de vidro a temperatura ambiente no laboratório de Microbiologia de alimentos (UEPB) por 24h, em sua conformação natural sem qualquer adição ou correção, visando assim obter o máximo de diversidade de leveduras nativas desde a cana ainda no campo.

Passadas as 24h de desenvolvimento após a prensagem da cana, e já em pleno processo de fermentação nos frascos, foi realizado o procedimento de isolamento das leveduras. Do caldo mantido no frasco de vidro foi coletada uma amostra de 1 ml com o auxílio de uma pipeta graduada e diluída em 1000 ml de água destilada contida em um béquer, previamente

esterilizados, obtendo uma concentração de 1:1000 (10^{-3}). Após homogeneização foi coletada uma alíquota de 100 μ l da solução e inoculada em uma placa de Petri contendo meio Ágar YPG (glicose a 30%) e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. Os inóculos foram realizados na câmara de fluxo, sendo preparadas as placas em triplicatas com um grupo controle que consistiu na inoculação de água destilada nas mesmas condições do experimento teste, a fim de se mensurar a ausência de contaminação durante os procedimentos de inoculação. No total foram montadas 16 placas, sendo 12 placas com a solução para isolamento e 4 placas controle, que foram incubados em estufa microbiológica a 28 °C por 48h. Os procedimentos de diluição, inoculação e incubação ocorreram no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UEPB.

O controle bacteriano foi realizado sem uso de antibióticos tradicionais, ficando essa função a cargo da alta concentração de açúcar no meio de cultura da etapa de isolamento (meio Ágar YPG a 30% de glicose) conforme apresentado por Kutzman et al. (2011). O alto teor de glicose além de inibir o desenvolvimento de bactérias também permitiu o isolamento de linhagens de leveduras tolerantes a altas concentrações de açúcar, já funcionando como um meio seletivo aos propósitos do trabalho.

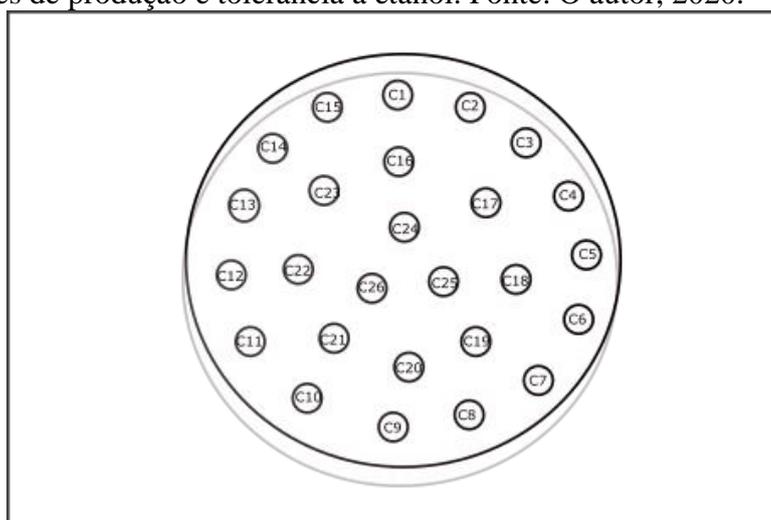
Transcorrido o período de incubação as colônias com morfologia típica de leveduras e que se desenvolveram de forma isolada no meio foram coletadas. Para cada isolado foi procedida a transferência utilizando uma alça microbiológica esterilizada com álcool a 70% e flambada na chama da lamparina. Foi coletada uma porção da colônia isolada e transferida para um tubo de ensaio contendo meio Ágar YPG (glicose a 2%) inclinado com tampa rosqueável. A transferência para os tubos foi realizada em réplica para cada isolado, mantendo assim uma reserva de segurança e uma amostra para repiques a serem usados nas etapas posteriores. Os tubos foram mantidos em estufa microbiológica a 28 °C durante a condução dos testes.

4.3 Teste de Produção de Sulfeto de hidrogênio (H₂S)

As leveduras mantidas no meio sólido inclinado nos tubos de ensaio foram, no primeiro momento, inoculadas em meio líquido YPG (glicose a 2%). Com uma alça microbiológica foi coletada uma porção da colônia e lavada a ponta da alça em um tubinho contendo o meio líquido. Os inóculos em meio líquido foram incubados durante 24 horas a 28 °C em estufa microbiológica. Após o período de desenvolvimento no meio líquido, as cepas foram inoculadas em placas contendo meio Agar LA. Neste teste as placas foram preparadas seguindo um esquema de poços no meio solidificado, que consiste basicamente na perfuração dos pontos

de inoculação com a boca de uma ponteira de pipeta estéril, seguida da identificação de cada poço com o isolado correspondente a ser testado (Figura 4). Com uma micropipeta foi coletada uma alíquota de 10µl do meio líquido contendo as leveduras sendo então inoculada nos respectivos poços. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C, com leituras realizadas com 7 e 11 dias após a inoculação. O experimento foi realizado em triplicata tendo como controle placas contendo meio Ágar YPG (glicose a 2%) montadas seguindo os mesmos moldes das placas teste.

Figura 4: Esquema do sistema de poços realizado no meio solidificado, aplicado nos testes de produção e tolerância a etanol. Fonte: O autor, 2020.



O meio Ágar LA possui componentes em sua formulação que evidenciam as cepas produtoras de H₂S por apresentarem coloração enegrecida na colônia durante seu desenvolvimento. Com isso ficam facilmente distinguíveis as cepas produtoras das não produtoras quando comparamos aquelas crescidas em meio Ágar LA das cepas crescidas no meio de crescimento básico (no nosso caso o meio Ágar YPG).

As cepas que aqui apresentaram a pigmentação enegrecida divergente do grupo controle foram consideradas como produtoras de H₂S e, conseqüentemente, foram eliminadas nesta etapa da seleção. A produção desse composto por leveduras fermentadoras é um aspecto negativo por agregar características que depreciam o produto final. As leveduras selecionadas nesta fase foram submetidas ao teste de fermentação.

4.4 Teste de fermentação

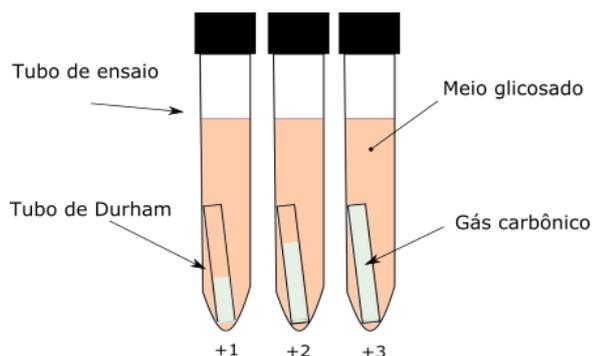
O teste de fermentação, apesar de ser o teste elementar para os objetivos propostos, foi realizado em segundo passo, visto que em ensaios prévios, o teste de detecção da produção de

sulfeto apresentou maior eliminação de isolados indesejados. Ressaltando ainda que aquele teste possui estreita relação com a qualidade sensorial do produto final. Desse modo apenas as leveduras que não apresentaram produção de H_2S foram submetidas ao teste de fermentação.

Em tubos de ensaio com tampa de rosca foi colocado 10 ml de meio líquido YPG (glicose a 2%) com pH ajustado para 4,5 e introduzido um tubo de Durham invertido cuidando para que o tubo de Durham ficasse completamente preenchido pelo meio, sem bolhas de ar. Os tubos foram esterilizados conforme procedimento padrão e após resfriamento foi realizada a inoculação das leveduras nos tubos de ensaio. Com uma alça microbiológica esterilizada foi coletada uma porção da colônia preservada no tudo com meio inclinado e transferida para o tubo com meio líquido teste. Para cada cepa analisada foram preparados dois tubos os quais foram então mantidos em estufa microbiológica a 28 °C durante a condução do experimento.

O andamento da fermentação foi mensurado pela produção gradual de gás nos tubos, atribuindo os valores +1, +2 e +3 conforme a proporção de gás acumulado nos tubos de Durham. Esses valores são atribuídos visualmente, sendo +1 quando o volume de gás corresponde a 1/3 do tubo, +2 correspondendo a 2/3 e +3 quando o tubo estava completamente cheio (figura 5).

Figura 5: Esquema de leitura para o teste de fermentação. Fonte: O autor, 2020.



As leituras foram realizadas diariamente durante 4 dias (até 96 horas após a inoculação) quando todos os isolados que apresentaram fermentação atingiram o preenchimento máximo dos tubos de Durham. As cepas que não fermentaram neste período foram eliminadas da seleção e as que fermentaram em maior ou menor grau, foram submetidas aos outros testes propostos.

4.5 Teste de tolerância a etanol

O ensaio para testar a tolerância a níveis diferentes de etanol foi conduzido com as cepas que obtiveram melhor resultado no teste de fermentação. O procedimento utilizado neste teste

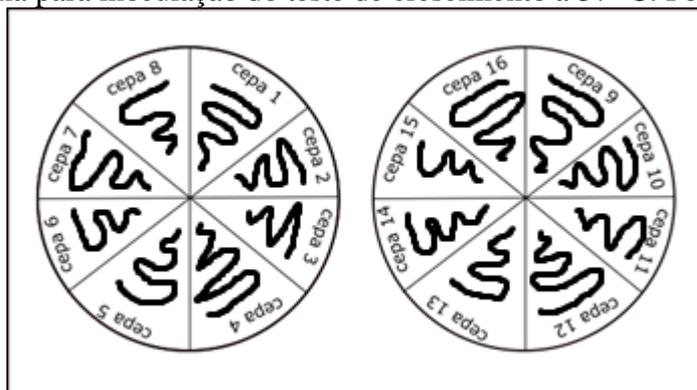
seguiu o mesmo esquema do teste para produção de H₂S. O inóculo foi preparado 24 horas antes em meio líquido YPG 2%. Meio de cultura usado como teste nesta etapa foi o Ágar YPG 2% com adição de etanol após autoclavagem, um momento antes de verter nas placas de Petri. O volume de etanol adicionado foi considerado de modo a perfazer as concentrações no meio de 10%, 14% e 18%. As placas foram montadas em triplicata seguindo o esquema de poços apresentado anteriormente. Como controle foram montadas placas com o meio Ágar YPG 2% simples.

Partindo dos tubos em desenvolvimento com o meio líquido foi coletada uma alíquota de 10µl com micropipeta e inoculada no pocinho feito na placa. As placas foram incubadas em estufa microbiológica por 48 horas a 30 °C. O desenvolvimento das colônias foi observado após o período de incubação e interpretado tendo o grupo controle como referência. As cepas que apresentaram desenvolvimento igual ou aproximado ao observado no controle foram consideradas tolerantes à concentração testada. Para fins de seleção no presente trabalho foram consideradas aptas a prosseguir para a etapa seguinte as leveduras que demonstraram tolerância no volume mínimo de 14% do teor alcoólico.

4.6 Crescimento a 37°C

O ensaio de crescimento a 37 °C foi aplicado apenas com as leveduras que se portaram de forma positiva nos testes anteriores. O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio Ágar YPG 2% previamente esterilizado. As placas foram montadas com três repetições, em câmara de fluxo. As leveduras a serem testadas mantidas nos tubos de ensaio foram coletadas com alça microbiológica esterilizada e foi então realizada a inoculação na placa na forma de estrias por esgotamento (figura 6). As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37 °C por 48 horas. Um grupo controle foi montado com o mesmo meio de cultivo, porém com incubação em estufa a 30 °C pelo mesmo período.

Figura 6: Esquema para inoculação do teste de crescimento a 37 °C. Fonte: O autor, 2020.



As leveduras tolerantes a alta temperatura foram aquelas que conseguiram crescer de modo satisfatório nas condições testadas. O crescimento no grupo ocorreu de forma normal em todas as cepas, diferentemente do grupo testado.

4.7 Fermentação e destilação em laboratório

Após a realização de todos os testes seletivos a cepa que reuniu todos os parâmetros desejados foi submetida ao ensaio de fermentação em laboratório, seguido de destilação para obter a cachaça resultante deste processo.

A levedura selecionada foi multiplicada tomando como base o esquema proposto por Gonçalves (2015) para formar o pé de cuba. Em um erlenmeyer de 200 ml contendo 100 ml de caldo de cana esterilizado em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos ajustado para 5 °Bx foi inoculada a levedura selecionada. Com uma alça microbiológica esterilizada foram tomadas quatro alçadas da colônia em cultivo no tubo de ensaio e introduzida no caldo, a solução foi homogeneizada e incubada em estufa microbiológica a 30 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foram adicionados 100 ml de caldo de cana esterilizado com brix ajustado em 7 °Bx ao volume inicial, sendo novamente incubado a 30 °C por mais 24 horas. Passado este período o volume foi transferido para um erlenmeyer de 500 ml contendo já 200 ml de caldo de cana esterilizada com brix em 9 °Bx, foi homogeneizado e mantido em estufa por 24 horas a 30 °C. Seguindo o procedimento os 400 ml resultantes das etapas anteriores foram transferidos para um erlenmeyer de 2000 ml e foi adicionado caldo de cana esterilizado com brix ajustado para 11 °Bx. O volume foi homogeneizado e levado à estufa por 24 horas a 30 °C. Estes passos foram realizados em três frações individuais.

Seguindo a multiplicação nos erlenmeyers os volumes resultantes foram transferidos para dornas no laboratório. Nas dornas o pé de cuba formado foi alimentado diariamente com

caldo de cana esterilizado a 14 °Bx, durante quatro dias, sendo 1 L adicionado no primeiro dia, 2 L no segundo dia e 1 L no terceiro e quarto dia.

A partir daí foi acompanhada a redução do brix até próximo de zero. Finalizado o processo de fermentação o vinho foi conduzido para destilação em destilador artesanal em laboratório.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento das leveduras

A atividade de isolamento visando a seleção de representantes locais mais aptas ao processo fermentativo para produção de cachaça na região do brejo paraibano segue a premissa de que o acesso a diversidade de leveduras de dada localidade contribui com a formação da identidade regional em questão (BARBOSA et al., 2016).

Buscou-se realizar todos os procedimentos de forma criteriosa visando alcançar as leveduras com melhor perfil. Iniciando pela coleta dos colmos e moagem para preparação do caldo que foi realizada logo após a colheita, visto que o armazenamento da cana pós-colheita interfere negativamente na qualidade da matéria-prima para fermentação, reduzindo a viabilidade celular das leveduras que, conseqüentemente, eleva o nível de contaminantes e de compostos secundários indesejáveis (OLIVEIRA-FILHO et al., 2016).

A amostra do caldo coletada já neste primeiro momento garante obter a maior diversidade possível natural da cana e do ambiente típico de engenho, como observado por Araújo et al., (2018) que reconhece o diversificado nicho ecológico que as dornas de fermentação representam.

Nesta etapa inicial do trabalho foram isoladas com sucesso 158 colônias com características de leveduras aptas para replicação e aplicação dos testes de exclusão por estresse. Os isolados foram distribuídos em quatro grupos refletindo os quatro tipos de cana que originaram o caldo, sendo identificados aqui como grupo “A”, “B”, “C” e “D” conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Número de colônias isoladas em cada grupo.

Grupo	A	B	C	D	Total
Isolados	42	50	46	20	158

O número de isolados foi considerado razoável, sendo uma amostra representativa da microbiota pesquisada. Trabalhos dessa mesma natureza, com outros substratos obtiveram números menores. Guimarães (2005) trabalhando com isolamento e seleção de cepas de *S. cerevisiae* para produção de vinho, isolou 61 leveduras nesta etapa do trabalho. De modo similar Oliveira (2015) isolando leveduras do abacaxi obteve 49 isolados para a seleção.

A opção por isolar leveduras apenas com 24 horas após o início do processo se deu com o objetivo de acessar cepas dominantes da fermentação, reduzindo com isso a ocorrência de

microrganismos contaminantes como bactérias e leveduras não-*Saccharomyces*. A capacidade da *S. cerevisiae* de se sobressair em relação a outras espécies foi observada em experimento, onde não-*Saccharomyces* perdem a capacidade de cultivo quando crescidas em associação (WANG et al., 2016).

Essa superioridade pode ser decorrência do caráter “killer” apresentado por algumas cepas, que consiste na secreção de compostos prejudiciais ao desenvolvimento de outras leveduras naquele meio (MARTINS et al., 2015).

5.2 Produção de sulfeto de hidrogênio

A presença de sulfeto de hidrogênio (H_2S) na bebida confere odor de ovo podre além de sabor desagradável, prejudicando a qualidade do produto. Neste sentido um dos critérios principais para seleção é que a cepa não gere H_2S como produto de seu metabolismo.

O primeiro teste de exclusão aplicado com as cepas isoladas foi de averiguação de produção de H_2S , pelas razões explicitadas anteriormente. Partindo dos 158 isolados aptos para seguir nos testes de seleção, a atribuição do conceito “produtora” e “não produtora” foi estabelecido de modo rígido quanto à coloração da colônia em questão. As leveduras que apresentaram coloração enegrecida, mesmo que de modo sutil em comparação ao controle, foram declaradas produtoras de ácido sulfídrico.

A tabela 3 mostra que a produção de sulfeto hidrogênio foi detectada em 72 cepas, ou 46% do total. Por ser uma característica indesejável, esses isolados foram desprezados, enquanto as 86 restantes (54%) foram consideradas não produtoras, sendo assim selecionadas quanto a este critério.

A primeira leitura foi realizada sete dias após a inoculação e a segunda leitura após 11 dias. Ao final do teste as cepas foram agrupadas entre produtoras e não produtoras do composto (Tabela 3).

Tabela 3. Cepas submetidas ao teste de produção de H_2S divididas conforme produção ou não. Fonte: Dados da pesquisa.

Produtoras de H_2S
A4, A7, A9, A10, A16, A17, A20, A21, A22, A24, A26, A30, A33, A34, A35, A36, A37, A39, A49, B2, B3, B6, B7, B8, B9, B10, B20, B22, B24, B25, B30, B35, B36, B39, B40, B45, B48, C1, C7, C8, C11, C13, C14, C18, C19, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C32, C33, C34, C38, C42, C44, C45, C46, C50, D6, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D19, D20

Não produtoras de H₂S

A1, A2, A3, A11, A12, A13, A15, A19, A23, A25, A28, A29, A31, A32, A40, A41, A42, A44, A45, A46, A47, A48, A50, B1, B4, B5, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B19, B21, B23, B26, B27, B28, B29, B31, B32, B33, B34, B37, B38, B41, B42, B43, B44, B46, B47, B49, B50, C2, C3, C4, C5, C6, C10, C12, C15, C16, C17, C20, C21, C36, C37, C39, C40, C43, C47, C48, C49, D1, D2, D3, D5, D7, D8, D15, D16, D18, D21, D22,

A observação do resultado em um período maior faz-se importante tendo em vista as diferenças no metabolismo de cada cepa que faz com que algumas levem mais tempo para apresentar a coloração indicativa de produção de H₂S. Os protocolos aplicados para essa finalidade considerando um período de ao menos 10 dias de crescimento gerou resultados positivos (GUIMARÃES, 2005; OLIVEIRA, 2015). Observa-se que períodos menores de avaliação resultam em menor número de cepas consideradas produtoras de H₂S (OLIVEIRA, 2005), arriscando atribuir falso negativo ao resultado obtido (Tabela 4).

Tabela 4. Visão geral da produção e H₂S pelas cepas testadas em diferentes momentos.

CEPA	D7	D11									
<i>A1</i>	-	-	<i>A49</i>	+	+	<i>B39</i>	+	+	<i>C30</i>	-	+
<i>A2</i>	-	-	<i>A50</i>	-	-	<i>B40</i>	+	+	<i>C32</i>	+	+
<i>A3</i>	-	-	<i>B1</i>	-	-	<i>B41</i>	-	-	<i>C33</i>	+	+
<i>A4</i>	-	+	<i>B2</i>	-	+	<i>B42</i>	-	-	<i>C34</i>	+	+
<i>A7</i>	+	+	<i>B3</i>	-	+	<i>B43</i>	-	-	<i>C36</i>	-	-
<i>A9</i>	-	+	<i>B4</i>	-	-	<i>B44</i>	-	-	<i>C37</i>	-	-
<i>A10</i>	-	+	<i>B5</i>	-	-	<i>B45</i>	+	+	<i>C38</i>	+	+
<i>A11</i>	-	-	<i>B6</i>	+	+	<i>B46</i>	-	-	<i>C39</i>	-	-
<i>A12</i>	-	-	<i>B7</i>	-	+	<i>B47</i>	-	-	<i>C40</i>	-	-
<i>A13</i>	-	-	<i>B8</i>	+	+	<i>B48</i>	+	+	<i>C42</i>	+	+
<i>A15</i>	-	-	<i>B9</i>	+	+	<i>B49</i>	-	-	<i>C43</i>	-	-

Tabela 4. Cont.

<i>A16</i>	+	+	<i>B10</i>	+	+	<i>B50</i>	-	-	<i>C44</i>	-	+
<i>A17</i>	+	+	<i>B11</i>	-	-	<i>C1</i>	-	+	<i>C45</i>	-	+
<i>A19</i>	-	-	<i>B12</i>	-	-	<i>C2</i>	-	-	<i>C46</i>	+	+
<i>A20</i>	-	+	<i>B13</i>	-	-	<i>C3</i>	-	-	<i>C47</i>	-	-
<i>A21</i>	-	+	<i>B14</i>	-	-	<i>C4</i>	-	-	<i>C48</i>	-	-
<i>A22</i>	+	+	<i>B15</i>	-	-	<i>C5</i>	-	-	<i>C49</i>	-	-
<i>A23</i>	-	-	<i>B16</i>	-	-	<i>C6</i>	-	-	<i>C50</i>	+	+
<i>A24</i>	-	+	<i>B17</i>	-	-	<i>C7</i>	-	+	<i>D1</i>	-	-
<i>A25</i>	-	-	<i>B18</i>	-	-	<i>C8</i>	-	+	<i>D2</i>	-	-
<i>A26</i>	+	+	<i>B19</i>	-	-	<i>C10</i>	-	-	<i>D3</i>	-	-
<i>A28</i>	-	-	<i>B20</i>	-	+	<i>C11</i>	+	+	<i>D5</i>	-	-

A29	-	-	B21	-	-	C12	-	-	D6	+	+
A30	+	+	B22	+	+	C13	+	+	D7	-	-
A31	-	-	B23	-	-	C14	+	+	D8	-	-
A32	-	-	B24	+	+	C15	-	-	D9	+	+
A33	+	+	B25	-	+	C16	-	-	D10	+	+
A34	+	+	B26	-	-	C17	-	-	D11	+	+
A35	+	+	B27	-	-	C18	-	+	D12	+	+
A36	+	+	B28	-	-	C19	+	+	D13	+	+
A37	+	+	B29	-	-	C20	-	-	D14	+	+
A39	+	+	B30	+	+	C21	-	-	D15	-	-
A40	-	-	B31	-	-	C22	+	+	D16	-	-
A41	-	-	B32	-	-	C23	+	+	D18	-	-
A42	-	-	B33	-	-	C24	+	+	D19	+	+
A44	-	-	B34	-	-	C25	+	+	D20	+	+
A45	-	-	B35	+	+	C26	-	+	D21	-	-
A46	-	-	B36	+	+	C27	-	+	D22	-	-
A47	-	-	B37	-	-	C28	+	+			
A48	-	-	B38	-	-	C29	+	+			

Sabe-se que a quantidade de H₂S produzida durante a vinificação é influenciada pela estirpe atuante, com destaque para leveduras não-*Saccharomyces* que produzem mais H₂S que as cepas do gênero *Saccharomyces*. Desse modo é indicado avaliar essa capacidade para a levedura utilizada antes da inoculação no substrato (NETO e MENDES-FERREIRA, 2005).

5.3 Teste de fermentação de glicose

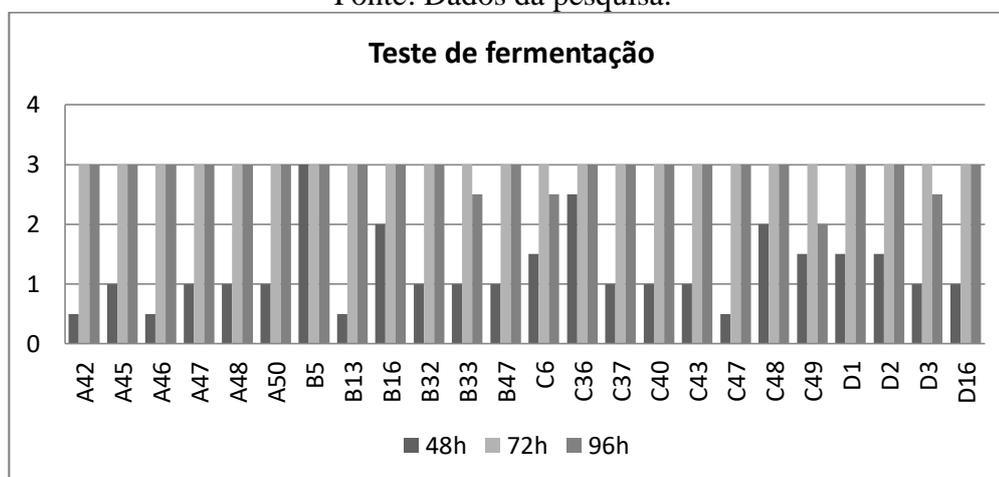
A fermentação de glicose é o requisito mínimo esperado de cepas destinadas a produção de cachaça, assim como de bebidas em geral, por esse ser um dos principais açúcares que compõem a cana e por ser uma fonte de preferência das *Saccharomyces* fermentadoras. Para verificar essa habilidade as cepas estudadas cultivadas em meio líquido contendo glicose como única fonte de carbono.

As 86 cepas que não apresentaram produção de H₂S foram submetidas ao teste de fermentação de glicose conforme metodologia previamente apresentada. Após inoculação e incubação em estufa a 28 °C foi realizada a primeira leitura com 24 horas de desenvolvimento, contudo não foi observada produção de gás nos tubinhos por nenhuma das cepas em estudo nesse período. A segunda leitura procedeu-se 24 horas após a primeira (48 horas após a inoculação). Desse momento em diante a fermentação pôde ser observada em algumas cepas. As leituras continuaram até o quarto dia de incubação (96 horas após inoculação) quando a maioria das cepas atingiu o máximo de gás nos tubinhos.

A constatação da capacidade fermentativa do açúcar em análise ocorre pela observação de formação de gás no tubo de Durham, que é o resultado da conversão da glicose dissolvida no meio em etanol, com liberação de dióxido de carbônico. O etanol se mistura ao meio, não sendo distinguível, porém o CO₂ resultante fica armazenado no tubo invertido evidenciando assim o processo.

Visando filtrar as cepas com melhores perfis de eficiência fermentativa foram selecionadas neste teste apenas aquelas com indicativo de produção de CO₂ no menor tempo do ensaio, ou seja, com 48 horas após inoculação. Dessa forma foram selecionadas 24 cepas: A42, A45, A46, A47, A48, A50, B5, B13, B16, B32, B33, B47, C6, C36, C37, C40, C43, C47, C48, C49, D1, D2, D3, D16. Os resultados obtidos demonstram que as cepas selecionadas nesta etapa apresentaram bom desempenho fermentativo, com todas atingindo o máximo de volume do tubo já no segundo dia de efetivo processo (figura 7).

Figura 7. Desempenho das leveduras selecionadas no teste de fermentação.
Fonte: Dados da pesquisa.



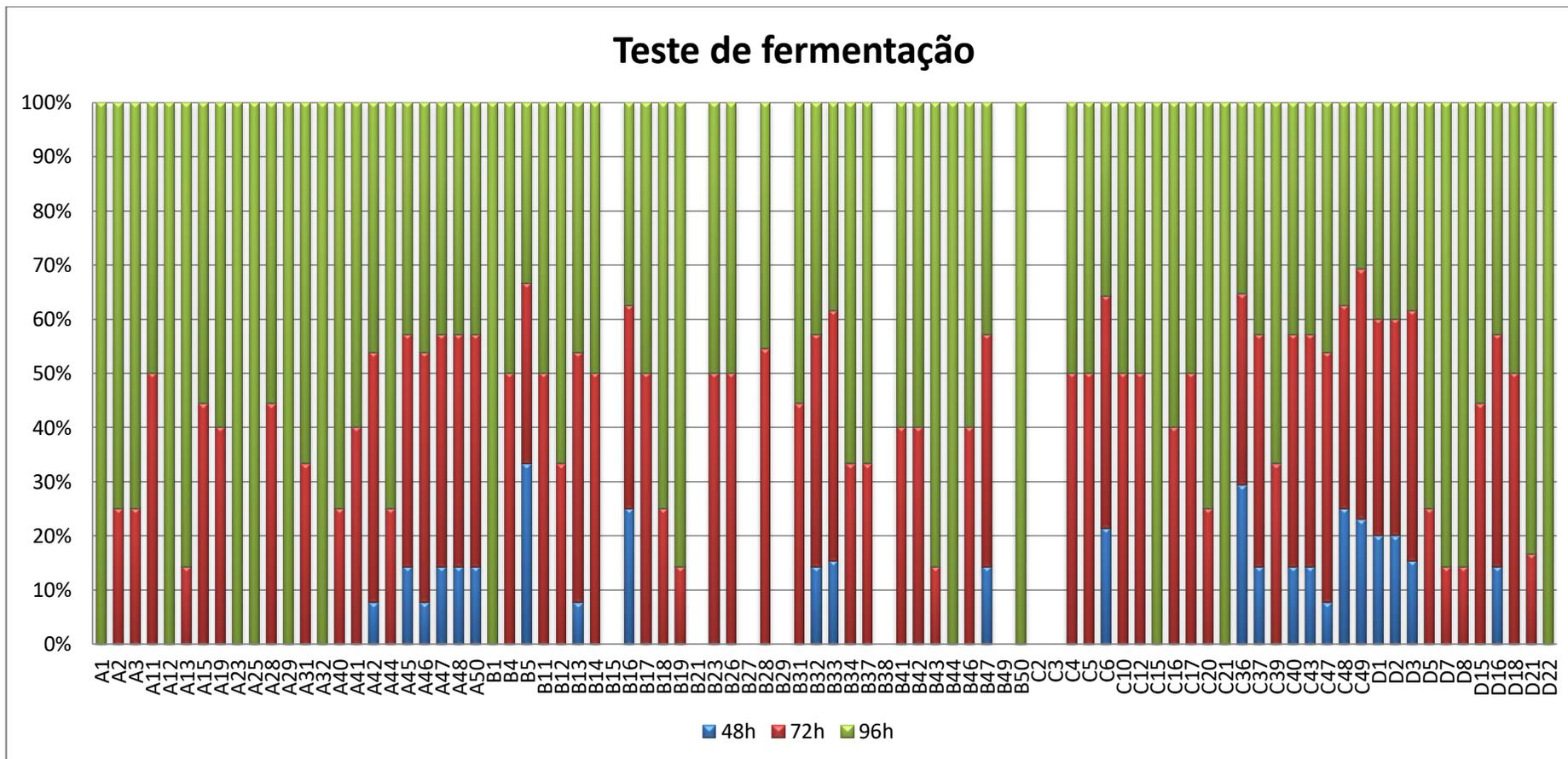
Das 62 restantes 55 apresentaram fermentação tardia e mais lenta em relação as primeiras e portanto foram eliminadas nesta fase de seleção. Embora a maioria das cepas tenha apresentando comportamento fermentativo, em geral atingindo o nível máximo observável de gás no tubo de Durham no tempo máximo do teste, foi observado que algumas acabaram levando mais tempo para demonstrar dominância do processo (figura 8).

Levando isso para a realidade das dornas, teríamos um potencial problema de contaminação do caldo pela dificuldade da levedura dominar a fermentação, abrindo espaço para bactérias ou outras leveduras indesejadas. A contaminação por leveduras selvagens acarreta mais prejuízos na eficiência fermentativa em comparação com contaminação

bacteriana (REIS, 2016). A eficiência das cepas de leveduras durante a fermentação tem direta relação com a qualidade do produto final.

O tempo transcorrido até o início efetivo da fermentação (48 horas), maior que o normalmente observado, pode ser devido ao volume do inóculo inserido em cada tubo, ou ainda por características intrínsecas de cada cepa. Conforme apresentado na Figura 8, é possível inferir que alguns representantes apresentaram vigor fermentativo superior a outros, o que se evidencia pelo volume de gás produzido pela cepa B5 com preenchimento total dos tubos na leitura com 48 horas. Tendência seguida pelas cepas B16, C36 e C48 com resultados aproximados.

Figura 8. Perfil de fermentação de todas as cepas testadas durante o período de teste. Fonte: Dados da pesquisa.



As demais cepas testadas apresentaram comportamento fermentativo de modo equivalente, produzindo em média 1/3 de gás nas 48 horas iniciais. Até o final do teste apenas 7 isolados não apresentaram sinais de fermentação: B15, B21, B27, B29, B38, B49, C2 e C3.

O número elevado de cepas fermentadoras em detrimento das que não fermentaram, pode estar relacionado com o meio de cultivo utilizado na etapa de isolamento, que consistia na concentração de 30% de glicose. Além de promover uma seleção prévia de cepas tolerantes a altas concentrações de açúcar, essa alta concentração de glicose pode também promover o bloqueio das vias respiratórias com ativação do efeito Crabtree, o que resulta em uma maior incidência de cepas fermentadoras neste meio (KAYIKCI e NIELSEN, 2015).

5.4 Teste de tolerância a etanol

O álcool é um composto prejudicial às estruturas celulares, representando uma barreira para a sobrevivência de muitos organismos. Assim sendo, para uma cepa de levedura especializada na fermentação alcoólica a capacidade de tolerar altas concentrações de etanol é fundamental, pois representa a eficiência metabólica necessária para consumir todo o açúcar de um meio sem sofrer influências pelo aumento da concentração do produto no meio.

A tolerância ao etanol deve ser investigada considerando as fontes desse composto no meio. Microrganismos que produzem naturalmente etanol por meio de fermentação alcoólica tendem a ser mais resistentes a níveis elevados de etanol, dito etanol endógeno, muito embora a tolerância a etanol de natureza exógena não seja tão conhecida. Observa-se, no entanto, que a eficiência de cepas melhoradas é maior que cepas selvagens quando expostas a estresse alcoólico (CARREON-RODRIGUEZ et al., 2019).

S. cerevisiae são notáveis tolerantes a níveis elevados de etanol. Embora o nível de tolerância possa variar de cepa para cepa. Concentrações de até 12% de álcool no meio parece ser um faixa comum à maioria das cepas. A partir daí, observamos valores mais específicos em cada caso (GUIMARÃES, 2005; OLIVEIRA, 2015).

Neste trabalho realizamos o teste de tolerância a etanol exógeno. As 24 cepas selecionadas no teste de fermentação foram submetidas ao teste, sendo submetidas ao desenvolvimento em meio de cultivo contendo as concentrações de 10%, 14% e 18% (v/v) de etanol. Os isolados que apresentaram crescimento igual ou próximo ao controle foram considerados tolerantes. Em todos os isolados foi observado bom crescimento das colônias tanto em meio com 10% quanto em 14% de etanol sendo, portanto, tolerantes a tais volumes

alcoólicos. Já em meio com 18% de volume alcoólico 16 isolados mostraram ainda bom perfil de desenvolvimento, o que é um número considerável para esse teor alcoólico (Tabela 4).

Tabela 5. Desenvolvimento das cepas nas diferentes concentrações de etanol.

	FG	Et 10%	Et 14%	Et 18%		FG	Et 10%	Et 14%	Et 18%
A42	x	x	x	-	C6	x	x	x	x
A45	x	x	x	-	C36	x	x	x	x
A46	x	x	x	-	C37	x	x	x	x
A47	x	x	x	-	C40	x	x	x	-
A48	x	x	x	x	C43	x	x	x	x
A50	x	x	x	-	C47	x	x	x	x
B5	x	x	x	x	C48	x	x	x	x
B13	x	x	x	-	C49	x	x	x	x
B16	x	x	x	-	D1	x	x	x	x
B32	x	x	x	x	D2	x	x	x	x
B33	x	x	x	x	D3	x	x	x	x
B47	x	x	x	x	D16	x	x	x	x

Embora nem todos os isolados testados tenham apresentado tolerância ao máximo da concentração de etanol no ensaio, todas as 24 cepas foram consideradas aptas para seguir na seleção por apresentarem crescimento satisfatório em meio com até 14% de teor alcoólico, um nível de tolerância satisfatória para os objetivos propostos.

5.5 Crescimento a 37 °C

A temperatura é um fator limitante a sobrevivência de qualquer organismo vivo. No caso de leveduras a temperatura ótima para crescimento é em torno dos 30 °C, quando seu metabolismo está em plena atividade. Uma das características da *S. cerevisiae* é sua amplitude de temperatura suportável, podendo apresentar desenvolvimento em temperaturas que chegam até 45 °C (GUIMARÃES, 2005).

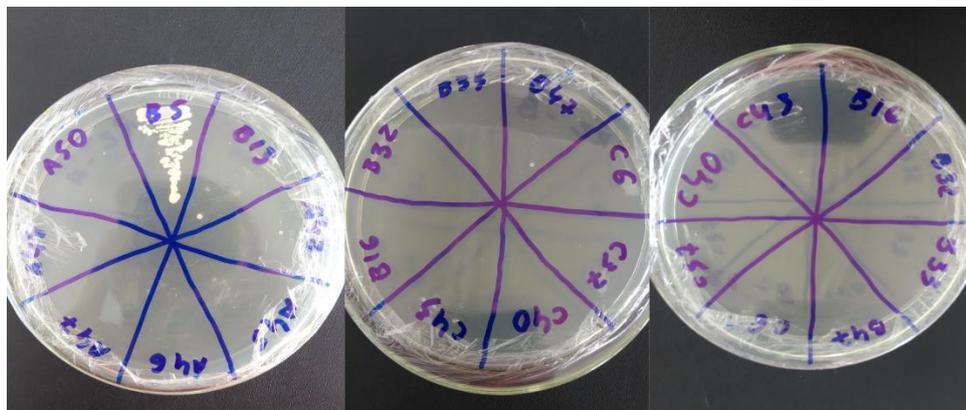
A investigação de crescimento de cepas de leveduras sob a temperatura de 37 °C também se aplica como meio de identificação, muito embora exista uma grande variedade de metabolismos nas distintas cepas dentro de uma mesma espécie. Isso significa que a identificação taxonômica para leveduras com base em características fisiológicas requer análise de um elevado número de informações (KURTZMAN et al., 2011).

A seleção de cepas fermentadoras resistentes a altas temperaturas para produção de cachaça representa ainda uma necessidade importante para o bom andamento do processo.

Durante a fermentação há liberação de calor para o meio fazendo com que ocorra aumento na temperatura do mosto. Desse modo, espera-se que a levedura em atividade seja resistente a esse aumento na temperatura, evitando perdas na produtividade.

Seguindo a metodologia apresentada para o teste de crescimento a 37 °C, após o período de incubação de 48 horas apenas um isolado apresentou pleno desenvolvimento (figura 9).

Figura 9: Desenvolvimento das leveduras a 37 °C. Fonte: Dados da pesquisa.



O número de cepas tolerantes à temperatura testada ficou abaixo do esperado, com base no observado em outros trabalhos da mesma natureza. A cepa B5 foi a única cepa que atendeu a todos os critérios considerados para a seleção em curso.

Observando o teste de fermentação constata-se que esta cepa foi uma das que apresentou melhor perfil de fermentação na ocasião. Indicativos que apontam para uma boa candidata para produção de cachaça. Para tanto se faz necessário submeter a cepa B5 a uma rodada de fermentação prática com a finalidade de mensurar seus compostos secundários produzidos durante o processo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação de microrganismos nativos de uma localidade em particular visando a seleção direcionada para uma finalidade em especial, mostrou neste trabalho ser uma empreitada possível e necessária. Além do panorama da diversidade microbiana que podemos ter acesso e da possibilidade de fortalecimento da cachaça no cenário cultural e econômico, ficou explícito que há um campo biotecnológico promissor a ser explorado na região.

De acordo com os resultados apresentados, ao menos uma cepa isolada neste trabalho reúne todas as características desejadas na proposta inicial para uma levedura que venha a ser utilizada como protagonista da fermentação do caldo de cana na produção de cachaça. Em resumo, a cepa B5 foi tolerante às altas concentrações de glicose, bem como de etanol com bom desenvolvimento até mesmo em meio a 18% de teor alcoólico, não produz sulfeto de hidrogênio e cresce bem em altas temperaturas.

As demais cepas embora não tenham apresentado o desempenho esperado em todos os pontos testados, podem apresentar características particulares que venham a ser interessantes para outras aplicações. Além disso, a aplicação delas em associação com outras leveduras selecionadas pode resultar em resultados satisfatórios conforme o metabolismo de cada uma. Vale salientar ainda que características específicas de cada cepa pode tornar instrumento de interesse para melhoramentos genéticos futuros. Tudo isso são pontos a serem aprofundados em novos trabalhos.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. São Paulo: Blucher, 2017.
- ÁLVAREZ-AINZA, M. L.; ZAMORA-QUIÑONEZ, K. A.; MORENO-IBARRA, G. M.; ACEDO-FELIX, E. Genomic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated with alcoholic fermentation of bacanora produced by artisanal methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. DOI: 10.1007/s12010-014-1469-y. 2015.
- ALVES, T. M.; FARIAS, F. C.; ALCARDE, A. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. H. Influência do tratamento térmico do caldo de cana no desenvolvimento do processo fermentativo e na composição química da cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**. DOI: 10.1590/1981-6723.12617. 2018.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. In: SIMPÓSIO MICRORGANISMOS EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS, 2012, Brasília. **Anais Simpósio Microrganismos em Agroenergia**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2013.
- AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugarcane spirit (cachaça): effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.04.014. 2016.
- ARAÚJO, T. M. et al. Cachaça yeast strain: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Anthonie van Leeuwenhoek**. DOI: 10.1007/s10482-018-1063-3. 2018.
- ARRO, J. et al. Balancing selection contributed to domestication of autopolyploid sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Euphytica**. v. 209. p. 477-493. 2016.
- BADOTTI, F.; GOMES, F. C. O.; TEODORO, M. G. M.; SILVA, A. L. D.; ROSA, C. A.; MACHADO, A. M. R. Electrospray ionization mass spectrometry characterization of musts and alembic brazilian cachaças using selected yeast strains. **Journal of Food Science**. V. 79, n. 4, 2014.
- BARBOSA, E. A. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeasts strains. **Journal of Applied Microbiology**. DOI: 10.1111/jam.13216. 2016.
- BARBOSA, R. et al. Multiple rounds of artificial selection promote microbe secondary domestication – The case of cachaça yeasts. **Genome Biology and Evolution**. DOI: 10.1093/gbe/evy132. 2018.
- BERTOLO, A. P.; BIZ, A. P.; KEMPKA, A. P.; RIGO, E.; CARVALHEIRO, D. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. **Journal of Food Science and Technology**. v.56, n. 8, p. 3697-3706, 2019.
- BONASSA, G. et al. Optimization of first generation alcoholic fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Scientiarum**. V. 37, n. 3, p. 313-320. 2015.

- BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Aging marker profile in cachaça is influenced by toasted oak chips. **Journal of The Institute of Brewing**. DOI: 10.1002/jib.202. 2015.
- BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Assesment of ethyl carbamate contamination in cachaça (Brazilian sugar cane spirit). **Beverages**. DOI: 10.3390/beverages2040028. 2016.
- BORTOLETTO, A. M.; CORREA, A. C.; ALCARDE, A. R. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.05.003. 2016.
- BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Chemical and microbiological quality of sugar cane juice influences the concentration of ethyl carbamate and volatile congeners in cachaça. **Journal of The Institute of Brewing**. DOI: 10.1002/jib.213. 2015.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, 2019.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa Nº 28, de 8 de agosto de 2014**. Diário Oficial da União, seção I de 11 de Agosto de 2014.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa nº 13, de 29/6/2005. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 3-4, 2005.
- CARREON-RODRIGUEZ, O. E. et al. Phenotypic and genomic analyses of *Zymomonas mobilis* ZM4 mutants with enhanced ethanol tolerance. **Biotechnology Reports**. v. 23. 2019.
- CARVALHO, F. P.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Interection of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum**. V. 37, n. 1, p. 51-60, 2015.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 6, n. 3. Brasília, 2019.
- CONCEIÇÃO, L. E. F. R. et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. DOI: 10.1007/s10295-014-1528-y. 2015.
- COUTINHO, J. S.; GUIMARÃES-JÚNIOR, F. R. F.; GUIMARÃES, L. G. A.; NODARI, C. H. Barreiras na produção de cana-de-açúcar no estado da Paraíba (PB). **Exacta**. DOI: 10.5585/ExactaEP.v14n2.6410. 2016.
- CUNHA, S.; MATOS, J. S. Além da caipirinha: cachaça como solvente para síntese orgânica e extração de pigmento. **Química nova**. DOI: 10.21577/0100-4042.20170110. 2017.
- D'AVILA, G. B. et al. Quantification of ethyl carbamate in cachaça produced in different agro-industrial production systems. **Journal of The Institute of Brewing**. DOI: 10.1002/jib.322. 2016.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em 10/12/2020.

GODDARD, M. R.; GREIG, D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? **FEMS Yeast Research**. V. 15, n. 3, 2015.

GONÇALVES, R. C. F. et al. Compostos voláteis em cachaças de alambiques produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. **Magistra**. v. 28, n. 3/4, p. 285-293. Cruz das Almas, 2016.

GUIDINI, C. Z.; MARQUEZ, L. D. S.; SILVA, H. A.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Alcoholic fermentation with flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch process. **Appl Biochem Biotechnol**. V. 172, p. 1623-1638, 2014.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

KAYIKCI, O.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**. v. 15, n. 6, 2015.

KRIVORUCHKO, A.; NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 35, p. 7-15, 2015.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; **The yeasts: A taxonomic study**. Elsevier: Ed. 5, Vol. 1, 2011.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Ed. 12. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINS, S. C. S.; VAZ, F. L.; MARTINS, C. M. Isolation, characterization, and identification of wild killer yeasts from sugarcane juice. **Semina: Ciências Agrárias**. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n5p3123. 2015.

MENDES, I. et al. Integrating transcriptomics and metabolomics for the analysis of the aroma profiles of *Saccharomyces cerevisiae* strains from diverse origins. **BMC Genomics**. DOI: 10.1186/s12864-017-3816-1. 2017.

MOREIRA, C. S. et al. Evaluation of morphological and physiological parameters of industrial yeast strains with potential biotechnological for the production of ethanol. **Ciência e Natura**. V. 37, n. 4, p. 55-63, 2015.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Food Science and Technology**. DOI: 10.1590/S0101-20612005000200016. 2005.

OLIVEIRA, C. F. **Isolamento, caracterização, identificação e seleção de uma levedura fermentadora de abacaxi (*Ananas comosus* L.)**. 2015. 71f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, J. H.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**. DOI: 10.1590/1981-6723.6915. 2016.

PAIVA, A. L.; SOUZA, R. B.; BARRETO, I. D. C.; BRITO, M. J. Fluxo das exportações brasileiras de cachaça: traços da influência do estado no setor. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. V. 55, n. 4, 2017.

PEREIRA, A. F.; SILVA, P. H. A.; PINHEIRO, P. F.; BRAGA, L. M.; PINHEIRO, C. A. Adição de fontes de nitrogênio e de duas linhagens de leveduras na fermentação alcoólica para produção de cachaça. **Revista de Engenharia Química e química**. V. 1, n. 1, p. 45-59, 2015.

PETRUZZI, L. et al. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 995. 2017.

PORTUGAL, C. B.; ALCARDE, A. R.; BORTOLETTO, A. M.; SILVA, A. P. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**. DOI: 10.1007/s00217-016-2659-3. 2016.

PORTUGAL, C. B.; SILVA, A. P.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? **Food Research International**. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.022. 2016.

REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2016.

RIBEIRO, M. L. D.; FERREIRA, O. E.; TEIXEIRA, V.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência Agrônômica**. V. 48, n. 3, p. 458-463, 2017.

SANTIAGO, W. D. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers. **Journal of The Institute of Brewing**. DOI: 10.1002/jib.463. 2017.

SANTOS, M. S. M. et al. Action of light on metabolism of yeast FT-858. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**. DOI: 10.17807/orbital.v1i4.1219. 2019.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

THIRUGNANASAMBANDAM, P. P.; HOANG, N. V.; HENRY, R. J. The challenge of analyzing the sugarcane genome. **Frontiers in Plant Science**. v.9, n. 616. 2018.

VARELA, C. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 100, p. 9861-9874, 2016.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**. V. 2, n. 30, 2016.

WANG, C.; MAS, A.; ESTEVE-ZARZOSO, B. The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. **Frontiers in Microbiology**. V. 7, n. 502, 2016.

WLODARCZYK, S. R.; GAENSLY, F.; CALEGARI-SANTOS, R.; DEFFERT, F.; SILVA, G. A.; BONFIM, T. M. B. Characterization of autochthonous wine yeasts isolated in vineyards of the state of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum**. v. 37, n. 3, p. 361-365, 2015.

XU, F. et al. Comparative analyses of two sugarcane ancestors *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum* based on complete chloroplast genome sequences and photosynthetic ability in cold stress. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20 n. 3828. 2019.

ZACARONI, L. M. et al. Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in cachaça stored in glass bottles. **Journal of The Institute of Brewing**. DOI 10.1002/jib.214. 2015.