

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Thiago Moreira dos Santos

Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de salinas/mg, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças.

OURO PRETO
2013

Thiago Moreira dos Santos

Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de salinas/mg, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças.

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto, Junho de 2013

S237a Santos, Thiago Moreira dos.
Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de Salinas/MG, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças [manuscrito] / Thiago Moreira dos Santos – 2013.
xv, 102f.: il.; graf.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão.

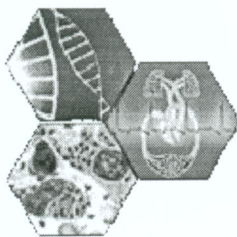
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Fermentação - Teses. 2. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. 3. Lactobacilos - *Lactobacillus casei* - Teses. 4. Cachaça - Teses. 5. Lactatos - Teses. I. Brandão, Rogélio Lopes. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 582.282.23:663.543

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas




Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:


“Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da Região de Salinas/MG, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças”

Aos treze dias do mês de Junho de 2013, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno **Thiago Moreira dos Santos**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.


Membros da Banca Examinadora:



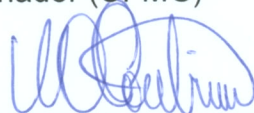
Prof. Dr. Hilário Cuquetto Mantovani
Examinador (UFV)




Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
Examinador (UFMG)



Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto
Examinador (DINTER/UFOP)



Prof. Dr. Maurício Xavier Coutrim
Examinadora (DINTER/UFOP)



Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Presidente

DATA DA DEFESA: **13/06/2013**

*Dedico este trabalho com todo meu amor
à minha esposa Luciana.
Obrigado por tudo minha vida!*

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Rogelio Brandão, exemplo de pesquisador e orientador, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, conselhos e paciência durante nossa jornada.

À minha esposa Luciana, companheira, guerreira, incentivadora, amiga...amor da minha vida! Obrigado pela paciência e presença constantes durante esses quatro anos de dedicação ao doutorado e ao trabalho.

A meus pais, Wagner e Sônia, pela educação, princípios e valores passados. Em especial ao meu pai, por ser determinante em minhas decisões acadêmicas (graduação, mestrado e este doutorado).

À toda minha família, em especial meus irmãos, cunhadas, sogros e avós pelo carinho, incentivo e orações durante essa luta.

Agradeço especialmente aos meus amigos de doutorado Edilene, Magalhães, Daniela, Oscar, Lázaro e Rosimeire. Obrigado a cada um pelos companheiros que foram, por terem contribuído com minha formação e possuírem o mesmo objetivo que eu quando almejei e lutei pelo doutorado: formar um grupo de pesquisa na área da cachaça. Podem contar comigo sempre!

À UFOP pela oportunidade e disponibilidade de toda sua infraestrutura e corpo técnico (docentes e técnicos administrativos) para execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Ieso de Castro pela disponibilidade, ensinamentos e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Leoneide Bouillet por sua atenção, disponibilidade e maneira de trabalhar tornando prazerosa a tarefa de aprender.

À Zezé Trópia pela alegria contagiante, paciência e disponibilidade em auxiliar para o bom andamento dos trabalhos no laboratório.

A toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) pela disposição e compromisso com a ciência. Especialmente gostaria de agradecer ao Anderson Proust, Bruna Trindade e Gabriela Fonseca pelo convívio, amizade e experiências compartilhadas.

Aos Professores do Laboratório Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas da UFOP, Dr. Maurício Coutrim e Dr. Robson Afonso, pelos ensinamentos,

disponibilidade do laboratório, auxílio e convívio, além é claro do exemplo de profissionalismo e parceria na condução dos trabalhos do laboratório.

À equipe de alunos do Laboratório Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas da UFOP, por toda a paciência, companheirismo e disponibilidade no auxílio e acompanhamento na realização das análises cromatográficas.

Ao IFNMG – *Campus* Salinas pela oportunidade, estrutura, logística e arranjo dos compromissos de professor para o bom desenvolvimento dos trabalhos.

Aos servidores do IFNMG – *Campus* Salinas, em especial Prof. Adalcino França Junior e Profa. Maria Araci Magalhães, pelo apoio e compreensão no andamento dos trabalhos. Especialmente a quem auxiliou diretamente para a realização dos experimentos em Salinas, José Aparecido, Fábio de Souza, Lara, Álvaro, Isaías, Osmar, Selma (e a todas as “tias” do refeitório), Jânio (e a todos os vigilantes pela força durante as madrugadas de experimento) “Nego”, “Seu” Geraldo, Bida, Ramon, Adão e Dilermando, “Seu” Flor, Lorivaldo, Alex, Denis, Karina e Valdirene, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Charles Bernardo Buteri, exemplo de pessoa e profissional, pelo apoio logístico e moral durante todas as etapas do DINTER. Não mediu esforços para atender as nossas demandas. Muito obrigado!

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do curso superior de Tecnologia em Produção de Cachaça do IFNMG – *Campus* Salinas, Vanessa, Liliane, Adriana, Dayany, Larissa, Gustavo, Felipe, Hugo, Jefferson, Fernanda, Giselle, Layenia, Danúbia, Keithe (branca e morena) entre outros, por todo o auxílio, dedicação, compromisso e partilha de experiências na condução dos experimentos de fermentação.

Aos meus alunos e estagiários do curso técnico em agroindústria, Rafael, Rogério, Kaico, Osvaldo, Walter, Bruna, Paulo Henrique, Kissley, Sabrina, Fabiele, Leidiane, Renato entre outros, pela ajuda e dedicação nos experimentos.

A todos que contribuíram, de uma forma ou de outra, para a minha formação profissional, técnica, científica e humana durante esses quatro anos. Muito Obrigado!

RESUMO

A fermentação é uma etapa importante no processo de produção da cachaça, conduzida por microrganismos como leveduras e bactérias, responsáveis pela produção dos principais compostos presentes na bebida. As leveduras, notadamente a *Saccharomyces cerevisiae*, são as principais responsáveis pela condução desta etapa. Dentre as bactérias presentes, as bactérias lácticas são as mais comumente isoladas. Estas bactérias tem sido descritas por causarem prejuízos à fermentação mas também relata-se sua importância na melhoria sensorial de vinhos, pelo do aumento de ésteres, em especial o lactato de etila. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da presença de bactérias lácticas isoladas da região de Salinas/MG no processo fermentativo conduzido por uma levedura selecionada, assim como nas características físico-químicas e sensoriais da bebida. Inicialmente foram isoladas bactérias lácticas oriundas de dornas de fermentação de produtores de cachaça da região de Salinas/MG para posterior caracterização molecular. A caracterização molecular foi realizada por análise de restrição enzimática (PCR-ARDRA) e confirmada pelo sequenciamento da região intergênica 16S-23S, identificando bactérias da espécie *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus perolens* em apenas um isolado. Estes isolados foram submetidos a testes de crescimento, viabilidade e produção de lactato de etila para escolha da melhor bactéria para uso nos experimentos de fermentação em escala piloto. Para avaliar o efeito desta bactéria sobre a fermentação da cachaça, foram utilizadas quatro dornas de 50L, em ambiente controlado, contendo caldo de cana-de-açúcar de uma mesma cultivar e uma *Saccharomyces cerevisiae* selecionada da região de Salinas/MG, durante 10 dias consecutivos. Variou-se somente a presença, o inoculo e reinóculos da bactéria láctica, assim como o uso de caldo esterilizado. Foram analisados parâmetros fermentativos como a taxa de consumo de sólidos solúveis totais, grau alcoólico e acidez total do mosto. Não houve diferença significativa entre as dornas controle (somente levedura) e as dornas com adição de bactéria láctica (0h, reinóculos de 48h e caldo autoclavado com reinóculos), não afetando assim o desempenho da fermentação. Entretanto a dorna com reinóculos de bactéria a cada 48 horas utilizando caldo estéril teve um pior desempenho a partir do quinto dia, indicando uma fermentação mais lenta. Para os parâmetros físico-químicos foi constatado que houve maior produção de lactato de etila na dorna com

caldo autoclavado e reinóculos da bactéria láctica, mostrando que somente a adição e os reinóculos da bactéria não garantem necessariamente uma maior presença do lactato de etila. Pode-se constatar que a relação entre a cepa de levedura e a espécie de bactéria láctica é fator importante para a presença do éster em estudo. Os resultados de acidez volátil da cachaça indicam que a adição e os reinóculos de *Lactobacillus casei* não interferem nesse parâmetro e mostram que a autoclavagem do caldo gera uma cachaça mais ácida. Os resultados dos testes de aceitação das cachaças produzidas indicaram que os inóculos e reinóculos de *Lactobacillus casei*, assim como o tratamento térmico do caldo, não interferem na percepção sensorial dos atributos analisados pelos julgadores e consumidores.

ABSTRACT

Fermentation is an important step in the process of cachaça, conducted by microorganisms such as yeasts and bacteria. They are responsible for the production of the main compounds present in the beverage. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, notably, is the main responsible for driving this step. One of the present bacteria, the lactic acid one are the most commonly isolated. These bacteria have been described as causing damage to fermentation but also some authors describes its importance in wine sensory improvement, by increasing esters, ethyl lactate in particular. The aim of this study was to evaluate the presence of lactic acid bacteria isolated from the region of Salinas/MG in fermentation process conducted by a selected yeast, as well as in the physical-chemical and sensory characteristics of the beverage. Lactic acid bacteria were isolated initially from fermentation vats of cachaça producers from Salinas/MG and further molecular characterization. The molecular characterization was performed by enzyme restriction analysis (ARDRA-PCR) and confirmed sequencing the intergenic 16S-23S region. *Lactobacillus casei* type was the most isolated and *Lactobacillus perolens* was recovered in only one sample. These isolates were tested for growth, viability and production of ethyl lactate to select best bacterium for use in pilot-scale fermentation experiment. To evaluate the effect of this bacterium on cachaça fermentation, four vats of 50 L were used, in a controlled environment, containing sugar cane broth of the same cultivar and a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae* from Salinas/MG, during 10 consecutive days. The variables were the presence, inoculums and re-inoculums of lactic bacteria, as well as the use of sterile broth. The following fermentation parameters were analyzed: the rate of consumption of total soluble solids, alcohol and total acidity degree. There was no significant difference between the control (yeast) fermentation vats and those with addition of lactic bacteria (0h, re-inoculums at 48 h and autoclaved broth with re-inoculums), not affecting the performance of the fermentation. However vats re-inoculated with bacteria every 48 hours using sterile broth had a worse performance after the fifth day, indicating a slower fermentation. Concerning chemical parameters there was an increased production of ethyl lactate in vat with autoclaved broth and re-inoculums of lactic bacteria, showing that only the addition and re-inoculums of bacteria do not guarantee a higher presence of ethyl lactate. The

relationship between the strain of yeast and lactic bacteria species is an important factor for the presence of ester. The results of volatile acidity of cachaça indicate that the addition and re-inoculation of *Lactobacillus casei* do not interfere on this parameter and shows that the broth autoclaving produces a more acidic cachaça. The results of the acceptance tests of cachaças produced indicated that inoculums and re-inoculums of *Lactobacillus casei*, as well as the broth heat treatment do not interfere with the sensory perception of the attributes examined by judges and consumers.

SUMÁRIO

1– INTRODUÇÃO	1
1.1– BREVE HISTÓRICO SOBRE A CACHAÇA.....	1
1.2– LEGISLAÇÃO E MERCADO DA CACHAÇA.....	2
1.3– A CACHAÇA EM SALINAS (MG)	5
1.4– DEFINIÇÕES DE CACHAÇA E PROCESSO PRODUTIVO	9
1.5– CONTAMINAÇÃO DA FERMENTAÇÃO	15
1.6– BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS	16
1.7– METABOLISMO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS	18
1.8– ÉSTERES.....	21
2 – JUSTIFICATIVA.....	25
3 – OBJETIVOS	26
3.1 – GERAL.....	26
3.2 – ESPECÍFICOS	26
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 – CEPAS DE MICRO-ORGANISMOS UTILIZADAS	27
4.2 – MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	27
4.3 – MEIOS DE CULTURA	27
4.3.1 Meio YPD2%.....	27
4.3.2 – Meio MRS (de Man, Rogosa and Sharpe).....	27
4.3.3 – Meio YM (Malt Extract Agar) pH 3,5.....	28
4.3.4 – Meio SCY (Saccharomyces cerevisiae yeasts) Agar pH 3,5	28
4.3.5 – Agar diferencial (WL Nutrient Agar + Cicloheximida)	28
4.3.6 – Meio Caldo de Cana (MCC).....	28
4.4 – FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS	29
4.4.1 – Preparo do Inóculo.....	29
4.4.2 – Propagação das cepas selecionadas de Saccharomyces cerevisiae.....	29
4.4.3 - Cana-de-açúcar	30
4.4.4 – Início do processo fermentativo	30
4.4.5 - Fermentação.....	31
4.4.6 - Destilação em alambique de cobre	31
4.5 – PARÂMETROS FERMENTATIVOS AVALIADOS.....	32
4.6 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	32
4.6.1 – Compostos voláteis na cachaça.....	33

4.7 – ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	33
4.8 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	34
4.8.1. <i>Extração de DNA total</i>	34
4.8.1.1. Obtenção dos protoplastos e lise das células.....	34
4.8.1.2. Extração do DNA	35
4.8.1.3. Quantificação do DNA	36
4.8.2. <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	36
4.8.3. <i>Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rRNA com endonucleases específicas (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)</i>	37
4.8.4 – <i>Análises In silico</i>	38
4.8.5 – <i>Clonagem</i>	39
4.8.5.1 – Preparo de células competentes	39
4.8.5.2 – Reação de PCR.....	41
4.8.5.3 – Clonagem.....	42
4.8.6 – <i>Sequenciamento</i>	42
4.9 – SELEÇÃO DA BACTÉRIA LÁCTICA	43
4.9.1 – <i>Adaptação das bactérias lácticas ao meio da fermentação consorciada</i>	43
5 – FERMENTAÇÕES CONSORCIADAS EM ESCALA PILOTO	45
5.1 – Parâmetros fermentativos avaliados	47
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	47
5.2.1 – <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)</i>	47
5.2.1.1 – Preparo das Amostras.....	47
5.2.1.2 – Condições instrumentais.....	48
5.2.2 – <i>Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID)</i>	48
5.2.2.1 – Preparo das soluções e confecção da curva analítica	48
5.2.2.2 – Preparo das amostras de cachaça para injeção	49
5.2.2.3 – Condições instrumentais.....	49
5.2.3 – <i>Análise de Espectrometria</i>	49
5.2.3.1 - Materiais	50
5.2.3.2 – Procedimentos para análise	50
5.3 – ANÁLISES DE ACEITAÇÃO DAS BEBIDAS ORIUNDAS DAS FERMENTAÇÕES CONSORCIADAS	50
5.3.1 – <i>Características dos julgadores</i>	50
5.3.2 – <i>Características dos Consumidores</i>	51
5.3.4 – <i>Condições dos testes</i>	51
5.3.5 – <i>Teste de comparação múltipla</i>	51
5.3.6 – <i>Teste de Aceitação</i>	52

5.4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	52
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1 – FERMENTAÇÕES EM ESCALA PILOTO	54
6.2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	63
6.3 – FERMENTAÇÕES CONSORCIADAS ENTRE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	68
6.4 – TESTES DE ACEITAÇÃO DAS BEBIDAS	79
6.4.1 – <i>Teste de comparação múltipla</i>	79
6.4.2 – <i>Teste de aceitação de consumidores</i>	81
7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

Tabela 1	Quantidade de alambiques no Estado de Minas Gerais por região geográfica.....	6
Tabela 2	Detalhamento das exportações da cachaça de Minas Gerais em 2009.....	7
Tabela 3	Diferenciação de bactérias ácido lácticas por análise <i>in silico</i> de restrição enzimática dos três fragmentos da região intergênica 16S-23S do rDNA.....	40
Tabela 4	Condições experimentais adotadas no experimento em escala piloto das dornas de fermentação consorciada.....	46
Tabela 5	Isolamento de bactérias lácticas em ágar MRS de alambiques da região de Salinas/MG.....	64
Tabela 6	Resultados das digestões enzimáticas do menor fragmento da região intergênica 16S-23S do rDNA das amostras de bactérias lácticas isoladas de alambiques da micro-região de Salinas/MG.....	67
Tabela 7	Concentrações dos compostos presentes nas cachaças produzidas em fermentações consorciadas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>) em escala piloto.....	74
Tabela 8	Valores médios das notas obtidas para os atributos aroma, sabor, acidez e aroma frutado no teste de comparação múltipla.....	80

Figura 1	Principais países de destino (volume) da cachaça brasileira exportadas no ano de 2010.....	4
Figura 2	Participação dos estados brasileiros (em volume) nas exportações de cachaça no ano de 2010.....	8
Figura 3	Fluxograma do processo produtivo da cachaça.....	11
Figura 4	Metabolização dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Figura 5	Esquema simplificado das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i>	19
Figura 6	Mediana das contagens (Log UFC/mL) de bactérias lácticas (A) e bactérias totais (B) durante 10 ciclos fermentativos com 15 diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da micro-região de Salinas/MG.....	55
Figura 7	Boxplot mostrando a produção de Lactato de Etila por cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
Figura 8	Evolução da contagem de bactérias totais (BT) e lácticas (BL) na fermentação e da quantidade de lactato de etila (LE) na cachaça.....	58
Figura 9	Análise da correlação, através do coeficiente de Spearman, entre bactérias lácticas (BL) e lactato de etila (LE).....	59
Figura 10	Correlação entre contagem de bactérias lácticas (Log UFC/mL) e os parâmetros acidez volátil e grau alcoólico do vinho.....	60
Figura 11	Correlação entre contagem de bactérias totais (Log UFC/mL) e os parâmetros grau alcoólico do vinho e acidez volátil da cachaça	62
Figura 12	Reação de PCR da região intergênica 16S-23S visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,4%.....	65
Figura 13	Parâmetros avaliados durante dez dias consecutivos em fermentações consorciadas (escala piloto) entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	69
Figura 14	Evolução da população microbiana durante dez dias consecutivos em fermentações consorciadas (escala piloto) entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	71

Figura 15	Presença de lactato de etila (A) e somatório de hexanoato, octanoato e decanoato de etila (B) em cachaças produzidas em fermentações consorciadas (escala piloto) entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	73
Figura 16	Presença de Álcoois Superiores em cachaças produzidas em fermentações consorciadas (escala piloto) entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	78
Figura 17	Análise dos descritores Aroma (A), Sabor (B), Acidez (C) e Aroma Frutado (D) das cachaças produzidas nas condições experimentais adotadas.....	82
Figura 18	Resultados de impressão global no teste de aceitação, com 124 consumidores, das cachaças oriundas das diferentes dornas das fermentações consorciadas entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	84

1- INTRODUÇÃO

1.1- Breve Histórico sobre a Cachaça

Os primeiros registros de obtenção da aguardente (*Ácqua ardens*) datam dos anos 23 a 79 d.C. pelos gregos. Os alquimistas atribuíram propriedades místico-medicinais à aguardente que então passou a ser chamada de água da vida (*Eau de vie*) ou elixir da longevidade. A aguardente chegou ao Oriente Médio pela força da expansão do Império Romano e os árabes disseminaram a técnica da destilação pelo Velho e Novo Mundo (Carvalho, 2001). Esta tecnologia de produção espalhou-se pelo mundo inteiro, no entanto, cada país utilizava uma matéria-prima diferente para destilação. Na Itália, a uva era utilizada para fazer a *grappa*; na Alemanha a cereja deu origem ao *kirsch*; na Escócia a cevada deu origem ao uísque; na Rússia o centeio deu origem à *vodka*; na China e Japão, o saquê originou-se do arroz; em Portugal o bagaço de uva originou a bagaceira (Galinaro, 2006; Venturini Filho, 2005).

A cana-de-açúcar chegou ao Brasil trazida da ilha da Madeira pelos portugueses em meados do século XVI. Nos engenhos descobriram que o vinho da cana conhecido como “garapa azeda”, líquido resultante dos tachos de rapadura, servia de alimento para os animais. Os escravos passaram a tomar esta bebida inicialmente apenas fermentada e começaram a destilar este líquido, chamando-o de “cagaça”, daí o nome cachaça (Cassini, 2004).

Com a abolição da escravatura, o surgimento da economia cafeeira e a proclamação da República começam uma fase de declínio para o prestígio da cachaça, com hábitos fortemente associados aos valores vindos da Europa, atribuindo à cachaça a imagem de produto de baixa qualidade, destinada ao consumo das classes menos privilegiadas. Esse cenário muda somente no início na década de 1920, quando a Semana de Arte Moderna resgata os valores e símbolos nacionalistas. Além deste fato, a cachaça sempre esteve presente em momentos marcantes da história brasileira, seja na Revolução Pernambucana, seja na Inconfidência Mineira quando era utilizada como bebida oficial dos brindes (Câmara, 2004).

Nas últimas décadas foram realizadas várias ações e programas para o desenvolvimento do agronegócio da cachaça, tais como: modificação da legislação,

criação de associações de produtores de cachaça de qualidade e investimentos em controle de qualidade, pesquisa e marketing. Estas ações e programas objetivaram valorizar a cachaça, aumentar a aceitação do produto no mercado interno e externo, mudar o *status* da cachaça e transformar uma atividade historicamente informal em outra, voltada para o mercado e para a competitividade (SEBRAE, 2002 e AMPAQ, 2007).

Dentro dessas ações, mudanças na legislação como a criação da Lei nº. 8.918/94, (regulamentada pelos decretos 2.314/97 e 4.851/03), dos decretos nº. 4062/01 e nº. 4072/02 e da Instrução Normativa nº. 13/05 foram imprescindíveis para a proteção, fortalecimento e crescimento da cachaça nos cenários nacional e internacional. Além disso, recentemente, os Estados Unidos reconheceram a cachaça como um produto exclusivamente brasileiro, abrindo o mercado para o produto com o aumento das exportações e representando um grande avanço para o reconhecimento do destilado na Organização Mundial do Comércio (OMC) (MAPA, 2013).

1.2– Legislação e Mercado da Cachaça

Um grupo de especificações dentro de determinados limites ou tolerâncias que devem ser atingidos são denominados de padrões de identidade e qualidade que por sua vez, determinam a qualidade dos produtos. A inexistência destes padrões e a falta de controle de qualidade na produção de aguardente de cana-de-açúcar eram umas das principais barreiras para comercialização desta bebida no mercado externo (Carvalho, 2001). Os decretos 4062/01 e 4072/02 estabelecem a denominação “cachaça” como oficial e exclusiva para a aguardente de cana produzida no Brasil, protegendo a propriedade do nome “cachaça” e contribuindo para a sua divulgação no mercado internacional (Sebrae/Na, 2008). Em junho de 2005 foi publicada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) a Instrução Normativa nº13 que define cachaça, sua composição química e requisitos de qualidade.

Segundo essa legislação, cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % v/v a 48% v/v a 20° C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L,

expressos em sacarose (Brasil, 2005a).

Aguardente de cana se refere à bebida com graduação alcoólica de 38 a 54 % em volume, a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), podendo ser adicionada de até seis gramas por litro de açúcar expressos em sacarose. Quando a adição de açúcar for superior a 6 g e inferior a 30 g por litro, o produto terá sua denominação acrescida da expressão “adoçada” (Brasil, 2005a).

Além disso, a Instrução Normativa nº 13 estabelece o coeficiente de congêneres (limites permitidos para os componentes voláteis, “não álcool”) que são a soma de acidez volátil; aldeídos; ésteres totais; álcoois superiores; furfural + hidroximetilfurfural (Anexo 1). Em junho de 2009 passa a vigorar o Decreto nº 6.871 regulamentando a Lei nº. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), o país tem mais de 5 mil marcas de cachaça e cerca de 30 mil produtores. A cachaça ocupa a terceira posição no ranking mundial de bebidas destiladas. Atualmente o setor de cachaça gera 650 mil empregos diretos e indiretos no país, movimentando cerca de US\$ 1 bilhão por ano. Entre 1970 e 2010, a produção passou de 418 milhões de litros para 1,8 bilhões de litros. A cadeia produtiva de cachaça ainda está focada nas vendas internas, com um consumo médio anual *per capita* em evolução, registrando-se 4,42 L de cachaça em 1970, 8,72 L em 1985 e 12 L em 2008, considerando apenas a população adulta (Abrabe, 2008).

A cachaça vem se firmando como um importante produto do agronegócio brasileiro, sendo produzida em quase todos os estados da federação, destacando-se Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo o último o maior produtor (Coutinho, 2003a). As exportações de cachaça, hoje, estão em torno de 15 milhões de litros com um crescimento médio de 10% ao ano. A cachaça é consumida atualmente em mais de sessenta países, entre eles, alguns que têm sua população como sendo as mais sofisticadas e ricas do mundo. A Figura 1 mostra os principais países de destino da cachaça e caninha exportadas no ano de 2010. (Abrabe, 2010).

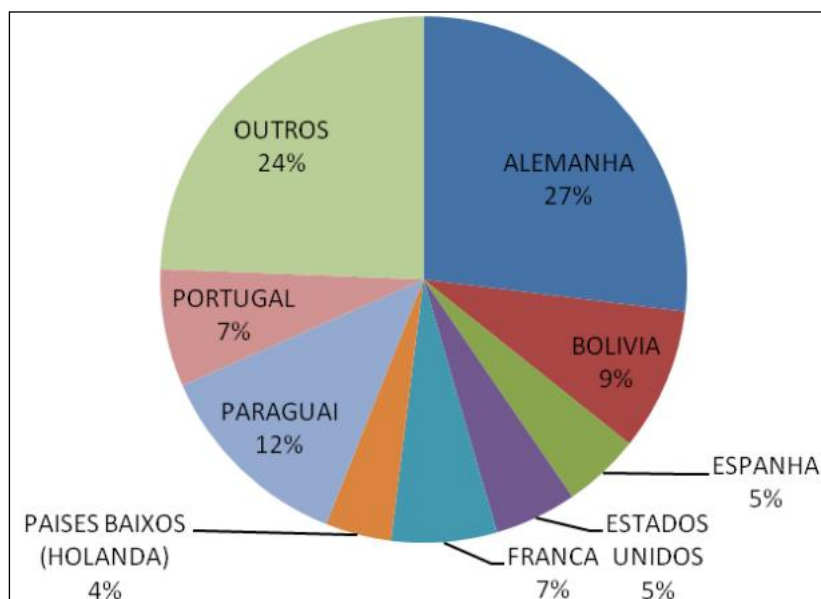


Figura 1 - Principais países de destino (volume) da cachaça brasileira exportadas no ano de 2010, considerando-se a participação do percentual total em volume.

Fonte: Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio – MDIC / Aliceweb NCM 2208.40.00.

Em Minas Gerais a cachaça desempenha importante papel na economia (segundo maior produtor nacional), além da importância histórica e cultural. O estado é líder nacional na produção da cachaça de alambique contendo cerca de 8.500 alambiques, dos quais 500 estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). De acordo com o Sebrae em Minas Gerais, estes estabelecimentos registrados são apenas 15% do total, produzindo 43% das cachaças comercializadas. O estado responde por cerca de 250 milhões de litros da bebida por ano, gerando 116 mil empregos diretos e renda anual de R\$ 1,4 bilhão (Silveira *et al.*, 2010). A participação na produção de cachaça do estado de Minas Gerais, por região, está representada na Tabela 1. Já a exportação da cachaça de alambique concentra-se principalmente na produção mineira (Maia e Campelo, 2005), o volume e destino das exportações de cachaça do estado de Minas Gerais em 2009 estão descritos na Tabela 2.

Um dos melhores preços no mercado internacional é obtido pela cachaça produzida em Minas Gerais, que está associado ao tipo de cachaça produzida no estado, a de alambique (Gonçalves *et al.*, 2008), e por destinar-se em maior quantidade a nichos de mercados mais exigentes. O preço médio por litro da bebida exportada por Minas Gerais (US\$ 4,41) é 306,25 % maior em relação à média nacional (US\$ 1,44), evidenciando assim a agregação de valor devido ao sabor e aroma característicos da cachaça de alambique deste estado. Entretanto, o volume de exportação da cachaça mineira representou apenas 5% do volume total exportado de cachaça pelo Brasil, por estado, no ano de 2010 (Figura 2).

1.3– A cachaça em Salinas (MG)

Salinas está localizada a 650 km de Belo Horizonte, na divisa do Norte de Minas com o Vale do Jequitinhonha. A área é considerada pelo estado como região mineira do nordeste em função das características climáticas e de vegetação, bem como sua realidade socioeconômica, que corresponde à pobreza dos estados nordestinos. O nome do município teve origem na descoberta das ricas jazidas de sal nas margens do rio, hoje o rio Salinas, onde se formou o povoado. No subsolo são encontrados o minério de ferro, cristal de rocha e pedras preciosas.

Tabela 1 – Quantidade de alambiques no Estado de Minas Gerais por região geográfica, demonstrando a importância da cachaça para a economia norte mineira. A somatória da produção das regiões Norte e Jequitinhonha representa quase metade (48,6%) do total produzido no estado.

Mesorregião	Estabelecimentos	%
MINAS GERAIS	8.466	100,0
Norte	2.591	30,6
Jequitinhonha	1.527	18,0
Rio Doce	1.192	14,1
Metropolitana de Belo Horizonte	1.134	13,4
Zona da Mata	804	9,5
Vale do Mucuri	347	4,1
Oeste	219	2,6
Sul-Sudeste	197	2,3
Vertentes	183	2,2
Triângulo Mineiro	136	1,6
Central	114	1,3
Noroeste	22	0,3

Fonte: IBGE (2006)

Tabela 2 – Detalhamento das exportações da cachaça de Minas Gerais em 2009: Volume exportado, percentual, receita e preço praticado por cada país de destino. Destaque para o mercado norte americano com o diferencial do preço pago pela cachaça mineira, reforçando a importância do recente reconhecimento da cachaça como produto exclusivamente brasileiro por esse país.

País	Volume (L)	Porcentagem (%)	Valor (US\$)	Preço litro (US\$)
França	220.342	58,54	479.634,00	2,18
Estados Unidos	106.664	28,34	553.993,00	5,19
Alemanha	26.100	6,93	33.527,00	1,28
Reino Unido	11.220	2,98	49.960,00	4,45
África do Sul	10.800	2,87	71.496,00	6,62
Angola	1.260	0,33	8.498,00	6,74
Total	376.386	100,00	1.197.108,00	

Fonte: Brasil (2010).

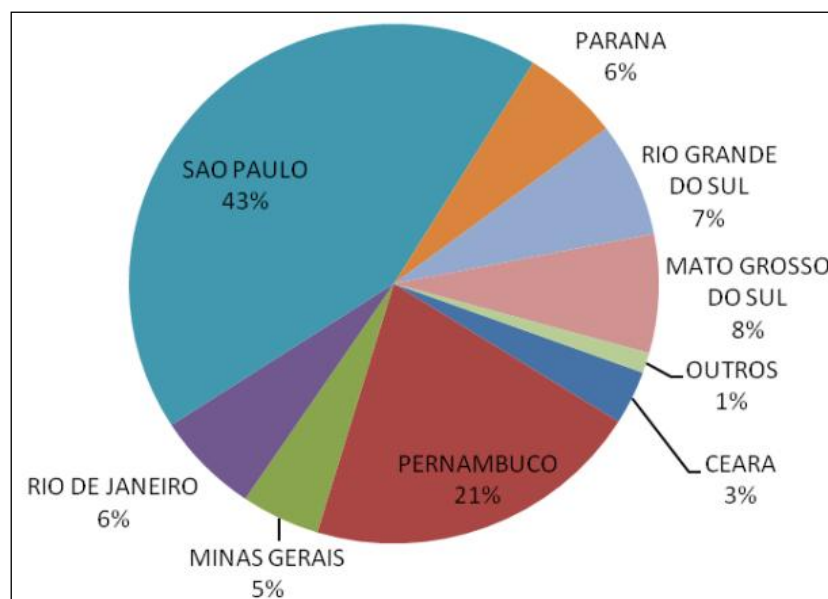


Figura 2 - Participação dos estados brasileiros (em volume) nas exportações de cachaça no ano de 2010. As cachaças industriais produzidas por São Paulo e Pernambuco representam mais da metade (64%) do total exportado, demonstrando que ainda existe uma grande parcela de mercado a ser conquistado pela cachaça artesanal mineira.

Fonte: Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio – MDIC / Aliceweb NCM 2208.40.00.

Salinas figura entre as dez maiores economias do Norte de Minas, levando-se em consideração a sua contribuição na arrecadação de ICMS em toda a mesorregião norte-mineira. A cachaça em Salinas é a segunda atividade econômica do município com participação de 33% em média na economia da cidade. Em 2006, a arrecadação de ICMS do setor de cachaça, em Minas Gerais, foi de 1,494 milhões de reais, desse montante, Salinas arrecadou 693,6 mil reais, ou seja, 46,4%, quase metade do ICMS arrecadado sobre a produção da bebida em todo o território mineiro, demonstrando assim a força da atividade econômica da região. A produção da cachaça na região apresentou uma evolução de 2,8 milhões de litros em 2004 para 6,0 milhões em 2007, gerando entre 1.000 e 1.500 empregos (diretos e indiretos) durante o período de produção, de junho a outubro (Sebrae, 2008).

A cachaça começou a ser produzida no município com a vinda dos primeiros fazendeiros para a região. Ela seguiu os rastros da pecuária, cujos primeiros rebanhos bovinos vieram da Bahia, embora aquela atividade fosse complementar à atividade pecuária. As boas perspectivas para a cachaça de Salinas, tiveram início a partir das décadas de 1940 e 1950. Nesse período, algumas marcas de cachaça começaram a ser produzidas em Salinas, tais como a Piragybana e a Havana, esta fabricada por Anísio Santiago. Estas marcas foram precursoras de outras que, anos depois, vieram a ser produzidas e incentivadas com o lançamento do PROCACHAÇA, pelo governo do estado em 1992 (Oliveira e Ribeiro, 2000). Hoje são mais de cinquenta marcas registradas na Associação de Produtores Artesanais de Cachaça de Salinas (APACS), que tem seus produtos baseados em um processo produtivo voltado para a produção da cachaça de alambique, diferente da bebida produzida em larga escala (industrial ou de coluna).

1.4– Definições de cachaça e processo produtivo

A cachaça de alambique é a cachaça destilada em alambique de cobre, sem a adição de açúcar, corante ou outros ingredientes (Gomes, 2004). O destilado é separado em três frações, “cabeça”, “coração” e “cauda”, sendo que os pontos de corte entre as frações podem variar de acordo com a geometria do alambique e o grau alcoólico inicial do mosto fermentado. Já na aguardente industrial ou cachaça de coluna, o mosto

fermentado é destilado em coluna de destilação contínua, e hidratado para obtenção do teor alcoólico estabelecido por lei (Sebrae, 2001).

A produção da cachaça abrange etapas interdependentes, iniciando-se nos cuidados para o plantio da cana-de-açúcar, de diversas variedades ou cultivares, passando pela obtenção do caldo com auxílio de moendas, seguido de filtração e decantação para a retirada das impurezas e diluído de modo que o teor de sólidos solúveis alcance entre 14-16 °Brix. Em seguida, o caldo é adicionado a dornas de fermentação, com volume normalmente menor que 1.000 litros, contendo o fermento anteriormente preparado, o chamado “pé-de-cuba”, que corresponde a cerca de 20% do volume da dorna. O preparo desse fermento iniciador consiste em uma mistura de caldo de cana não diluído, fubá de milho, farelo de arroz, biscoitos, caldo de laranja ou limão para abaixar o pH e adição diária de caldo recém coletado durante 5 a 7 dias consecutivos (Schwan *et al*, 2001). Após terminada a fermentação do mosto, o caldo é chamado de vinho, que após decantação do fermento será destilado. Durante a destilação, são separadas as frações de cabeça e cauda, onde a cachaça é a fração intermediária chamada de coração (Junior, 2008). O fluxograma básico da produção de cachaça está ilustrado na Figura 3.

A qualidade do produto está diretamente ligada às etapas da cadeia produtiva, sendo a fermentação uma das mais importantes. O processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares fermentáveis e nutrientes presentes no caldo-de-cana, em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários (Figura 4). A população de microorganismos responsável pela fermentação do caldo de cana é constituída normalmente por uma grande diversidade de leveduras e bactérias (Sabate *et al.*, 1998). Estes micro-organismos são capazes de tolerar altas concentrações de açúcares, baixos valores de pH e altas concentrações de etanol (Angelis, 1992; Pataro *et al*, 1998).

Em geral, os alambiques utilizam a fermentação espontânea, onde o “pé-de-cuba” é formado pelos micro-organismos naturalmente presentes nos substratos, assim como aqueles presentes no ambiente e nas superfícies dos utensílios utilizados no seu preparo (Sousa, 2005; Vicente, 2007). Este tipo de fermentação é também utilizada na produção de vinhos na Europa, bem como na produção de diversas bebidas africanas (burukutu, sukete) e de tequila no México (Sanni & Lonner, 1993; Lachance, 1995; Morais *et al.*, 1997; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999).

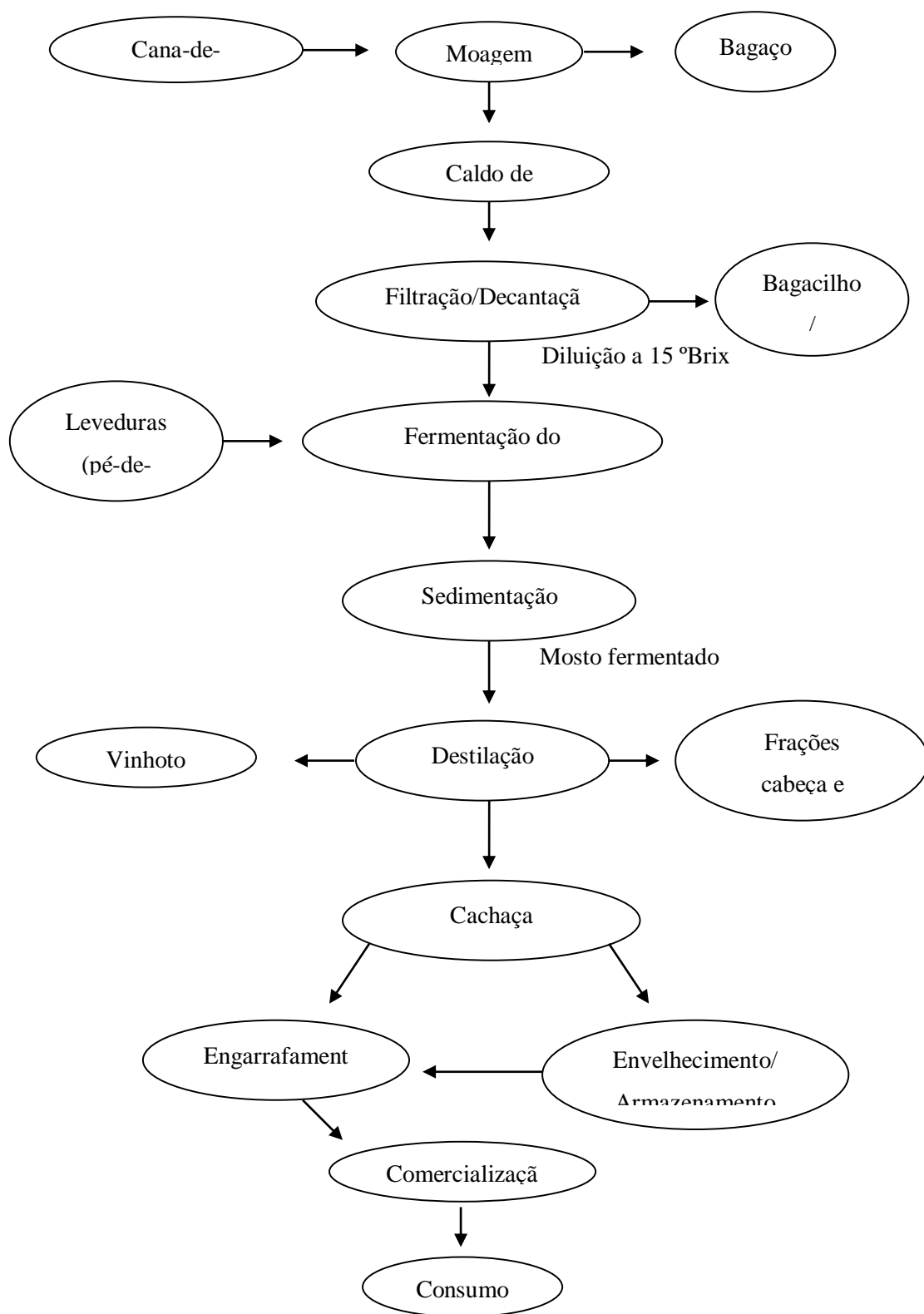


Figura 3 – Fluxograma do processo produtivo da cachaça (Junior, 2008), mostrando as principais etapas (plântio da cana, obtenção do caldo, fermentação e destilação) assim como os produtos/subprodutos oriundos do mesmo.

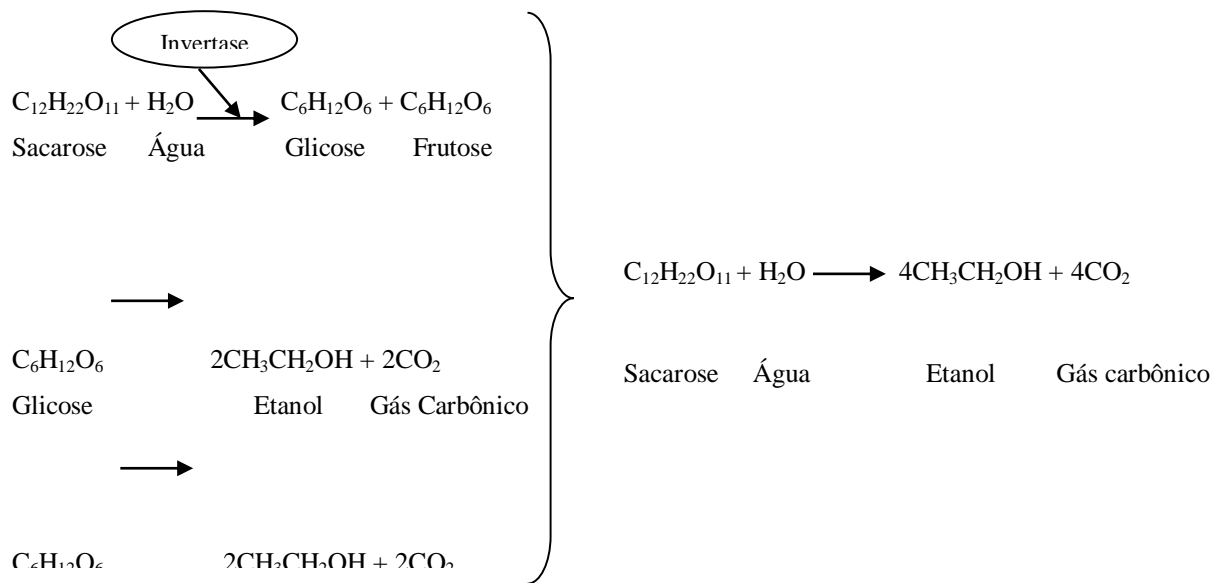


Figura 4 – Metabolização dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* iniciando-se pela glicólise seguida pela fermentação alcoólica. Embora seja um sistema aberto, portanto na presença de oxigênio, a levedura não o utiliza como receptor final de elétrons. Além do etanol e gás carbônico, ocorre ainda a produção de compostos secundários, entre eles aqueles que contribuem para a formação do aroma e sabor da bebida.

Este processo é conduzido predominantemente por leveduras, notadamente *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras apiculadas (principalmente *Kloeckera japonica*) e espécies de *Cândida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* também foram freqüentemente isoladas (Pataro *et al.*, 2000; Schwan *et al.*, 2001). O “pé-de-cuba”, quando sedimentado, corresponde a cerca de 20% do volume útil da dorna de fermentação, e é em média, composto por $3,6 \times 10^9$ UFC/mL (unidade formadora de colônias por mililitro) de leveduras e de $3,6 \times 10^4$ UFC/mL de bactérias (Schwan *et al.*, 2001).

A população de leveduras presente na fermentação espontânea está em constante mudança por se tratar de um processo semi-contínuo e aberto. Como os compostos secundários produzidos pelas leveduras interferem diretamente na qualidade química e sensorial da bebida, pode-se inferir que sua composição varia ao longo de uma mesma safra e entre safras distintas devido à variação dos organismos presentes na dorna (Pataro, 1998 *apud* Vicente, 2007).

A matéria-prima, a fermentação, a destilação e o envelhecimento são fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, porém as leveduras e as condições de fermentação são os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas (Oliveira, 2001). Uma alternativa para a padronização das características sensoriais da cachaça é o uso de cepas de leveduras selecionadas. O laboratório de biologia celular e molecular (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) desenvolveu uma metodologia para seleção de leveduras bem adaptadas ao processo de produção de cachaça e potencialmente produtoras de maiores níveis de compostos voláteis aromatizantes, importantes para o “bouquet” da bebida.

A metodologia desenvolvida para o isolamento de cepas de leveduras apresentando características para a produção de uma cachaça de qualidade (Vicente *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008) baseia-se nos parâmetros: produção baixa ou nula de H₂S; floculação positiva, alta capacidade fermentativa, tolerância a altas concentrações de etanol e açúcares, altas temperaturas e resistência a drogas.

O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de cachaça tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente em relação aos teores de acidez e concentrações de álcoois superiores (Pataro *et al.*, 2002). Além destas propriedades, estas cepas selecionadas possuem maior tolerância ao etanol e à temperaturas mais elevadas, assim

como resistência a altas concentrações de açúcar e também a capacidade de flocular, o que torna mais dinâmico o processo de separação do mosto e das cepas ao fim da fermentação (Vicente *et al.*, 2006).

Em muitos países a maior parte da produção de vinho, utiliza leveduras selecionadas, e em alguns casos bactérias lácticas selecionadas, obtendo-se assim um produto de melhor qualidade (Fleet *et al.*, 1984). Vilanova & Sieiro (2006) concluíram que o uso de cepas de leveduras selecionadas para a produção do vinho contribui para a sua qualidade, já que o aroma é um dos mais importantes determinantes da qualidade. Estudando os efeitos do uso de leveduras selecionadas na produção de cachaça, Souza *et al.* (2012) verificaram a melhora na qualidade da cachaça devido ao aumento nas concentrações de álcoois superiores (álcool isoamílico) e ésteres (ocatnoato e decanoato de etila) em comparação com cachaças comerciais.

Acredita-se que o uso de leveduras localmente selecionadas seja mais eficaz, já que estão mais bem adaptadas às condições ambientais da região e podem garantir o controle adequado da fermentação alcoólica e preservar os efeitos positivos das leveduras autóctones (Campos, *et al.* 2010). As leveduras devem apresentar características desejáveis como: serem viáveis para a produção industrial, além de apresentarem baixa produção de acidez volátil e alta tolerância a etanol, capacidade de fermentarem totalmente os açúcares do meio, boa velocidade de fermentação para minimizar riscos de contaminação, baixa produção de sulfeto de hidrogênio, produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis (Regodon *et al.*, 1997; Oliveira, 2001).

Carvalho (2004) testou a capacidade fermentativa de uma levedura selecionada (CA116) em co-incubação com *Lactococcus lactis* nas fermentações em frascos e dornas. Em geral, a cepa CA116 reprimiu o crescimento da *L. lactis* durante a co-incubação, porém, a presença da bactéria não contribuiu e nem interferiu na qualidade da bebida final produzida. Sousa (2005) avaliando a interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal, verificou que o crescimento da levedura não foi influenciado pela co-incubação com a bactéria láctica, assim como não contribuiu para a redução do pH, mas interferiu negativamente na qualidade sensorial da cachaça.

Thomas *et al.* (2001), encontraram que bactérias e leveduras quando inoculadas

ao mesmo tempo e na concentração de 1.10^7 células/mL, acarretam a redução da população bacteriana em 94%, enquanto o crescimento de leveduras não sofreu alterações. Campos *et al.* (2010) constataram a dominância e persistência de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas sobre leveduras não-*Saccharomyces* e bactérias. Estes mesmos autores afirmam ainda que a persistência de cepas de leveduras selecionadas em fermentação de cana-de-açúcar cria condições ambientais que previne ou reduz a contaminação bacteriana.

1.5– Contaminação da fermentação

Os micro-organismos do ar e do solo que aderem à cana-de-açúcar, bem como os micro-organismos epífitos da planta e os presentes no local de produção da bebida constituem a potencial carga microbiana contaminante do processo de produção de cachaça de alambique. Aliado à deficiência do tratamento de descontaminação do caldo, sabe-se que tanto o caldo de cana quanto o mosto são bons substratos para o crescimento de micro-organismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH e temperatura (Oliveira-Freguglia & Horii, 1998; Cherubin, 2003; Nascimento, 2007).

Níveis elevados de contaminação microbiana podem ser prejudiciais à produção de álcool (Nobre, 2005). Isso pode ocorrer tanto por competição pelo consumo de açúcares, quanto por diminuição da viabilidade das leveduras, devido à produção de toxinas e/ou acidificação do meio. O consumo de sacarose pelas bactérias também ocasiona formação de ácidos orgânicos, especialmente ácido lático e ácido acético, que causam a acidificação (Ludwig *et al.*, 2001; Nobre, 2005; Sousa, 2005; Carvalho-Netto *et al.*, 2008).

Apesar de ser óbvio que a utilização de uma molécula de açúcar pela bactéria acarreta em perda de duas moléculas de etanol, a correlação entre contaminação bacteriana e perda alcoólica ainda precisa ser determinada. Isso deve-se pelo fato da bactéria heterofermentativa produzir ácido lático, CO₂, etanol, além de quantidades menores de glicerol e ácido acético (Narendranath *et al.*, 1997).

Os teores de contaminação bacteriana capazes de afetar o rendimento alcoólico ainda são controversos na literatura. Makanjoula *et al.*, (1992) constataram que uma

contagem de bactérias de $4,5 \times 10^8$ UFC/mL resultou em uma redução de 17% no rendimento alcoólico. Thomas *et al.* (2001) encontraram perdas na produção de etanol de até 22% com níveis de contaminação por bactérias lácticas de 10^7 UFC/mL. Entretanto, Cherubin (2003) constatou que não houve relação entre contaminação bacteriana e rendimento fermentativo. Bayrock e Ingledew (2005) relatam que níveis de *L. paracasei* de $3,7 \times 10^5$ UFC/mL não afetou a viabilidade de *S. cerevisiae* e, ainda, produziu 18% a mais de etanol quando comparado ao processo sem a bactéria.

Além do fator rendimento alcoólico, a contaminação também pode causar a floculação do fermento, que reduziria a produtividade da fermentação, devido ao menor contato entre células e mosto (Ludwig *et al.*, 2001; Nobre, 2005; Sousa, 2005). Apesar da floculação ser desfavorável no processo fermentativo, alguns estudos mostram que é desejável por facilitar a decantação do fermento após o ciclo fermentativo, e consequentemente, a sua separação do mosto fermentado (Vicente *et al.*, 2006).

Por outro lado, a presença de certos contaminantes, tanto leveduras quanto bactérias, está relacionada com a produção de congêneres secundários que contribuem de forma benéfica para a qualidade da bebida, uma vez que esses compostos, quando em proporções equilibradas, são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (Schwan, *et al.*, 2001), o chamado “bouquet”.

Os gêneros bacterianos mais frequentemente associados a tais contaminações são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Acetobacter* e *Streptococcus* (Gallo, 1992; Stroppa *et al.*, 1998; Schwan *et al.*, 2001). Dentre essas bactérias, Schwan *et al.* (2001) afirmam que as bactérias lácticas podem representar 71% dos isolados gram positivo em processos de produção de cachaça. Neste mesmo sentido, Carvalho-Neto *et al.* (2008), caracterizando a comunidade bacteriana da produção de cachaça, constataram a predominância de 66% do gênero *Lactobacillus*. Gomes *et al.* (2010) determinando a frequência de isolamento de bactérias lácticas em processo fermentativo de cachaça, encontraram predominância de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*.

1.6 – Bactérias Ácido-Lácticas

Muitos micro-organismos isolados e caracterizados durante o último século têm recebido atenção considerável de indústrias de bebidas e alimentos fermentados e da

indústria farmacêutica. As bactérias ácido-láticas (BAL) são tradicionalmente usadas nessas indústrias, desempenhando papel essencial principalmente na produção de vinhos (Davis, *et al.* 1985) e de derivados lácteos fermentados (Garabal, 2007).

O grupo das BAL compreende 13 gêneros de bactérias Gram-positivo (Jay *et al.*, 2005): *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. As BAL são naturalmente encontradas em habitats nutritivos, como vegetais, grãos, leite, carne e seus derivados, constituindo ainda a microbiota dos tratos gastrintestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais. Essas bactérias são classificadas morfológicamente como bastonetes ou cocos não esporulados, podendo ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maioria delas é inativada a temperaturas superiores a 70°C e utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono (Salminen e Von Wright, 1993).

Tradicionalmente, a identificação das BAL isoladas a partir de alimentos é baseada no crescimento destas em meios de cultura seletivos, e identificação baseada em critérios bioquímicos e fisiológicos. Entretanto essa metodologia não permite a distinção exata entre espécies ou linhagens, pois geralmente requer a determinação de propriedades bacterianas além daquelas abordadas pelos testes fermentativos (Tannock *et al.*, 1999).

A aplicação de técnicas de biologia molecular, em particular aquelas que envolvem a amplificação de genes específicos por intermédio de reação de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR), tem se destacado nos últimos anos. As variações observadas na seqüência e comprimento da região espaçadora entre as subunidades ribossomais 16S-23S do DNA ribossomal (rDNA) são utilizadas para identificação de espécies de micro-organismos (Gurtler e Stanisich, 1996). Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de micro-organismos, porém, bastante conservada em micro-organismos da mesma espécie, sendo então, utilizada em pesquisas de identificação microbiana, no nível molecular (Tannock *et al.*, 1999).

Um método específico e reprodutível para a identificação de espécies e linhagens de BAL seria a amplificação por PCR da região do 16S-23S e posterior

restrição com endonucleases específicas (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - ARDRA). Este método tem se mostrado mais rápido, fácil e preciso para identificação dessas bactérias em comparação com as metodologias baseadas no perfil de assimilação de carboidratos (Moreira *et al.*, 2005).

Outra metodologia amplamente utilizada em estudos filogenéticos, taxonômicos e ecológicos para a identificação de espécies bacterianas é o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA). Esse gene é universalmente distribuído e pouco alterado ao longo do processo de evolução das espécies, tornando-o um alvo ideal para estudos de identificação (Madigan *et al.*, 2010). A identificação das bactérias lácticas pode ser feita utilizando-se a análise de restrição e confirmada através do sequenciamento com maior fidedignidade.

1.7 – Metabolismo das bactérias lácticas

As bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, podem ser divididas em três grupos quanto ao metabolismo fermentativo: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios. As homofermentativas usam a via glicolítica e convertem as hexoses (1 mol) em duas trioses fosfato (3C), convertidas em ácido láctico (2 moles) e ATP (2 moles). As heterofermentativas produzem quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP.

Já os heterofermentativos facultativos são capazes de fermentar hexoses de forma semelhante aos homofermentativos. Entretanto sob condições limitantes de glicose algumas espécies podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol (Kandler, 1983; Gomes, 2009). Na Figura 5 pode ser visto um esquema ilustrando as vias do metabolismo fermentativo.

A via das pentoses ou a via das hexoses monofostato são as mais comuns para formação de piruvato e lactato. Liu (2003), em revisão sobre o metabolismo das bactérias lácticas, afirma que estas são capazes de utilizar polióis (ribitol e xylitol, manitol e sorbitol), ácidos orgânicos (malato, citrato, tartarato e fumarato) e aminoácidos (serina, alanina e aspartato) para produzir piruvato e/ou lactato.

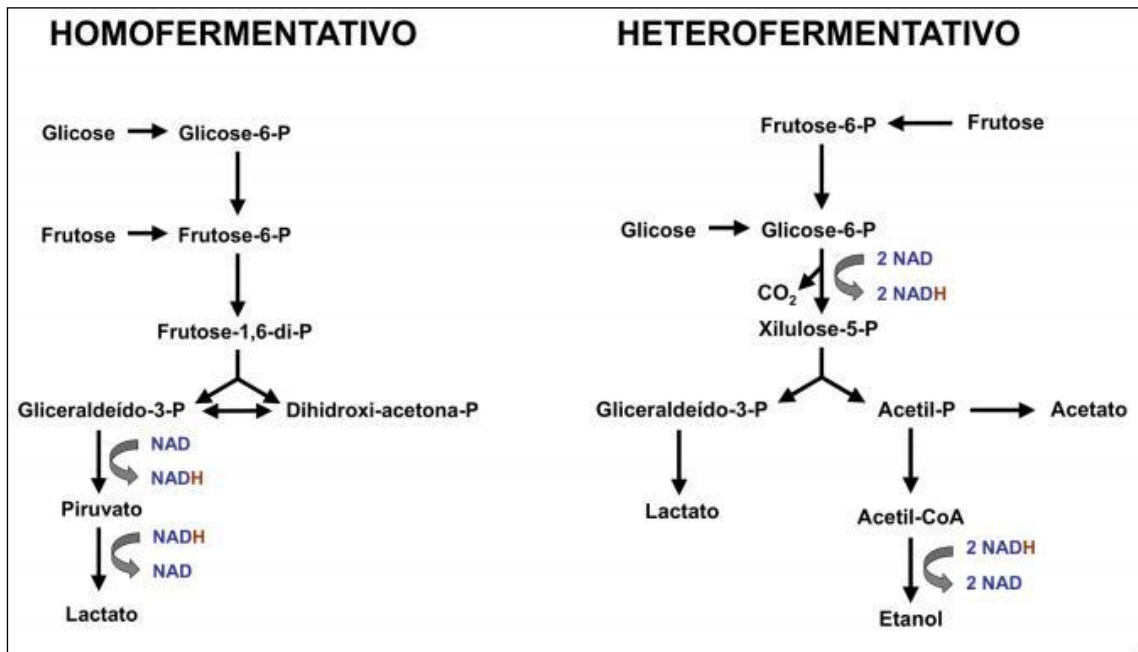


Figura 5 – Esquema simplificado das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* (Gomes, 2009). As bactérias homofermentativas utilizam os carboidratos presentes no meio para produção exclusivamente de lactato, enquanto que as heterofermentativas ao utilizarem a glicose fosforilada, produzem gás carbônico, sendo transformada em uma pentose a qual pode gerar, além de lactato, acetato e etanol.

No mosto do caldo de cana-de-açúcar, a presença dessas bactérias é devido à sua resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. Isso faz com que, ao final da fermentação, as bactérias lácticas possam produzir compostos secundários que irão aumentar os níveis de acidez da cachaça (Pataro *et al.*, 2002).

Segundo Nascimento (2007), durante a fermentação láctica, as bactérias lácticas utilizam substratos que não são fermentados pelas leveduras, como dextranas residuais e pentoses, sendo que tal fermentação não afeta o rendimento do destilado.

Entretanto, destiladores de uísque utilizam a fermentação láctica tardia visando, principalmente, um possível efeito benéfico no sabor e aroma da bebida, mas detalhes precisos deste processo são desconhecidos. A formação de ácidos láctico e acético e de outros metabólitos podem interferir no aroma e sabor do destilado (Van beek & Priest, 2002). Gueddes e Riffkin (1989) realizando estudos em destilarias de uísque consideraram que a fermentação láctica realizada por bactérias contaminantes contribuiu de forma positiva para o aroma e o sabor final da bebida. Entretanto, os parâmetros dessa contribuição não são conhecidos.

Ainda sobre a utilização de bactérias lácticas na fermentação, elas podem ser inoculadas no início, durante ou após a fermentação alcoólica em vinhos (Fugelsang e Zoecklein, 1993). Trabalhos indicam que o inóculo no início da fermentação pode acarretar em antagonismo com as leveduras e produção de compostos indesejáveis (Huang *et al.* 1996). Entretanto outros autores afirmam que não possui efeito sobre a fermentação alcoólica (Edwards *et al.* 1990) e, ainda, que problemas como acidez volátil excessiva e fermentação alcoólica lenta são mais provavelmente devido a incompatibilidade entre cepas específicas de leveduras e algumas bactérias lácticas (Semon *et al.* 2001).

As bactérias lácticas possuem um importante papel na produção de vinhos, onde são responsáveis pela fermentação maloláctica, uma fermentação secundária que reduz a acidez e influencia no aroma e sabor dos vinhos (Liu, 2002). Neste processo, as bactérias lácticas realizam a bioconversão do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, resultando em diminuição da acidez titulável, pequeno aumento do pH, e mudanças no sabor da bebida devido à troca do forte sabor vegetal do ácido málico pelo paladar mais suave do ácido láctico. A fermentação maloláctica não é realmente um processo fermentativo, mas sim uma reação de descarboxilação, pois neste processo o

ácido málico, um ácido dicarboxílico, é convertido a dióxido de carbono e ácido lático, um ácido monocarboxílico. É realizada por bactérias ácido lácticas, preferencialmente *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel, 1999; Nielsen & Richelieu, 1999; Liu, 2002; Ruiz *et al.*, 2010).

Segundo Liu (2002), a complexidade e diversidade da atividade metabólica das bactérias lácticas sugerem que a fermentação malolática pode afetar a qualidade do vinho tanto positiva quanto negativamente. Davis *et al.*, 1985 (citados por Maicas *et al.*, 1999) estudaram o uso de diferentes cepas de bactérias lácticas na produção de vinho e encontraram diferenças no efeito sensorial causado por elas, sendo que algumas produziram compostos voláteis que contribuíram para o aroma do vinho, enquanto outras não contribuíram para o “flavour” da bebida.

A utilização de cepas comerciais de BAL permite um maior controle sobre a fermentação malolática (Maicas *et al.*, 1999; Nielsen & Richelieu, 1999). Henick-Kling, 1985 (citado por Maicas *et al.*, 1999) analisando por cromatografia gasosa vinhos produzidos com e sem fermentação malolática, encontra que vinhos produzidos com cepas selecionadas de bactérias lácticas possuem “flavour” melhores do que aqueles produzidos por fermentação espontânea. Porém, poucas cepas comerciais de bactérias lácticas obtiveram sucesso ao serem utilizadas como culturas iniciadoras no processo de fermentação malolática (Pozo-Bayon *et al.*, 2005).

Maicas *et al.* (1999), estudando a adição controlada de bactérias lácticas, comprovaram que estas aumentam os níveis de ésteres, alcoóis superiores e ácidos, elevando os atributos sensoriais e a qualidade dos vinhos que passam por essa fermentação. Ugliano e Moio (2005) observaram aumento nos níveis de vários ésteres importantes em vinhos sob fermentação malolática, testando quatro cepas comerciais de *Oenococcus oeni*.

1.8 – Ésteres

As principais substâncias responsáveis pela formação do sabor e aroma da cachaça são os compostos secundários (tais como álcoois superiores, ésteres, ácidos carboxílicos e compostos carbonílicos), caracterizando a bebida sensorialmente. Entre esses compostos, os ésteres são geralmente substâncias de odores agradáveis e baixos

limiares de percepção, que constituem importante fração de compostos orgânicos responsáveis pelo sabor e aroma de diversas frutas e flores (Hart e Schuetz, 1983).

Os ésteres, juntamente com os alcoóis superiores, são os maiores grupos de compostos voláteis das bebidas alcoólicas. Existem dois principais grupos de ésteres de importância em bebidas. O primeiro grupo contém os ésteres de acetato (originados de ácido acético e etanol ou um álcool complexo derivado do metabolismo de um aminoácido) como acetato de etila, acetato de isoamila e fenil etil acetato. O segundo grupo contém os ésteres etílicos (originados de etanol e um ácido graxo de cadeia média) como hexanoato de etila, octanoato de etila e lactato de etila (Saerens, *et al.* 2008).

Os ésteres são produzidos durante a fermentação em decorrência do metabolismo secundário dos açúcares. Estes ésteres são formados por reações enzimáticas entre ácidos ativados sob a forma de acetil-SCoA e alcoóis correspondentes (Peddie, 1990; Lambrechts & Pretorius, 2000; Nóbrega, 2003). Os mais abundantes tendem a ser aqueles derivados dos ácidos e dos alcoóis mais presentes no meio onde ocorre a fermentação (Nóbrega, 2003).

A concentração dos ésteres etílicos de ácidos graxos depende de vários fatores, sendo que os principais são a cepa de levedura, a temperatura da fermentação, aeração e conteúdo de açúcares no mosto (Perestrello, *et al.* 2006). Estudando a influência de parâmetros fermentativos sobre os níveis de ésteres etílicos, Saerens, *et al.* (2008) constataram que o aumento na fonte de carbono (maltose) interfere na concentração dos mesmos (reduzindo a concentração de hexanoato de etila) e que o aumento na fonte de nitrogênio no meio (até 150 mg/L) acarreta em aumento nos ésteres octanoato e decanoato de etila.

Os ésteres etílicos de ácidos graxos e ésteres de acetato são considerados os mais importantes em bebidas por possuírem aroma agradável, limiares de percepção relativamente baixos e concentrações relativamente elevadas (Nóbrega, 2003). Segundo Nascimento (2007), os ésteres de acetato são os compostos presentes em maior concentração seguidos pelos etílicos derivados dos ácidos graxos, e são descritos como os responsáveis pelo aroma frutado do vinho. No entanto, Etiévant 1991 (citado por Nascimento, 2007) diz que o acetato de etila não contribui com o odor em concentrações abaixo de 75 mg/L e quando presente em teores acima de 200 mg/L um

efeito desagradável no aroma é observado.

Dentre os ésteres etílicos de ácidos graxos, o lactato de etila é formado durante a fermentação por leveduras e pela etanolise da acetilCoA formada durante a síntese ou degradação dos ácidos graxos (Perestrelo *et al.*, 2006). O lactato de etila é um importante éster orgânico, biodegradável com excelentes propriedades de solvente e baixa toxicidade e candidato a substituir muitos solventes halogenados. Esse éster é usado em alimentos, perfumaria, produtos químicos e como solventes (Tanaka *et al.*, 2002).

O lactato de etila confere características odoríferas de “láctico” e “framboesa” aos vinhos, contribuindo para propriedades sensoriais “frutado” e “floral” dos mesmos (Li *et al.*, 2008). Trabalhos com vinhos que passaram pela fermentação maloláctica relatam o aumento de 15 a 20 vezes nos níveis de lactato de etila. Esse aumento pode explicar, pelo menos em parte, as mudanças do aroma frutado de vinhos Tannat demonstrado pela análise sensorial, melhorando a qualidade da bebida (Lloret *et al.*, 2002). Maicas *et al.* (1999) e Ugliano e Moio (2005) também relatam elevados incrementos nos níveis de lactato de etila em vinhos que passaram pela ação de bactérias lácticas.

A presença do lactato de etila na aguardente de cana está relacionada com a contaminação do mosto por bactérias (*Lactobacillus* spp) e é o segundo éster mais abundante em aguardente de cana, com 36,2% da concentração total de ésteres, sendo o acetato de etila o mais presente (Nascimento, 2008). Em seu trabalho, Nascimento (2008) encontrou 9 (nove) amostras que apresentaram valores acima do permitido pela legislação brasileira, das quais 4 (quatro) foram devido à presença de lactato de etila em concentração elevada. O autor recomenda sua monitoração, juntamente com o acetato de etila, para assim evitar-se subestimar a presença de ésteres totais na bebida, já que em nenhuma das metodologias cromatográficas sugeridas pelo MAPA isso ocorre.

De acordo com Geddes e Riffkin (1989) a formação de lactato de etila influencia diminuindo a produção de acetaldeído (substância de alguma forma relacionada com as dores de cabeça após a ingestão de bebidas alcoólicas) e a formação de acetato de etila. Nascimento (2008) confirma a tendência da redução de acetaldeído ao relacionar as concentrações de ambos ésteres nas amostras analisadas, mas não conseguiu comprovar a influência sobre o acetato de etila.

Considerando todos os aspectos anteriormente aludidos, este trabalho tem como objetivo verificar se as bactérias lácticas presentes na fermentação do caldo de cana-de-açúcar para a fabricação de cachaça, quando utilizadas em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, influenciam o desempenho da fermentação e a qualidade físico-química e sensorial das bebidas produzidas.

2 – JUSTIFICATIVA

Existem ainda poucos trabalhos na literatura descrevendo o efeito de bactérias lácticas durante o processo fermentativo e suas contribuições benéficas quanto a características físico-químicas e sensoriais da cachaça de alambique. Desta maneira, considerando a importância econômica da produção de cachaça que ganhou destaque nos últimos anos no mercado externo, e a importância dada ao lactato de etila por esse mesmo mercado, juntamente com a limitada disponibilidade de informação científica sobre o efeito das bactérias lácticas na fermentação, o trabalho justifica-se como um importante passo para tentar elucidar a influência de bactérias lácticas e do éster em estudo na qualidade do produto final.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Geral

Avaliar a influência de bactérias lácticas isoladas da região de Salinas/MG, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na qualidade físico-química e sensorial de cachaças.

3.2 – Específicos

- a) Realizar fermentações em escala piloto avaliando-se o perfil de bactérias totais e lácticas e comparando-o com os níveis de lactato de etila nas cachaças correspondentes;
- b) Isolar e caracterizar molecularmente bactérias lácticas do mosto fermentativo de produtores da região de Salinas/MG;
- c) Realizar fermentações consorciadas em escala piloto com bactérias lácticas isoladas dos produtores juntamente com leveduras isoladas da região, acompanhando os parâmetros fermentativos como °Brix, acidez total e grau alcoólico;
- d) Determinar os parâmetros físico-químicos das cachaças produzidas nas fermentações consorciadas, bem como testes de aceitação do produto final.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Cepas de micro-organismos utilizadas

Para os experimentos de fermentação em escala piloto foram utilizadas 15 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de diferentes produtores da micro-região de Salinas/MG (Anexo 2) e selecionadas visando a produção de uma cachaça de qualidade superior (Vicente *et al.*, 2006). As cepas de bactérias lácticas utilizadas neste trabalho foram isoladas de cinco destilarias da micro-região de Salinas (MG), alvo de estudo de caracterização molecular e, após testes de crescimento, viabilidade e produção de lactato de etila em laboratório (Carvalho, 2011), foi escolhida uma cepa (bLBCM 680-2) para o experimento de fermentações consorciadas com a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 680.

4.2 – Manutenção dos micro-organismos

As cepas de leveduras foram mantidas em Meio YP dextrose 2% (p/v) acrescido de glicerol 10% (p/v) e estocadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em criotubos estéreis. Já as cepas de bactérias lácticas foram mantidas em Meio MRS acrescido de glicerol 30% (p/v) e estocadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em criotubos estéreis.

4.3 – Meios de cultura

4.3.1 Meio YPD2%

O meio YPD2% (Yeast Extract Peptone Dextrose 2%) foi utilizado para multiplicação das cepas de leveduras e é composto por extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 2% (p/v) como fonte de carbono, e água destilada. Para o meio sólido Agar 2% (p/v) foi utilizado.

4.3.2 – Meio MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)

Meio MRS (Acumedia) foi utilizado para isolamento de bactérias lácticas conforme recomendado pelo fabricante (5,515% p/v do meio MRS e água destilada). Para o meio sólido Agar 1,5% (p/v) foi utilizado. Como o isolamento foi feito de dornas de fermentação o meio MRS foi suplementado com Cicloheximida (Gomes *et al.*, 2010).

4.3.3 – Meio YM (*Malt Extract Agar*) pH 3,5

O meio YM (Difco) foi usado para isolamento de leveduras totais conforme recomendação do fabricante (3,36% do meio, 2,0 % de ágar e água destilada) e pH a 3,5 com ácido láctico 10% ou ácido tartárico 10% (Schwan *et al.*, 2001).

4.3.4 – Meio SCY (*Saccharomyces cerevisiae yeasts*) Agar pH 3,5

O meio SCY foi utilizado para enumeração de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, sendo composto por: Caldo de cana-de-açúcar 10% v/v, 0,1% Extrato de levedura, 2,5 a 3,0% Agar w/v e Cloranfenicol 10 mg/L, com o pH ajustado a 3,5 (Schwan *et al.*, 2001).

4.3.5 – Agar diferencial (*WL Nutrient Agar + Cicloheximida*)

O meio WL (Difco) foi usado para contagem de bactérias totais conforme recomendação do fabricante (8,0% do meio e água destilada), ajustado o pH para 6,5 com carbonato de sódio 1% e suplementado com cicloheximida após autoclavagem (Schwan *et al.*, 2001).

4.3.6 – Meio Caldo de Cana (MCC)

O meio MCC é um meio utilizado para adaptação dos micro-organismos (leveduras e bactérias) ao meio da fermentação do caldo de cana, sendo composto por: Caldo de cana-de-açúcar diluído a 5 °Brix suplementado com Extrato de leveduras (10 g/L) e Peptona bacteriológica (5 g/L).

4.4 – Fermentação em escala piloto das leveduras selecionadas

Foram realizadas fermentações em escala piloto (dornas inox de 50L) com 15 cepas de leveduras selecionadas de produtores da região de Salinas/MG (Anexo 2), totalizando 10 destilações de cada cepa, no período de Agosto a Novembro de 2009. Estas cepas foram selecionadas pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), no ano de 2008, segundo metodologia de Vicente *et al.*, (2006) e Oliveira *et al.*, (2008). As fermentações foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – *Campus* Salinas.

4.4.1 – Preparo do Inóculo

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30 °C durante 48 horas. Após este período, as leveduras foram inoculadas em 5 mL de meio YPD 2% incubadas a 28 °C por 24 horas, sob agitação a 200 rpm (Incubador rotatório *New Brunswick* Model G25). Após esse período, a alíquota foi inoculada em 20 mL de meio YPD 2% incubado a 28 °C por 24 horas, sob agitação. Esta alíquota foi transferida para 100 mL de meio YPD 2% incubado a 28 °C por 24 horas, sendo então transferido para 1000 mL de caldo de cana previamente esterilizado, diluído a 5 °Brix, extrato de levedura a 1% e incubado a 28 °C por 24 horas sob agitação. Foi realizada esta etapa até que obtivesse células suficientes para iniciar a propagação das leveduras

4.4.2 – Propagação das cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*

A multiplicação das leveduras foi realizada em baldes plásticos rigorosamente higienizados, utilizando caldo de cana estéril diluído a 5 °Brix, extrato de levedura a 1% e aeração constante através de compressor de ar (*BIG AIR* modelo A420) com capacidade de bombeamento de 4,5 litros de ar/minuto. Retirava-se o vinho depois de ter sido observado que o teor de sólidos solúveis totais atingira zero (em °Brix) sendo repetida a etapa de abastecimento até que se obtivesse células suficientes (2,0 L de biomassa/dorna com 10⁹ células/mL) para iniciar o processo fermentativo. Esta pré-

cultura foi inoculada em dornas de aço inox com capacidade para 50 litros.

4.4.3 - *Cana-de-açúcar*

A cana-de-açúcar utilizada no projeto foi da variedade ciclo médio RB – 791011 no primeiro ciclo de produção, cultivada na Fazenda Santa Isabel do IFNMG – *Campus Salinas*. Após o recebimento da cana retirava-se o excesso de palha, cortava-se as pontas e locais onde havia a presença de brocas, era então lavada para remover sujidades e moída no máximo 24 horas após o corte. Até a hora da moagem, a cana era armazenada em local sombreado. O caldo foi extraído em um terno de moenda com dimensões de 9” x 9” e filtrado em tecido fino sobre peneira de aço inoxidável para remoção de resíduos da moagem (bagacilhos). Após a filtração, o caldo de cana foi diluído a 15 °Brix com água estéril, dentro da sala de fermentação.

4.4.4 – *Início do processo fermentativo*

O processo fermentativo em dornas de escala piloto inicia-se com a formação do pé de cuba, que representa 20% do volume útil da dorna de fermentação. O abastecimento com caldo de cana foi gradativo em relação ao volume (de 4 em 4 litros) e ao teor do Brix (de 2 em 2 graus, iniciando-se com 7 °brix), totalizando um volume final de 20 L, deixando-se em repouso por 24 horas. Este processo tem por finalidade a adaptação das células a um meio com alta osmolaridade, aptas para o processo fermentativo. Após este período foi retirado 10 litros do volume final e o restante é denominado pé de cuba.

O volume útil da dorna utilizada foi de 40 L, sendo 10 L constituído do pé de cuba e 30 L de caldo de cana recém colhido, diluído a 15 °Brix. Os parâmetros fermentativos avaliados foram acompanhados diariamente sendo eles: consumo dos sólidos em solução, acidez total do vinho e teor alcoólico do vinho. Ao término da primeira fermentação retirou-se 30 L de vinho que foi levado para destilação, procedendo-se a novo abastecimento com 30 litros de caldo. Este experimento foi realizado durante 10 dias consecutivos no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – *Campus Salinas* em Salinas, Minas Gerais.

4.4.5 - Fermentação

O abastecimento das dornas foi realizado gradativamente em um total de três abastecimentos, de 10 litros de caldo a 15 °Brix cada um, totalizando um volume final de 40 litros. Após cada abastecimento, media-se o teor de sólidos solúveis, sendo acompanhado até chegar a 3 °Brix, quando então a dorna era reabastecida com mais 10 litros de caldo a 15 °Brix. Este processo se repetiu até completar o volume útil da dorna (40 litros), quando então deixava-se em repouso até o teor de sólidos solúveis chegar a zero. O vinho era então encaminhado para destilação, permanecendo nas dornas um volume de cerca de 20% de inóculo (10 litros de pé de cuba) dando início ao reabastecimento das dornas.

4.4.6 - Destilação em alambique de cobre

O mosto fermentado (vinho) e após decantação para remoção das leveduras, foi analisado quanto à acidez do vinho e grau alcoólico. A seguir foi encaminhado à destilação em um alambique de cobre com capacidade de 40 litros, aquecido e mantido a temperatura interna em torno de 90°C visualizado por um termômetro. O destilado total foi fracionado em três partes (usando a fórmula abaixo): a primeira (5 % que correspondem à fração “cabeça”) e a última (15% que correspondem à fração “cauda”) foram descartados; a parte intermediária (80% que correspondem à fração “coração”) acondicionada em garrafas de vidro para as análises físico-químicas e teste de aceitação do produto final.

$$VD = \frac{TAV \times VV}{TAC} \text{ onde:}$$

VD: Volume total de destilado (L);

TAV: Teor alcoólico do vinho (% v/v);

VV: Volume do vinho (L);

TAC: Teor alcoólico da cachaça (G.L.).

4.5 – Parâmetros fermentativos avaliados.

A taxa de consumo de sólidos solúveis (°Brix/hora) foi mensurada em refratômetro eletrônico portátil, com compensação automática de temperatura. A cada abastecimento das dornas realizava-se a leitura do °Brix e do horário, quando o °Brix da dorna chegava a três anotava-se novamente o horário para então calcular a taxa de consumo.

O teor alcoólico (°GL) do vinho foi medido através de ebulliômetro, relacionando a quantidade de álcool presente no vinho e sua temperatura de ebulição. A leitura do teor alcoólico, foi feita numa régua previamente calibrada para a pressão atmosférica local, que corresponde diretamente ao teor alcoólico em mL de etanol.100mL⁻¹ de vinho (°GL) segundo ABNT (1997a). A acidez total do mosto foi realizada através de método titulométrico com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, segundo ABNT (1997b).

Realizou-se também coletas para análises microbiológicas do mosto fermentativo: contagem de leveduras totais – Meio YM; leveduras *Saccharomyces* – Meio SCY; de bactérias totais – Agar Diferencial e bactérias lácticas – Meio MRS. As amostras foram coletadas 5 minutos após o último abastecimento das dornas (volume de 40L), acondicionadas em frascos de vidro estéreis de 100 mL, devidamente identificados. Estes foram acondicionados sob refrigeração e analisadas, dentro de um período máximo de 6 horas, no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG) – *Campus* Salinas.

As amostras foram coletadas no primeiro, quinto e nono dias de fermentação (de um total de 10 dias) e todas feitas em triplicata. Após o isolamento, as bactérias isoladas foram submetidas aos testes de Gram e da catalase, para confirmação, e contadas. Os demais micro-organismos foram somente contados.

4.6 – Análises Físico-químicas

As determinações analíticas de acidez total e volátil, grau alcoólico aparente e real foram realizadas segundo metodologia estabelecida pelo MAPA, na Instrução Normativa nº. 24 de 08 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b).

4.6.1 – Compostos voláteis na cachaça

As análises de acetaldeído, acetato de etila, metanol, alcoóis superiores, furfural e hidroximetilfurfural foram realizadas por cromatografia gasosa (*Varian CP-3380*). O lactato de etila também foi determinado por cromatografia gasosa, através de injeção manual, detector de ionização de chama (FID), utilizando-se uma coluna capilar de polietilenoglicol (fase estacionária líquida) com 60m x 0,25mm x 0,25 μ m. A temperatura foi de 225 °C para o injetor e 280 °C para o detector. O programa de temperatura da coluna utilizado foi de 50 °C (6 min.) subindo até 100 °C (6 min.), a uma rampa de 15 °C/min., até 190 °C (padrões) e 250 °C (amostra) por 2 min. com rampa de 20 °C/min. O volume injetado foi de 2,0 μ l, 1/60 de taxa de “split” e os gases usados foram o nitrogênio para o arraste e ar sintético e hidrogênio para a formação de chama. Todos os padrões utilizados foram da marca Sigma-Aldrich.

Para realizar as análises cromatográficas foi necessário realizar uma curva padrão, utilizando-se os padrões das substâncias pesquisadas, em concentrações distintas. Utilizando-se as áreas dos picos destes padrões associados com as áreas dos picos do padrão interno utilizado (n-pentanol), obtém-se um índice que será associado à concentração utilizada do padrão. Com base nestes dois parâmetros (concentração do padrão x relação área substância padrão/área padrão interno) é que se obtém a equação de regressão linear da Figura gerada. Com base nesta equação calcula-se a quantidade de cada composto baseado na área obtida pelo gráfico de cada amostra analisada.

4.7 – Isolamento de bactérias lácticas

Foram coletadas amostras de mosto fermentativo de dornas de 5 alambiques da micro-região de Salinas/MG para isolamento de bactérias lácticas. Os alambiques foram escolhidos baseado nos resultados da quantificação de lactato de etila dos experimentos de fermentação em escala piloto no ano de 2009 e na disponibilidade de produção do alambique na época da coleta, entre Setembro e Novembro de 2010. Os alambiques 668, 674, 680 e 681 foram selecionados por possuírem cachaças com maior quantidade de lactato de etila dentre os alambiques que estavam em produção. O alambique 671 foi escolhido por não ter apresentado quantidades detectáveis de lactato de etila na maioria

das amostras analisadas. Os alambiques 675, 676 e 678 apesar de apresentarem boa quantificação do éster em estudo não estavam produzindo cachaça quando da coleta em 2010.

As amostras foram coletadas em frascos de 100 mL estéreis de dornas com 15 dias de fermentação em média. O fermento utilizado em todos os alambiques é o chamado “caipira”, preparado com proporções variadas dos aditivos farelo de milho e quirela de arroz misturados ao caldo de cana-de-açúcar. Coletou-se 100 mL do pé-de-cuba das dornas antes do abastecimento, quando estava totalmente decantado, de três diferentes dornas (triplicata). Após a coleta, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Microbiologia do IFNMG – *Campus Salinas*, onde eram imediatamente processadas.

A seguir realizaram-se diluições decimais seriadas, inoculadas (0,1 mL) em triplicata em ágar MRS, sob condições de microaerofilia, a 37 °C/48h. As placas contendo entre 30 e 300 colônias foram examinadas quanto às características morfológicas e, cada morfotipo foi contado. Após a contagem de cada morfotipo, aqueles se apresentando como Gram positivo e catalase negativa, sugestivos de pertencerem ao gênero *Lactobacillus*, foram repicados em caldo MRS (37 °C/24hs), adicionados de 30% de glicerol e estocados a -20 °C para proceder a caracterização molecular.

4.8 – Caracterização Molecular de bactérias lácticas

4.8.1. Extração de DNA total

As amostras foram descongeladas e inoculadas (200 µL) em caldo MRS (*Himedia*) a 37 °C, durante 24 horas. Após três passagens em caldo, 100 µL de cada amostra foram repicados em tubos contendo 10 mL de caldo MRS e incubados nas mesmas condições para realizar a extração do DNA total.

4.8.1.1. Obtenção dos protoplastos e lise das células

De cada cultivo dos micro-organismos que cresceram em caldo MRS, 10 mL foram centrifugados a $1.500 \times g$, durante 30 minutos, à temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados com 10 mL de água deionizada e centrifugados a $1.500 \times g/10$ minutos. Os *pellets* foram suspensos em 1 mL de cloreto de lítio (5 M), transferidos para tubos de microcentrífuga e incubados, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por uma hora, com a finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $15.350 \times g/5$ minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os *pellets* foram novamente suspensos e lavados com 1 mL de água deionizada, para retirar o excesso de sal. Os tubos foram centrifugados a $15.350 \times g/5$ minutos e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram suspensos em 1 mL de tampão (25 mM de sacarose, 50 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 10 mg de liozima mL^{-1} e 100 μg de RNaseA mL^{-1}) para obtenção dos protoplastos. O material foi incubado por uma hora, sob agitação, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Os tubos foram centrifugados a $15.350 \times g/5$ minutos e os sobrenadantes descartados. Em seguida, os *pellets* foram suspensos em 500 μL do tampão descrito acima (sem sacarose e liozima) e as células foram lisadas com a adição de 100 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%.

4.8.1.2. Extração do DNA

Em cada tubo, acrescentou-se 600 μL de fenol, agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados a $15.350 \times g$, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 10 minutos. Transferiu-se os sobrenadantes para tubos contendo 600 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida centrifugados a $15.350 \times g$, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 600 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após isto foram centrifugados a $15.350 \times g$, a 20°C , durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 600 μL de isopropanol, centrifugados a $15.000 \times g$, durante 30 minutos, para precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram retirados e os *pellets* lavados com 500 μL de etanol (70%), e centrifugados a $15.350 \times g$, durante 10

minutos, a 20 °C. O álcool foi retirado e o *pellet* suspenso em 100 µL de TE sem RNase.

4.8.1.3. Quantificação do DNA

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras de DNA extraído foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Cinco µL de cada amostra de DNA total extraído foram misturados com 1 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 3 µL de brometo de etídeo, utilizando 100V, durante 40 min. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb (*New England BioLabs - Ipswich, Massachusetts, United States*). Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob incidência de luz ultravioleta.

4.8.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar a região intergênica espaçadora entre as subunidades ribossomais (16S e 23S) de *Lactobacillus*, de acordo com metodologia proposta por Tilsala e Alatosava (1997).

Foram utilizados iniciadores universais, que se anelam nas regiões conservadas dos genes 16S e 23S rRNA. Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de micro-organismos, porém, bastante conservada em micro-organismos da mesma espécie, sendo então, utilizada em pesquisas de identificação molecular (Barry *et al.*, 1991).

Reação de PCR-ARDRA 16S-23S rRNA(25µL)

DNA total diluído (10ng)	1,00 µL
Tampão da enzima Taq DNA polimerase (10 x)	2,50 µL
Deoxinucleotídeos (2,5 mM)	2,50 µL
Iniciador senso 16S (10pmol)*	1,00 µL
Iniciador reverso 23S (10pmol)**	1,00 µL

MgCl ₂ (1,5mM)	0,75 µL
Taq DNA polimerase (5 U)	0,25 µL
Água deionizada	15,50 µL

*Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'

**Primer 23-1b. 5' – GGGTTCCCCCATTCGGA – 3'

Os tubos de microcentrífuga contendo as amostras de DNA com os reagentes, foram colocados em termociclador *Mastercycler 5333 Eppendorf (Hamburg, Germany)*, utilizando-se o programa:

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 min e 30 seg
<i>Desnaturação</i>	94° C	30 seg
<i>Anelamento dos iniciadores</i>	55° C	1 min
<i>Extensão</i>	72° C	1 min
Número de ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento e extensão: 35 ciclos		
<i>Conservação</i>	4° C	Tempo indefinido

Posteriormente, 5 µL de cada produto de PCR foram misturados com 1 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol e, então, submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,4 %), adicionado de 3 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V/45 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

4.8.3. Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rRNA com endonucleases específicas (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Os produtos de PCR foram submetidos à ação de endonucleases (ARDRA), de acordo com compilação de seqüências de nucleotídeos disponíveis no *GenBank*, para a identificação das espécies de bactérias isoladas. As enzimas utilizadas foram:

- *Sph I*, *Nco I*, *Nhe I* (que clivam o DNA dentro do gene 16S);
- *Ssp I*, *Sfu I*, *Dra I*, *Vsp I*, *Eco RI* (que clivam o DNA na região espaçadora);
- *Hinc II* e *Hind III* (que clivam o DNA dentro do gene 23S).

Utilizou-se também a enzima *Eco RV*, que cliva o DNA de *Lactobacillus* do grupo casei na região intergênica 16S-23S e dentro do gene 23S no grupo acidófilo.

Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas da companhia *New England BioLabs* (*Ipswich, Massachusetts, United States*). Como algumas destas enzimas necessitam de albumina sérica bovina (BSA) para sua melhor atividade, foram preparadas duas misturas diferentes:

MIX 1 – com BSA

DNA (Produto de PCR)	3,75 µL
Tampão 10 x	1,00 µL
BSA 10 x	1,00 µL
Água deionizada	4,00 µL
Enzima	0,25 µL

MIX 2 – sem BSA

DNA (Produto de PCR)	3,75 µL
Tampão 10 x	1,00 µL
Água deionizada	5,00 µL
Enzima	0,25 µL

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos a 37 °C, durante uma a seis horas, para proceder à análise de restrição enzimática. Em seguida, 9 µL de cada produto foram misturados com 1 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionado de 3 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 45 minutos. Os resultados foram visualizados por transiluminador, com luz ultravioleta, e fotografados. O perfil de restrição enzimática de cada produto de PCR-ARDRA 16S-23S foi comparado com o perfil de restrição característico de cada espécie de bactérias lácticas comumente isoladas de fermentação de cachaça.

4.8.4 – Análises *In silico*

Para comparar o perfil de restrição enzimática obtido das amostras isoladas foi

necessário realizar análise *in silico* com as principais bactérias isoladas de dornas de fermentação de cachaça. Para essa análise foi feita uma pesquisa da sequência do genoma de várias bactérias no *Genbank*, com o objetivo de encontrar a sequência dos genes 16S, 23S e o respectivo espaço intergênico de posse dos primers utilizados na reação de PCR. Após obter essa sequência utilizou-se o programa *pDRAW32*, onde foi realizado a restrição enzimática com as 11 enzimas utilizadas objetivando conhecer o perfil exato de cada micro-organismo pesquisado. Os perfis dos micro-organismos que não foram encontrados os genomas no *Genbank* foram obtidos da literatura. Estas análises estão sintetizadas na Tabela 3.

A análise *in silico* das sequências nucleotídicas da região 16S-23S das principais bactérias lácticas isoladas de dornas de fermentação em alambiques (Carvalho-Netto *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2010) foi realizada para se obter um perfil de restrição enzimática teórico. O perfil de *Lactobacillus ferintoshensis* e *Weissella confusa* foi baseado nos estudos de Gomes *et al.* (2010) devido ao fato de não se encontrar no Genebank as sequências necessárias para tal análise.

4.8.5 – Clonagem

4.8.5.1 – Preparo de células competentes

Para o preparo de células competentes utilizou-se a bactéria *Escherichia coli* TOP10F'. Para isso, uma colônia isolada em agar LB-ampicilina (10µg/mL) foi inoculada em tubos contendo caldo LB-ampicilina e incubada a 37 °C/12-16horas. Após esse período a cultura crescida em caldo foi inoculada novamente em caldo LB-ampicilina até a densidade óptica (600nm) de 0,8.

Após esse período a massa bacteriana foi coletada por centrifugação, ressuspensa em cloreto de cálcio (0,1 M) e incubada em gelo por 1 hora. Fez-se novamente a centrifugação e ressuspensão da massa bacteriana em 1 mL de cloreto de cálcio (0,1 M). Dividiu-se em alíquotas de 100 µL/microtubo, adicionando-se 30 % de glicerol para a estocagem em freezer -80 °C.

Tabela 3 – Diferenciação de bactérias ácido lácticas por análise *in silico* de restrição enzimática dos três fragmentos da região intergênica 16S-23S do rDNA.

	<i>Ase</i> I	<i>BstB</i> I	<i>Dra</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> V	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Nco</i> I	<i>Nhe</i> I	<i>Sph</i> I	<i>Ssp</i> I
<i>Bacillus coagulans</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Enterococcus hirae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. casei</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. ferintoshensis</i> ¹	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>L. fermentum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. hilgardii</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>L. plantarum</i>	+	+ ^a	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	++	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>W. confusa</i> ¹	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

^a Polimorfismo presente em algumas cepas de *Lac. plantarum* e ausente em outras.

‘+’ significa que a enzima cliva a região intergênica.

‘++’ significa que a enzima cliva a região intergênica em dois sítios distintos.

‘-’ significa que a enzima não cliva a região intergênica.

¹GOMES *et al.*, (2010)

4.8.5.2 – Reação de PCR

Após obtenção do DNA genômico, a região intergênica 16S-23S do DNA ribossomal foi amplificada a partir de 60 ng de DNA (aproximadamente 2,0 µl) conforme mistura reativa e ciclo descritos a seguir:

Reação de PCR (25,0 µL)

DNA total	2,00 µL
Tampão da enzima Taq DNA polimerase (10 x)	2,50 µL
Deoxinucleotídeos (2 mM)	2,50 µL
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75 µL
Iniciador senso (10 pmol)*	2,00 µL
Iniciador reverso (10 pmol)**	2,00 µL
Taq DNA polimerase (5 U)	0,25 µL
Água deionizada	13,00 µL

*Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'

**Primer 23-1b. 5' – GGGTTCCCCCATTCGGA – 3'

Ciclo de PCR utilizado:

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 minutos
<i>Anelamento</i>	55°C	1 minuto e 15 segundos
<i>Extensão</i>	72°C	1 minuto
<i>Desnaturação</i>	94° C	30 segundos
<i>Anelamento dos iniciadores</i>	55° C	1 minuto
<i>Extensão</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensão final</i>	72° C	10 minutos
<i>Conservação</i>	4° C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação a 94°C/30 seg., anelamento e extensão (1 min.): 35

O produto de amplificação (aproximadamente 500 pb) foi purificado por eluição, após fragmentação da banda de 500 pb retirada do gel, usando 500 µl de TE contendo 1.2 M de NaCl e agitação em Vortex (4 x, com intervalos de tempo). O DNA eluído foi

precipitado pela adição de 2.5 X volume de etanol 100 % e lavado com etanol 70 %. O DNA foi ressuspensão em 20 µL de água.

4.8.5.3 – Clonagem

A região ITS dos diferentes isolados de *Lactobacillus* foram clonadas no vetor pGEM® T-easy (*Promega, Madison, EUA*), conforme protocolo:

Mistura de Ligação (1hora/16°C)

Água Mili-q	2,0 µL
Tampão	5,0 µL
T ₄ DNA Ligase	0,7 µL
pGEM T-easy	0,5 µL
DNA	4,3 µL

Cerca de 5,0 µL da mistura de ligação foi usada para transformar célula TOP10F'competentes. Os clones foram selecionados em meio LB-agar contendo ampicilina.

4.8.6 – Sequenciamento

Para confirmação dos micro-organismos isolados, realizou-se também o seqüenciamento de seus DNA's (Tannock *et al.*, 1999). Esta análise foi realizada no Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), no Laboratório de Genoma, no ICEB – UFOP. Para obtenção do DNA purificado, os menores fragmentos dos géis de agarose, após a reação de PCR, foram cortados e purificados utilizando-se TE + 1,2 M NaCl e etanol. O DNA purificado foi clonado em *Escherichia coli* TOP10 competente, utilizando-se o vetor pGEM T-easy (*Promega*). As células transformadas foram cultivadas em ágar LB, suplementado com X-Gal (30 µg/mL), IPTG (0,6 mM) e ampicilina (100 mg/L). Foram coletadas cada placa algumas colônias e transferidas para tubos contendo caldo LB, suplementado com ampicilina (100 mg/L), e incubado à 37 °C, sob agitação (200 rpm)/16-24 horas. Uma alíquota foi utilizada para a extração do DNA e verificação das clonagens através da digestão com *EcoRI* e outra para o

sequenciamento.

Os clones que receberam corretamente o inserto (produto de PCR 16S-23S dos DNA's das BAL) tiveram seu DNA extraído e amplificado, utilizando-se os primers universais M13 (*Forward* 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACG-3' e *Reverse* 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'), para realização da reação de sequenciamento, em máquina "MegaBACE DNA Analysis Systems – Amersham Biosciences - EUA", em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado "MegaBACE 100". Os resultados desta análise (sequência de pares de base dos DNA's) foram comparados com as seqüências existentes no *GenBank*, utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para confirmação das espécies de BAL, isoladas de dornas de fermentação.

4.9 – Seleção da bactéria láctica

Após o isolamento e identificação molecular das bactérias lácticas presentes em dornas de produtores da região de Salinas/MG, procedeu-se a seleção de qual cepa utilizar em experimentos de fermentação consorciada (levedura + bactéria láctica). Para isso foram realizados testes de velocidade de crescimento e de viabilidade, em meio mínimo YNB Sac8%, em fermentações consorciadas com *Saccharomyces cerevisiae*, além de análise da produção de lactato de etila durante essas fermentações em trabalho de Carvalho (2011) realizado em nosso laboratório (LBCM/NUPEB-UFOP).

4.9.1 – Adaptação das bactérias lácticas ao meio da fermentação consorciada

A cepa de bactéria láctica selecionada, mantida sob congelamento (-80 °C), foi reativada transferindo-se 100 µL da suspensão de células para 5 mL de caldo MRS (em duplicata), e incubada a 35 °C por 24 horas. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi inoculado em 50 mL de caldo MRS e incubado a 35 °C por 24 horas. Após esse período o conteúdo foi centrifugado por 12 minutos a 3000 × g, lavados com água destilada estéril e inoculados em 200 mL de Meio Caldo de Cana (caldo de cana-de-açúcar 5 °Brix + 10 g/L extrato de leveduras + 5 g/L de peptona), e incubados a 35 °C por 24 h. Esse processo se repetiu para o volume de 500 mL, até obter uma suspensão bacteriana correspondente a 10⁸ UFC/mL, conforme constatado nos isolamentos das bactérias

láticas em dornas de fermentação de alambiques na região de Salinas/MG, utilizando-se câmara de Newbauer. Após conseguir essa concentração de bactérias láticas, o conteúdo de cada dois Erlenmeyers (duplicata) foi centrifugado por 12 minutos a $3000 \times g$, lavados com água destilada estéril e utilizados como inoculo inicial, aproximadamente 200 mL de biomassa no pé-de-cuba, nas dornas de fermentação em escala piloto.

5 – FERMENTAÇÕES CONSORCIADAS EM ESCALA PILOTO

As fermentações consorciadas em escala piloto foram conduzidas em dornas de 40L (volume útil), no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – *Campus* Salinas, utilizando-se cana-de-açúcar da variedade RB 765418, c na Fazenda Santa Izabel do IFNMG. Os procedimentos de recepção e processamento da cana-de-açúcar para o abastecimento das dornas foram os mesmos já descritos anteriormente (item 4.4.3).

Foi utilizada a levedura LBCM 680, selecionada de um alambique da micro região de Salinas/MG, devido ao seu desempenho e características superiores apresentados em testes desenvolvidos pela doutoranda Edilene Alves Barbosa. A bactéria láctica utilizada foi a bLBCM 680-2, isolada de alambique da região e caracterizada neste trabalho. Esta cepa bacteriana foi escolhida baseada no seu melhor desempenho em testes de crescimento e nas melhores taxas de viabilidade durante o processo de fermentação consorciada e produção de lactato de etila (Carvalho, 2011).

Foram utilizadas quatro dornas de fermentação para avaliar o efeito da presença da bactéria láctica no desempenho fermentativo e na qualidade química da bebida. As condições experimentais das quatro dornas estão descritas na Tabela 4, variando-se somente o inóculo/re-inóculo da bactéria láctica e o tratamento térmico do caldo utilizado na fermentação. Este tratamento foi realizado em autoclave de calor úmido a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Tabela 4 – Condições experimentais adotadas no experimento em escala piloto das dornas de fermentação consorciada

Dorna 1	Dorna 2	Dorna 3	Dorna 4
Controle – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LBCM 680) com caldo de cana <i>in natura</i> .	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LBCM 680) com caldo de cana <i>in natura</i> + inóculo de <i>Lactobacillus casei</i> (bLBCM 680-2) no tempo 0h.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LBCM 680) com caldo de cana <i>in natura</i> + inóculo de <i>Lactobacillus casei</i> (bLBCM 680-2) no tempo 0h + re-inóculos a cada 48h.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LBCM 680) com caldo de cana <u>autoclavado</u> + inóculo de <i>Lactobacillus casei</i> (bLBCM 680-2) no tempo 0h + re-inóculos a cada 48h.

5.1 – Parâmetros fermentativos avaliados

A condução do processo fermentativo e da destilação ocorreu da mesma maneira com já descrito anteriormente (item 4.4), durante dez dias consecutivos. As dornas eram cobertas com tela de tecido para evitar a queda de insetos e sujidades no mosto fermentativo. A bebida produzida oriunda de cada ciclo fermentativo foi devidamente identificada e armazenada em garrafas de vidro previamente higienizadas.

Os parâmetros fermentativos avaliados foram a taxa do consumo de sólidos solúveis totais, acidez total do mosto e teor alcoólico presente no vinho conforme procedimentos já descritos anteriormente (item 4.5). Análises microbiológicas foram realizadas para verificar a dinâmica populacional ao longo dos ciclos fermentativos, ao início e fim de cada período de 48h (correspondendo ao período de cada inóculo da cepa de *Lactobacillus casei* bLBCM 680-2). Para isto, foram realizados plaqueamentos em microgota (10 µL) das culturas em diluições adequadas, nos seguintes meios de cultura:

- Contagem de leveduras: Meio YM Agar + cloranfenicol 10 mg/L
- Contagem de bactérias lácticas: Meio MRS Agar + cicloheximida 100 mg/L.

5.2 Análises Físico-químicas

As determinações analíticas de acidez total e volátil, grau alcoólico aparente e real foram realizadas segundo metodologia estabelecida pelo MAPA, na Instrução Normativa nº. 24 de 08 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b).

As análises dos compostos voláteis das amostras e padrões foram realizadas no Laboratório de Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), utilizando diferentes técnicas e instrumentos.

5.2.1 – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

5.2.1.1 – Preparo das Amostras

A metodologia utilizada foi a extração líquido-líquido, a qual foi conduzida adicionando-se 0,5 g de NaCl (Synth P.A. – A.C.S.), 1,0 mL de PI (Antraceno), 1,0 mL

de diclorometano (grau HPLC, J. T. Baker) e 8,0 mL de amostra a um frasco de vidro de 40 mL com tampa rosqueada e septo de silicone faceado com teflon. Prosseguiu-se à agitação por vórtex (Velp Scientifica, 2000 RPM), durante dez minutos, seguido de repouso, a fim de promover a separação entre as duas fases.

Assim que a separação entre as fases foi atingida, com o uso de uma pipeta automática, retirou-se 1,0 mL da fase diclorometano, a qual foi transferida a um *vial* de 1,5 mL pronto para injeção no cromatógrafo.

5.2.1.2 – Condições instrumentais

As análises cromatográficas dos compostos voláteis (hexanoato, lactato, octanoato, decanoato e carbamato de etila) foram realizadas por um sistema GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com fonte de ionização por elétrons (70 eV) e analisador de massas tipo quadrupolo. Foi utilizada uma coluna DB-Wax polietilenoglicol, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent J&W Scientific, U.S.A.), com a seguinte programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 50°C e rampa de aquecimento de 5°C/min até 220°C. e isotérmico a 240°C por 5min. O volume injetado foi de 1,0 µL, no modo *splitless*. A velocidade linear do fluxo do gás de arraste (hélio) foi de 3,08 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240 °C, da linha de transferência foi de 240 °C e da fonte de ionização foi de 200 °C. O espectrômetro de massas operou no modo *fullscan* (varredura), adquirindo íons de 40m/z a 400m/z, e *SIM* com monitoramento do íon 188m/z. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas se deu através do *software* GCMS Solution, v.2.50 SU3 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão).

5.2.2 – Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID)

5.2.2.1 – Preparo das soluções e confecção da curva analítica

Para o preparo da solução intermediária (SI), a massa de cada padrão foi pesada em balão de 100 mL com cerca de 50 mL de solução hidroalcoólica (40 %, v/v) e, em seguida, o volume foi completado com solução hidroalcoólica (40%, v/v). Foram

utilizados os padrões de metanol, n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, acetato de etila, 2-butanol e 1-butanol. Todos os padrões utilizados foram da marca Sigma-Aldrich.

Para o preparo da solução de padrão interno (SPI) 2,5%, v/v, 25,0 µL de 1-pentanol foi adicionado em 975 µL de solução hidroalcoólica (40%, v/v). Para a quantificação das amostras a curva analítica foi construída com soluções padrão em cinco faixas de concentração adicionando 20 µL de solução de padrão interno (PI) a uma concentração final de 0,5 %, v/v.

5.2.2.2 – Preparo das amostras de cachaça para injeção

Foi preparada uma solução A contendo 25 µL de N-Pentanol e 975 µL de uma solução hidroalcoólica 40% (etanol/água). Posteriormente 20 µL da solução A foram acrescidos a 975 µL de amostra de cachaça e em seguida injetadas no CG FID.

5.2.2.3 – Condições instrumentais

As análises de acetaldeído, acetato de etila, metanol e álcoois superiores foram realizadas por cromatografia gasosa os quais foram determinados diretamente em um cromatógrafo a gás (Varian CP-3380), injeção manual, detectados por ionização em chama (FID), coluna capilar de polietilenoglicol DB-WAX polietilenoglicol e tamanho de 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent J&W Scientific, U.S.A.). A temperatura foi de 225 °C para o injetor e 280 °C para o detector. O programa de temperatura da coluna utilizado foi de 50 °C (6 min.) subindo até 100 °C (6 min.), a uma rampa de 15 °C/min., subindo a 240 °C (7,7 min.) a 20 °C/min. Tempo total 30,03 minutos e “tempo morto” – tempo mínimo para um composto que não interaja com a fase estacionária – 3,36 minutos. O volume injetado foi de 2,0 µl, 1:25 de taxa de “split” e os gases usados foram o nitrogênio para o arraste e ar sintético e hidrogênio (99,9995%) para a formação de chama.

5.2.3 – Análise de Espectrometria

Um espectrômetro de absorção atômica AA50 (Varian), foi utilizado com um comprimento de onda de 324,7nm e fenda de 0,5 nm, gás acetileno e chama oxidante (lâmpada de catodo oco para Cu com corrente de 4mA. e lâmpada de D₂ para eliminação de interferências). Para quantificar o elemento Cu²⁺ nas amostras foi preparada uma curva analítica na faixa de 0,1 a 10,0 mg/L⁻¹.

5.2.3.1 - Materiais

Espectrômetro de absorção atômica com chama equipado com corretor de background e lâmpada de catodo oco de Cu, chapa aquecedora, balões volumétricos, pipetador automático com volume ajustável e béqueres. Utilizou-se soluções-padrão estoque de 1000 mg/L de Cu como reagente.

5.2.3.2 – Procedimentos para análise

Foram realizados ajustes no equipamento, chama e nebulização para a obtenção máxima de absorvância, utilizando uma solução-padrão da curva. Otimizou-se a lâmpada e fez-se a leitura diretamente na solução original da amostra. Foram preparadas soluções-padrão da curva a partir da solução estoque levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa de linearidade do elemento. Foram construídas as curvas-padrão para o elemento utilizando regressão linear e em seguida fizeram-se as leituras das amostras.

5.3 – Análises de aceitação das bebidas oriundas das fermentações consorciadas

Usou-se o teste de comparação múltipla a julgadores para verificar o quanto as amostras diferiram de uma amostra de referência (padrão) e o teste de aceitação para consumidores para avaliar o quanto gostam ou desgostam das bebidas apresentadas.

5.3.1 – Características dos julgadores

Foram convidados para compor o painel de provadores para o desenvolvimento

dos testes sensoriais, 10 indivíduos julgadores treinados e que integram a equipe sensorial do IFNMG - *Campus* Salinas para análise de cachaça branca, sendo 8 do sexo masculino, funcionários do *Campus* com faixa etária compreendida entre 21 a 50 anos.

5.3.2 – *Características dos Consumidores*

Foram convidados 124 consumidores potenciais de cachaça, não treinados, escolhidos aleatoriamente, incluindo docentes, alunos (maiores de 18 anos), servidores do IFNMG - *Campus* Salinas, moradores da cidade de Salinas e cidades circunvizinhas para realizarem o teste de aceitação. O teste foi conduzido no ambiente do Laboratório de análise sensorial do IFNMG - *Campus* Salinas.

5.3.4 – *Condições dos testes*

Os dez provadores selecionados realizaram os testes no laboratório de Análise Sensorial do Setor de Agroindústria do IFNMG - *Campus* Salinas. As avaliações foram realizadas em cabines individuais, temperatura entre 22° - 25°C, com iluminação colorida e as amostras classificadas conforme a condição experimental e as suas receptivas replicatas. Cada grupo de amostra foi aleatorizado em blocos completos, e codificados utilizando número de três algarismos, (Cochran e Cox, 1957). As amostras foram servidas aos provadores em volume de 20 mL em taça para degustação, padrão internacional ISO, cobertas com vidro de relógio.

5.3.5 – *Teste de comparação múltipla*

O teste de comparação múltipla foi aplicado objetivando-se avaliar o quanto as amostras diferiam do padrão. Apresentou-se aos julgadores, em cabines individuais, com iluminação vermelha, a amostra referência, identificada com a letra P (padrão), juntamente com as amostras a serem avaliadas, devidamente codificadas com números de três dígitos. As amostras foram apresentadas de forma monádica e sequencial. Solicitou-se aos julgadores avaliar as amostras, classificando-as em “extremamente mais forte que o padrão” ou “extremamente menos forte que o padrão”. Foi utilizada a

ficha de avaliação apresentada no anexo 3.

De acordo com sua condição experimental, dentro de cada grupo de 30 unidades de 600mL, as amostras foram retiradas de forma casualizada, sendo utilizadas quatro unidades para compor a referência e duas de cada um dos outros três grupos de amostras. A amostra de referência usada foi a Dorna 1, codificada como a padrão e ainda foi introduzida dentre as demais testadas.

5.3.6 – Teste de Aceitação

A fim de se avaliar se os consumidores gostam ou desgostam dos produtos formulados nas condições experimentais (Tabela 4) aplicou-se o teste de aceitação. Os julgadores receberam as amostras codificadas, com números de três dígitos, em cabines individuais, a temperatura entre 22°-25°C, com volume de 20 mL em taças de cristal ISO padrão internacional de degustação, cobertas com vidro de relógio e lhes foram solicitados avaliarem os seus sentimentos com relação a cada amostra, utilizando-se uma escala hedônica verbal de nove pontos, de acordo com o anexo 4.

Primeiramente os julgadores avaliaram a impressão global do produto e em segunda instância foi pedido que explicitassem os motivos que os levou a dar a nota para cada uma das amostras, em relação a aroma característico da cachaça, sabor, acidez (queimação na deglutição) e aroma frutado. Realizou-se a identificação dos consumidores por sexo e faixa etária e foram solicitados ainda a mencionar com que frequência consumia cachaça e se sendo consumidor quais as suas razões de consumo.

5.4 – Análises Estatísticas

Os parâmetros fermentativos (consumo de sólidos solúveis, acidez do mosto e contagens de bactérias e leveduras) foram analisados pelo teste de Tukey para comparação de médias (one-way ANOVA). Somente o parâmetro grau alcoólico foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis (one-way ANOVA). Os parâmetros químicos cobre, acidez volátil, acetaldeído, metanol, hexanoato, octanoato e decanoato de etila foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias (one-way ANOVA). Todas as análises foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 5.00*.

Para o teste de comparação múltipla e de aceitação do consumidor, avaliou-se a percepção sensorial dos descritores (aroma, sabor, acidez e frutado) das cachaças produzidas com inóculo e reinóculos de *Lactobacillus casei* e tratamento térmico do caldo em relação à dorna controle (Dorna 1). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett para comparação múltipla e teste de Tukey para aceitação do consumidor, ambos ao nível de significância de 5%.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Fermentações em escala piloto

Inicialmente, procedemos ao acompanhamento de processos fermentativos nos quais cepas de leveduras selecionadas foram inoculadas em caldo de cana obtido de uma mesma cultivar (RB-791011) que foi tratada e extraída utilizando-se procedimentos exatamente iguais. Os resultados das contagens de bactérias totais e bactérias lácticas durante os 10 dias de fermentação para cada cepa selecionada estão ilustrados na Figura 6. Em todos os casos, não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as contagens e as cepas de leveduras utilizadas nas fermentações utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e análise de comparação múltipla de Dunn's. A variação encontrada nas contagens é reflexo das diversas interações entre os microorganismos, entretanto não existe uma interação que reflita em maior ou menor inibição do crescimento das bactérias presentes no mosto.

Os resultados para lactato de etila verificados nas cachaças produzidas com as 15 diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estão ilustrados na Figura 7. Observa-se que nas amostras de cachaça obtidas a partir das cepas de levedura 680 e 676 são as que apresentaram maior teor de lactato de etila durante as 10 fermentações ($p < 0,05$), diferenciando-se das demais cepas. A variação no teor pode estar relacionada, além da presença, da quantidade, viabilidade, tipo de bactéria láctica presente (homo ou heterofermentativa), a interação desta bactéria com a cepa de levedura utilizada e a capacidade de cada levedura em esterificar o ácido láctico à lactato de etila. Os valores médios (8,08 mg/100mL a.a) e de mediana (4,21mg/100mL a.a.) encontrados neste trabalho são menores daqueles encontrados por Nascimento (2007), provavelmente devido ao fato deste autor ter trabalhado com bebidas comerciais, onde a condição higiênica do processo é uma variável inerente a cada produtor, refletindo nessa diferença.

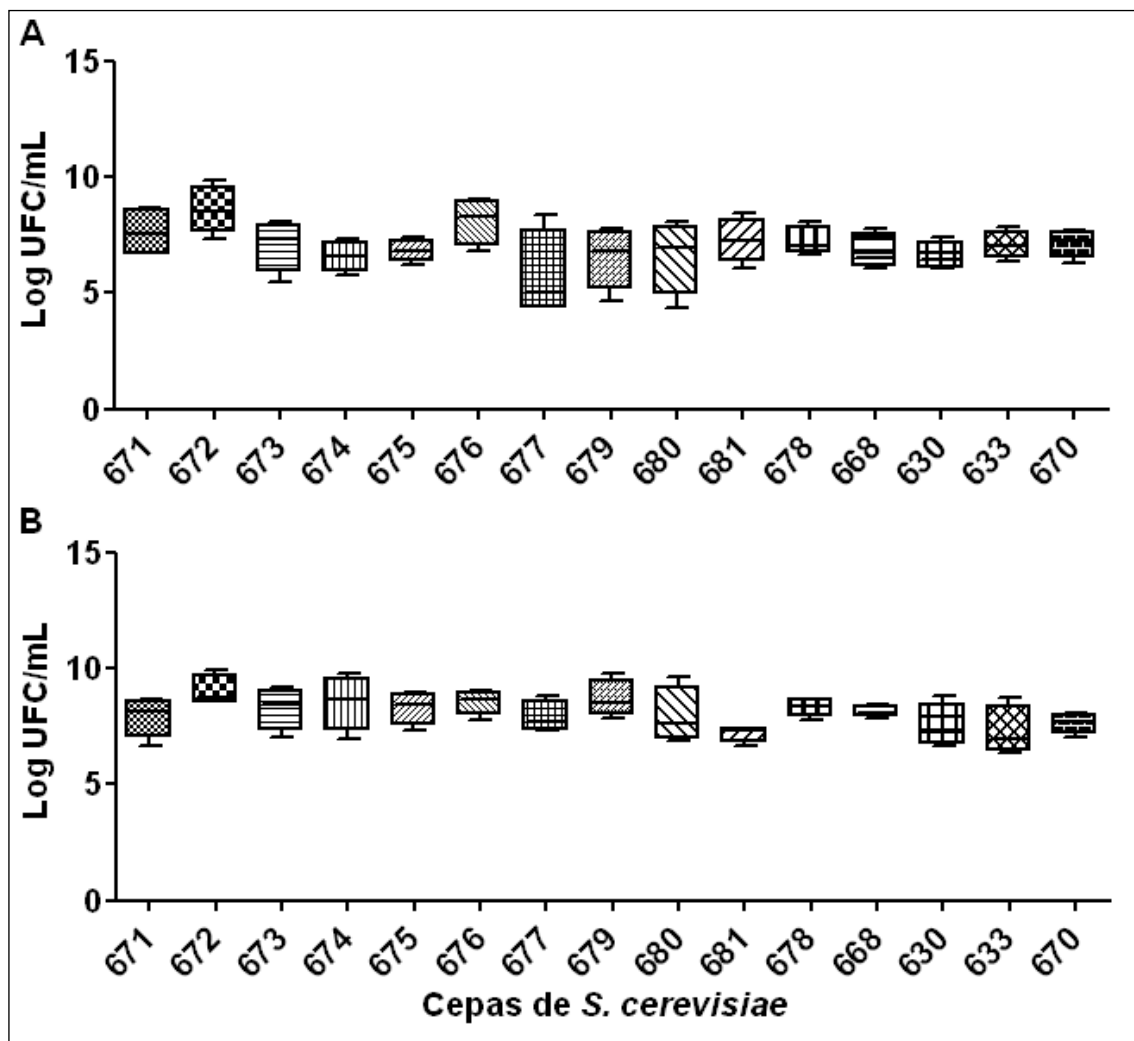


Figura 6 – Mediana das contagens (Log UFC/mL) de bactérias lácticas (A) e bactérias totais (B) durante 10 ciclos fermentativos com 15 diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da micro-região de Salinas/MG. Não há diferença para as contagens entre as diversas leveduras usadas no experimento, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância, mostrando uma variação inerente à interação entre os micro-organismos

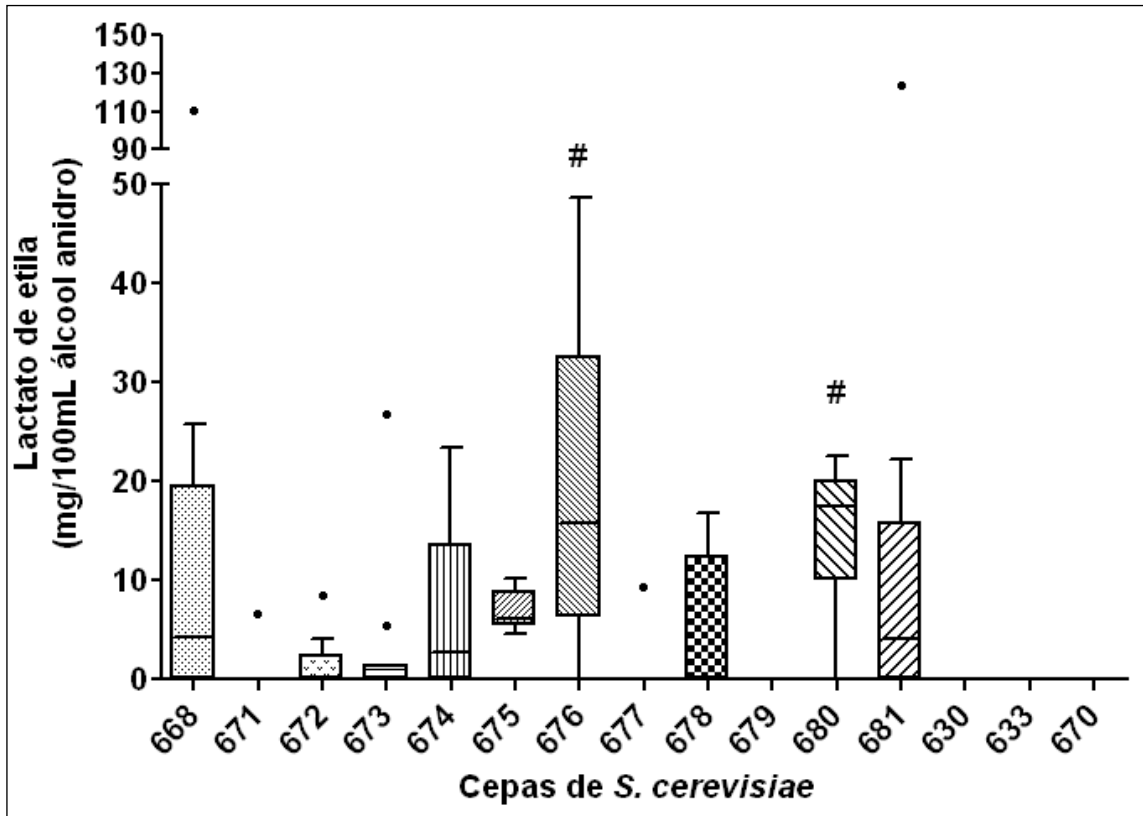


Figura 7 – Boxplot mostrando a produção de Lactato de Etila por cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Nota-se uma maior produção de lactato de etila nas cachaças produzidas pelas cepas 676 e 680 apresentando diferença para as demais. Os valores mostrados são as medianas e os asteriscos significam pontos fora da reta (*outliers*). # Significa diferença estatística pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de significância para as demais linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 8 mostra a evolução das contagens bacterianas (totais e lácticas) em fermentações conduzidas pelas duas cepas com produção mais significativa de lactato de etila e a produção do mesmo éster nos respectivos dias das contagens bacterianas. Nos dias das coletas de amostras para as contagens bacterianas (dias 1, 5 e 9 da fermentação) não houve qualquer tipo de relação entre as contagens e a quantidade de lactato de etila. Essa constatação pode ser vista analisando-se a Figura 9, mostrando que não existe correlação entre a produção de lactato de etila com a quantidade de bactérias lácticas presentes no mosto fermentativo, nas condições analisadas.

Segundo Nascimento (2007), a presença do lactato de etila está relacionada à contaminação do mosto por bactérias (*Lactobacillus* sp) que, pela fermentação láctica, irão produzir ácido láctico que é posteriormente esterificado pelas leveduras. Essa relação quantitativa (quanto mais bactérias lácticas mais lactato de etila) não foi constatada em nosso trabalho, indicando que a interação qualitativa pode ser determinante. Essa hipótese é reforçada por Carvalho (2011), mostrando que a presença do lactato de etila está relacionada ao tipo de bactéria láctica, além da quantidade presente. Além disso, a produção do lactato de etila pode estar relacionada à cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada devido a sua interação com as cepas de bactérias lácticas presentes na fermentação do caldo de cana-de-açúcar para a produção de cachaça e/ou à capacidade da levedura em esterificar o ácido láctico a lactato de etila.

A relação entre a contagem de bactérias lácticas e os parâmetros acidez volátil e grau alcoólico do vinho é vista na Figura 10. Existe uma correlação linear positiva entre a contagem e acidez volátil, entretanto ela é fraca e não significativa, onde apenas 8% da variabilidade de acidez volátil pode ser explicada pela variabilidade de bactérias lácticas. A relação da contagem de bactérias lácticas com grau alcoólico do mosto fermentado é negativa, fraca e não significativa, onde somente 5% da variabilidade do grau alcoólico pode ser explicada pela variabilidade da contagem de bactérias lácticas.

Outros fatores, como a qualidade e o tempo de estocagem da matéria prima, as condições de higiene de instalações, equipamentos e utensílios, além da qualidade da água utilizada durante o processo, podem explicar a acidez volátil da cachaça. Duarte *et al.* (2011) encontraram maiores valores de acidez volátil em cachaças produzidas através de co-inóculos de *Lactobacillus fermentum*, apesar de serem valores abaixo do máximo permitido pela legislação.

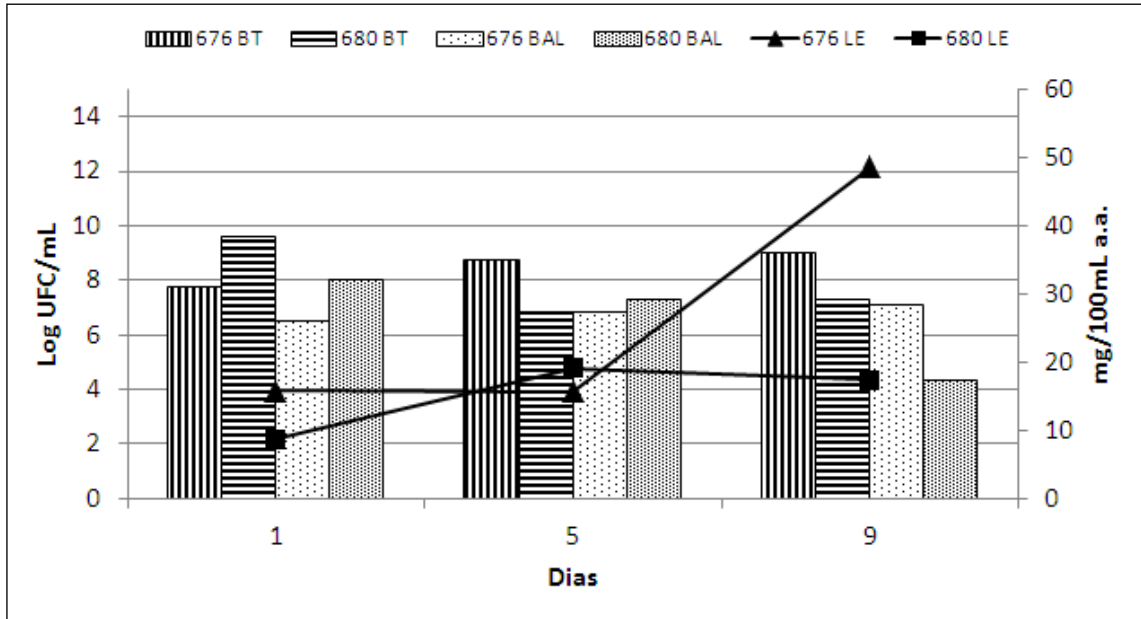


Figura 8 – Evolução da contagem de bactérias totais (BT) e lácticas (BL) na fermentação e da quantidade de lactato de etila (LE) na cachaça usando-se as cepas 680 e 676 de *Saccharomyces cerevisiae*.

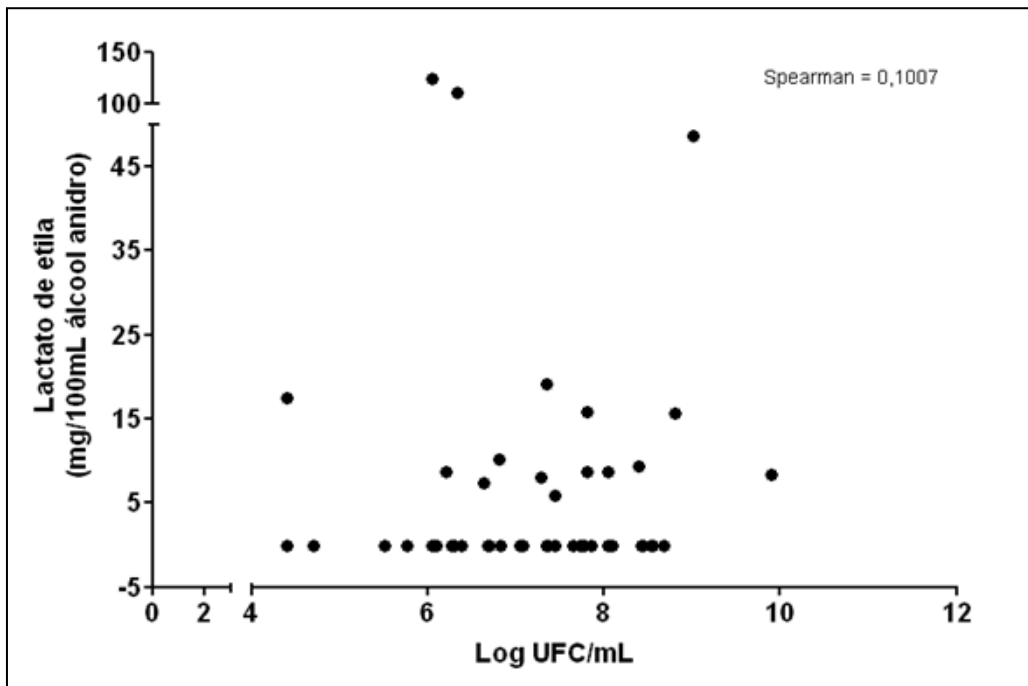


Figura 9. – Análise da correlação, através do coeficiente de Spearman, entre bactérias lácticas (Log UFC/mL) e lactato de etila (mg/100mL a.a.). Percebe-se que mesmo quando há grande quantidade de bactérias lácticas no meio a presença do lactato de etila não acompanha, de forma direta ou indireta, demonstrando a não relação entre os dois parâmetros.

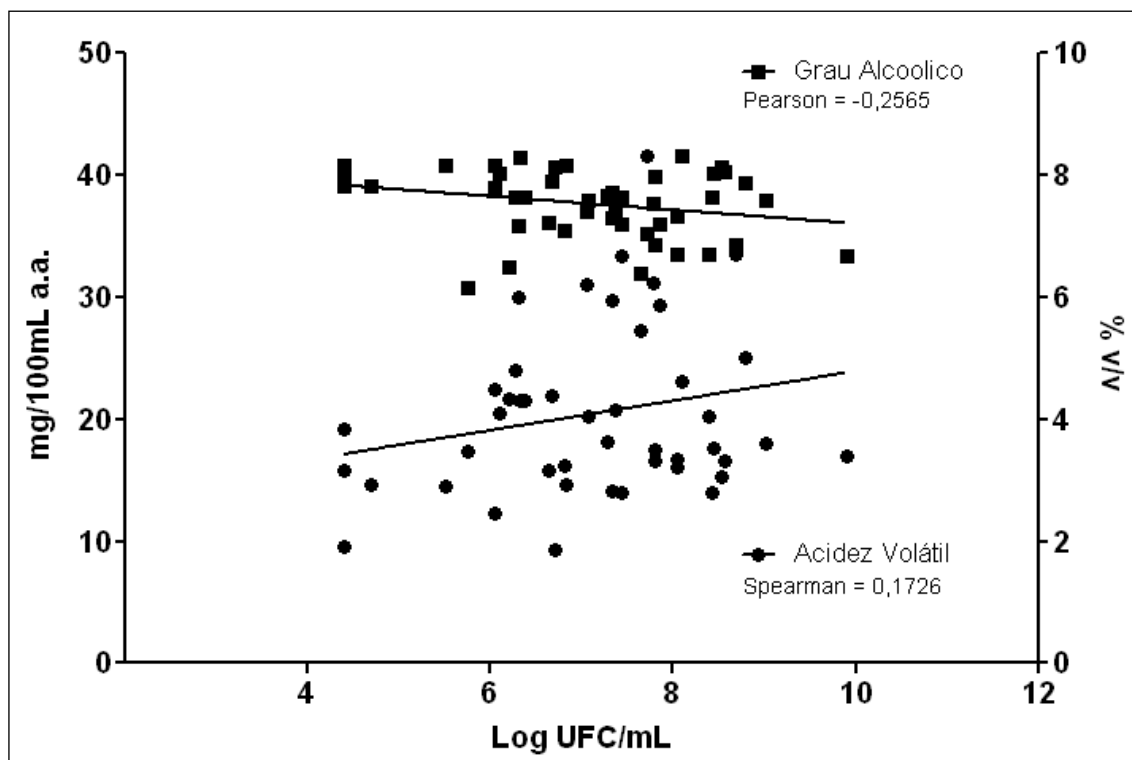


Figura 10. – Correlação entre contagem de bactérias lácticas (Log UFC/mL) e os parâmetros acidez volátil (●) e grau alcoólico do vinho (■). Existe uma relação linear positiva para acidez (mg/100mL a.a.) e negativa para grau alcoólico (% v/v), mas ambas são fracas e não significativas por possuírem um coeficiente de Spearman e/ou Pearson menor que 0,6.

Para o rendimento alcoólico, fatores como cepa de levedura, temperatura, condições nutricionais do meio fermentativo, nível de contaminação bacteriana, dentre outros podem interferir nesse parâmetro (De Souza et al., 2012, Campos et al., 2010; Gomes et al., 2009; Vicente et al., 2006; Pataro et al., 2002). Duarte *et al.* (2011) em trabalho sobre fermentações consorciadas para produção de cachaça entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*, não constatou evidências de prejuízos no processo produtivo, como perda da viabilidade de leveduras e conseqüente redução significativa no rendimento etanólico. Segundo Nascimento (2007), durante a fermentação láctica, as bactérias lácticas utilizam substratos que não são fermentados pelas leveduras, como dextranas residuais e pentoses, sendo que tal fermentação não afeta o rendimento do destilado.

A Figura 11 mostra a relação entre a contagem de bactérias totais, nos experimentos de fermentação em escala piloto, e os parâmetros acidez volátil da cachaça e grau alcoólico do vinho fermentado. Pode-se ver que não existe uma correlação significativa entre as contagens desses microrganismos com os parâmetros analisados, pois os coeficientes de Spearman e Pearson são menores que 0,6. Este resultado, juntamente com o da contagem de bactérias lácticas, ratifica a não influência da contagem de bactérias presentes no mosto fermentativo sobre a produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* e sobre a acidez volátil da cachaça, confirmando a importância da influência de outros fatores (De Souza et al., 2012, Campos et al., 2010; Gomes et al., 2009; Vicente et al., 2006; Pataro et al., 2002).

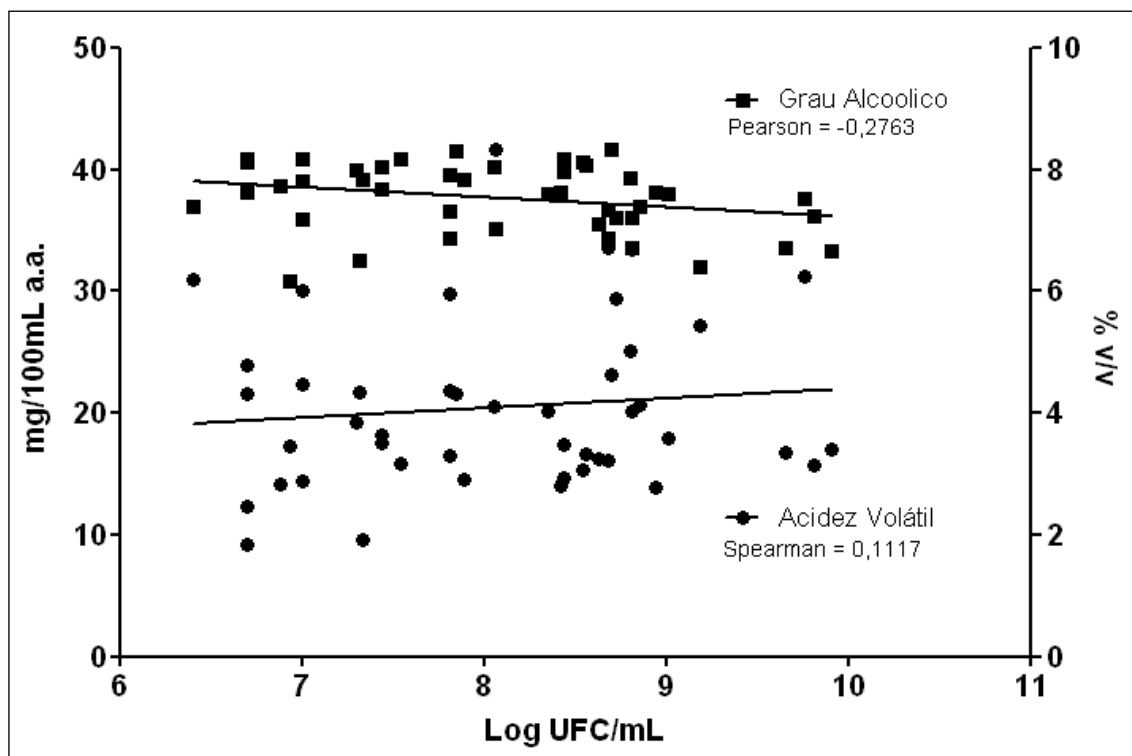


Figura 11 – Correlação entre contagem de bactérias totais (Log UFC/mL) e os parâmetros grau alcoólico do vinho (■) e acidez volátil da cachaça (●). Existe uma tendência em aumentar o grau alcoólico do vinho quanto menor for a contagem de bactérias lácticas, entretanto é fraca e não significativa, além de que somente 5% dessa relação pode ser determinada por esses dois fatores.

6.2 – Isolamento e caracterização molecular de bactérias lácticas

Os dados de morfologia basearam-se na análise da forma, superfície e margem (borda) das colônias bacterianas, sendo que cada colônia com características diferentes foi submetida aos testes de Gram e catalase como triagem para a confirmação de bactérias lácticas. Análises fenotípicas (testes fermentativos) não foram realizadas pois a caracterização bacteriana geralmente requer a determinação de propriedades além daquelas abordadas pelos testes fermentativos (Tannock *et al.*, 1999). Os resultados contendo a contagem, as características morfológicas das colônias e os testes de Gram e catalase estão listados na Tabela 5.

Gomes *et al.* (2010) encontraram valores semelhantes aos encontrados neste trabalho, ao analisar mosto fermentativo de alambiques das regiões de Esmeraldas e Carandaí, em Minas Gerais. Em trabalho de revisão das bactérias lácticas em vinhos, Inês *et al.* (2008) relata contagens entre 10^6 e 10^8 UFC/mL na fase exponencial de *Oenococcus oeni* que domina e realiza a fermentação malolática. No entanto, Schwan *et al.* (2001) encontraram valores de bactérias lácticas em alambiques no Sul de Minas Gerais da ordem de 10^5 UFC/mL.

Após o isolamento de bactérias lácticas em meio seletivo (MRS) foi realizado a identificação molecular das amostras, abrangendo a extração do DNA, amplificação por PCR e análise de restrição enzimática através de 11 enzimas diferentes. A Figura 12 mostra uma reação de eletroforese da região espaçadora 16S-23S das amostras isoladas em campo, para confirmação do gênero *Lactobacillus*. Essa região intergênica apresenta padrão característico de três bandas, correspondendo aos espaços curto, médio e longo da região espaçadora, semelhante aos encontrados para *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* e *Weissella* (Kabadjova *et al.*, 2002).

Tabela 5 – Isolamento de bactérias lácticas em ágar MRS de alambiques da região de Salinas/MG

<i>Alambiques</i>	<i>Contagem (UFC/ml)</i>	<i>Colônias</i>	<i>Gram e Catalase</i>
680	3,5 x 10 ⁸	Redonda, marrom, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
	4,0 x 10 ⁷	Forma elipse, marrom, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
	1,0 x 10 ⁸	Amorfa, branca, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
671	2,1 x 10 ⁸	Redonda, pequena, translúcida.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
	1,2 x 10 ⁸	Redonda, media, bege, opaca.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
668	1,1 x 10 ⁹	Redonda abaulada, bege, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
681	1,3 x 10 ⁸	Redonda, branca, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –
674	4,4 x 10 ⁹	Redonda, branca, lisa.	<i>Bacilos</i> Gram + e Cat. –

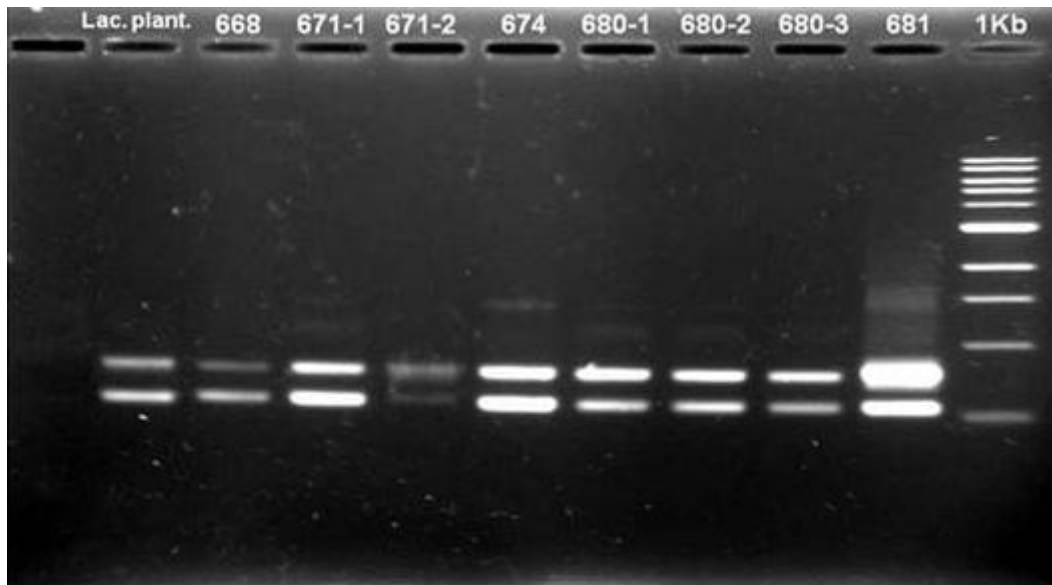


Figura 12. – Reação de PCR da região intergênica 16S-23S visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,4%.

A região intergênica 16S e 23S apresenta alto polimorfismo, permitindo distinção entre gêneros e espécies, conforme Moreira *et al.* (2005) e constatado nas análises *in silico* (Tabela 3). Estes genes são muito utilizados em estudos filogenéticos por serem bastante conservados ao longo da evolução, universalmente distribuídos, funcionalmente constantes e de tamanho adequado para trabalho. Possuem regiões com variações de nucleotídeos nas diferentes espécies, permitindo a distinção entre organismos filogeneticamente distantes (Madigan *et al.*, 2010).

Os resultados da restrição enzimática podem ser analisados na Tabela 6. Os perfis de digestão foram suficientes para distinguir as bactérias até a espécie, mostrando que a maioria das bactérias lácticas isoladas de dornas de fermentação da região de Salinas/MG é de *Lactobacillus casei*. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Gomes *et al.* (2010), que também identificou o *Lactobacillus casei* como a bactéria láctica predominante em processo fermentativo de cachaça em duas diferentes regiões do mesmo estado da federação que o nosso trabalho. Carvalho-Netto *et al.* (2008) encontraram predominância de 66% para o gênero *Lactobacillus*, utilizando uma técnica independente de cultivo para caracterizar a microbiota na produção de cachaça. Entretanto as espécies predominantes foram *L. hilgardii* e *L. plantarum* em alambique localizado no estado de São Paulo. Isso pode ser devido às diferenças regionais na composição da microbiota e às técnicas utilizadas.

Para confirmação dos resultados de restrição enzimática, foi realizada a amplificação do gene 16S, sua clonagem em plasmídeo (pGEM T-easy) e sua amplificação em células de *Escherichia coli* TOP10 competentes. Confirmada a clonagem extraiu-se o DNA, o qual foi seqüenciado em MegaBACE e as sequencias comparadas no *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para confirmação das espécies de BAL, isoladas de dornas de fermentação. Os resultados do sequenciamento confirmaram as espécies de bactérias lácticas encontradas nas análises de PCR-ARDRA, com um mínimo de 98% de correspondência para as amostras 671-1 (*Lactobacillus casei*) e 671-2 (*Lactobacillus perolens*), de 99% para amostra controle (*Lactobacillus plantarum*) e de 100% para as demais amostras (*Lactobacillus casei*). Moreira *et al.* (2005) em estudo de prospecção de probióticos conseguiram identificar 43 isolados de *Lactobacillus* pela técnica de PCR-ARDRA, confirmados por sequenciamento com níveis acima de 98% de identidade.

Tabela 6 – Resultados das digestões enzimáticas do menor fragmento da região intergênica 16S-23S do rDNA das amostras de bactérias lácticas isoladas de alambiques da micro-região de Salinas/MG.

	<i>AseI</i>	<i>BstB</i> <i>I</i>	<i>DraI</i>	<i>EcoR</i> <i>I</i>	<i>EcoR</i> <i>V</i>	<i>HincII</i>	<i>HindII</i> <i>I</i>	<i>Nco</i> <i>I</i>	<i>Nhe</i> <i>I</i>	<i>Sph</i> <i>I</i>	<i>Ssp</i> <i>I</i>	Bactéria
Controle	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
668	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
671-1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
671-2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus perolens</i>
674	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
680-1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
680-2	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
680-3	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
681	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>

6.3 – Fermentações consorciadas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*.

Para realizar os experimentos de fermentação consorciada, procedemos ao acompanhamento de processos fermentativos utilizando bactérias lácticas e leveduras oriundas do mesmo alambique. A cepa utilizada de *Saccharomyces cerevisiae* foi a LBCM 680 por apresentar características fermentativas superiores apontadas nos estudos da doutoranda Edilene Alves Barbosa e ser oriunda do mesmo alambique que a bactéria láctica *Lactobacillus casei* bLBCM 680-2, por apresentar melhores taxas de viabilidade e crescimento assim como maior produção de lactato de etila (Carvalho, 2011). Foi utilizado o caldo de cana obtido de uma mesma cultivar (RB-765418), tratada e extraída utilizando-se procedimentos exatamente iguais. Os únicos parâmetros que variaram foram os inóculos da bactéria láctica (na formação do pé-de-cuba e reinóculos) e o tratamento térmico (esterilização) do caldo, como explicado na Metodologia (Tabela 4).

A Figura 13 mostra a taxa de consumo de sólidos solúveis totais (medida em função da variação do °Brix), o rendimento alcoólico e a acidez total das fermentações conduzidas durante dez dias consecutivos. Apesar de diferentes trabalhos (Narendranath *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2001, Cherubin 2003, Sousa 2005 e Nobre *et al.* 2007) reportarem a interação entre leveduras e bactérias lácticas em diferentes meios de fermentação, não há informações suficientes sobre o efeito de *Lactobacillus casei*, isolado de alambiques, na fermentação do caldo de cana-de-açúcar para a produção de cachaça.

Analisando-se a taxa de consumo de sólidos solúveis (Figura 13 – Painel A) nota-se que a dorna 4 (com reinóculos e uso de caldo autoclavado) apresentou menor rendimento ou velocidade fermentativa, pois durante 10 dias consecutivos foram completados oito ciclos fermentativos comparados com os nove ciclos das demais dornas. Entretanto, observa-se que não houve influência do uso de caldo autoclavado e nem da adição de *Lactobacillus casei* em nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$). Silva *et al.* (2009) encontraram resultados relacionando processo fermentativo mais lento com maior acidez do vinho, podendo ser justificado pela maior presença superficial do oxigênio, favorecendo a oxidação do etanol a ácido acético.

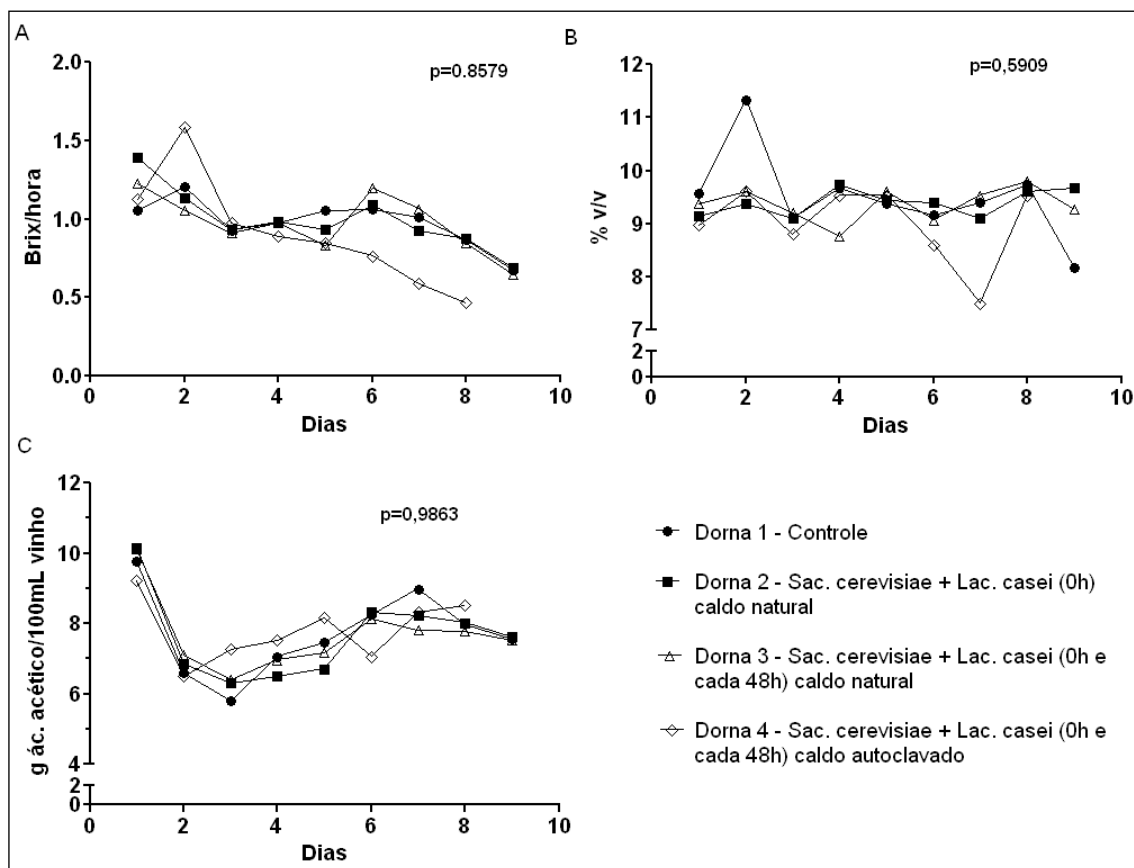


Figura 13 – Parâmetros avaliados durante dez dias consecutivos em fermentações consorciadas (escala piloto) entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*. (A) taxa de consumo de sólidos solúveis totais; (B) rendimento alcoólico; (C) acidez total do mosto fermentativo. Não houve diferença entre as dornas para os diferentes parâmetros pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados semelhantes foram encontrados por Cherubin (2003) e Sousa (2005), ao não constatarem interferência no consumo de sólidos solúveis totais pela co-incubação de *Saccharomyces cerevisiae* com bactérias lácticas. Duarte *et al.* (2011), em trabalho sobre co-inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* com *Lactobacillus fermentum*, constataram que a co-incubação não afeta a atividade enzimática da invertase, não interferindo assim no consumo de sacarose pela levedura e nem na quantidade de açúcares residuais presente nas fermentações testadas. Jussier *et al.* (2006), avaliando a inoculação bacteriana nos parâmetros fermentativos em vinhos, não encontraram evidências de efeitos negativos da fermentação maloláctica (ocasionada por *Oenococcus oeni*) simultaneamente com a fermentação alcoólica conduzida pela *Saccharomyces cerevisiae*.

Estes resultados diferem dos apresentados por Makanjoula *et al.* (1992) trabalhando com bactérias isoladas diretamente da produção de uísque, em escala laboratorial (tubos com 50 mL). Segundo este autor a presença das bactérias aumenta o teor de carboidratos residuais e sugere que a inibição do etanol deve-se, em parte, à incapacidade da levedura de usar completamente os açúcares presentes no meio. Bayrock e Ingledew (2005) constatou perdas no rendimento alcoólico em fermentações conduzidas com inóculos de bactérias lácticas trabalhando com biofermentadores conectados em série (volume de 5 litros), criando um sistema contínuo em multiestágio para produção de bioetanol. Duarte *et al.* (2012), em trabalho de co-cultura entre leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces cerevisiae* selecionada, confirmam que fermentações com maior teor de açúcares residuais geram menores teores de etanol.

Os resultados de teor alcoólico (Figura 13 – Painel B.) e das contagens de bactérias lácticas (Figura 14 – Painel B.) confirmam os dados encontrados nos experimentos piloto com 15 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando que essa relação é fraca e não significativa, onde somente 5% dessa variabilidade pode ser explicada por esses dois parâmetros (Figura 11). Nascimento *et al.* (2008), ratificam estes resultados, afirmando que a fermentação láctica não afeta negativamente o rendimento em etanol. Gomes (2009) avaliando diferentes tipos de bactérias lácticas na fermentação alcoólica constatou perda no rendimento em etanol nos ciclos em que foi utilizado bactérias lácticas do tipo heterofermentativa e sem perdas com as homofermentativas, corroborando com o observado para o *Lactobacillus casei*.

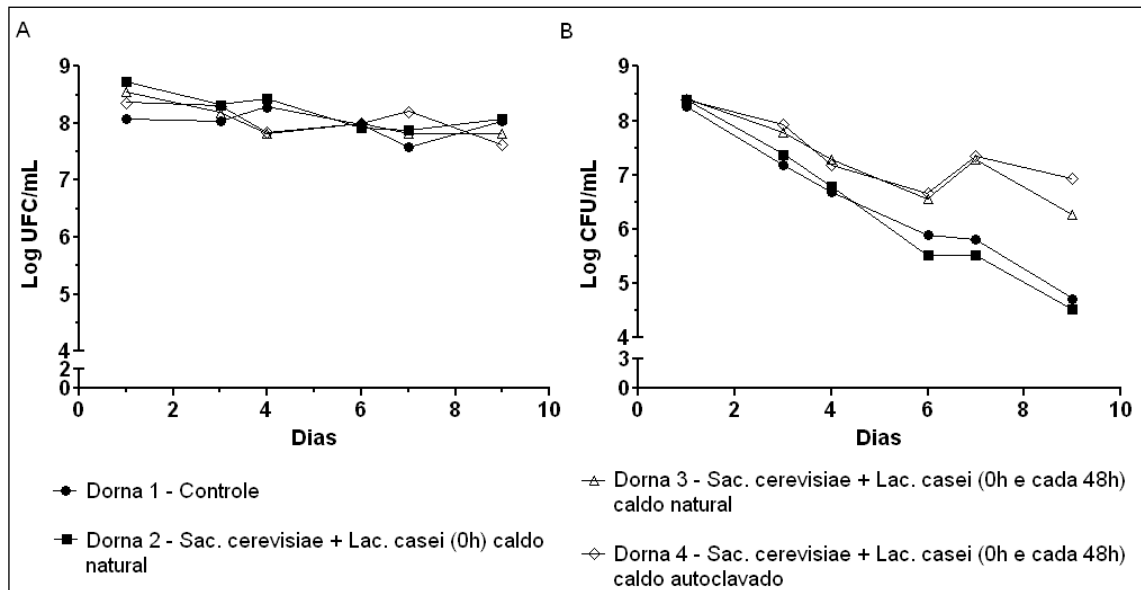


Figura 14. – Evolução da população microbiana durante dez dias consecutivos em fermentações consorciadas (escala piloto) entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*. (A) leveduras totais; (B) bactérias lácticas. Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Percebe-se redução da contagem de bactérias lácticas ao longo do processo fermentativo, demonstrando o efeito inibidor das leveduras, o qual só é minimizado quando os reinóculos acontecem.

A Figura 14 mostra as contagens de leveduras totais e de bactérias lácticas durante os dez dias das fermentações consorciadas. Não houve diferença entre as dornas ($p > 0,05$) para ambas as contagens, entretanto nota-se uma distinção na contagem de bactérias lácticas das dornas que não tiveram reinóculos a cada 48h para as que tiveram (painel B). Este resultado mostra que os reinóculos auxiliaram na manutenção da população bacteriana ao longo dos ciclos, apesar de o *Lactobacillus casei* não conseguir se manter durante a fermentação, corroborando com o descrito por Schwan *et al.* (2001) e Carvalho (2011). Diferentemente do mostrado no experimento de fermentações em escala piloto, quando não foi constatada interferência no crescimento das bactérias lácticas pelas leveduras, este resultado mostra a influência ao acompanhar mais detalhadamente a evolução da microbiota de bactérias lácticas ao longo do ciclo fermentativo. Além disso, constata-se que uma maior contagem de *Lactobacillus casei* não representa queda na viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae*.

Percebe-se ainda que a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta melhor taxa de sobrevivência no meio da fermentação consorciada, predominando sobre o *Lactobacillus casei*. Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Thomas *et al.* (2001), Campos *et al.* (2010) e Duarte *et al.* (2011), relatando que cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* predominaram e causaram efeito inibitório sobre as bactérias lácticas testadas, citando que as leveduras criam condições ambientais favoráveis para a redução da contaminação bacteriana. Segundo Basso *et al.* (1997) a fermentação pode causar uma ação antibacteriana, exercida pela ação do ácido succínico sinergicamente com etanol produzidos pela *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 15 apresenta os resultados dos ésteres lactato de etila e somatório dos ésteres hexanoato, octanoato e decanoato de etila nas cachaças produzidas pelas fermentações consorciadas. Nota-se uma maior quantidade ($p \leq 0,05$) de lactato de etila na dorna 4 em relação à dorna 3, onde a diferença baseia-se somente no tratamento térmico (autoclavagem) do caldo de cana-de-açúcar. Comparando-se o inóculo inicial (dorna 2 x dorna 1) e os reinóculos (dorna 3 x dorna 2) de *Lactobacillus casei*, não há diferença na produção desse éster. Os valores médios encontrados para lactato de etila (Tabela 7) são maiores que os encontrados por Duarte *et al.* (2011), que em trabalho de co-inoculação de *Lactobacillus fermentum* em fermentação para produção de cachaça,

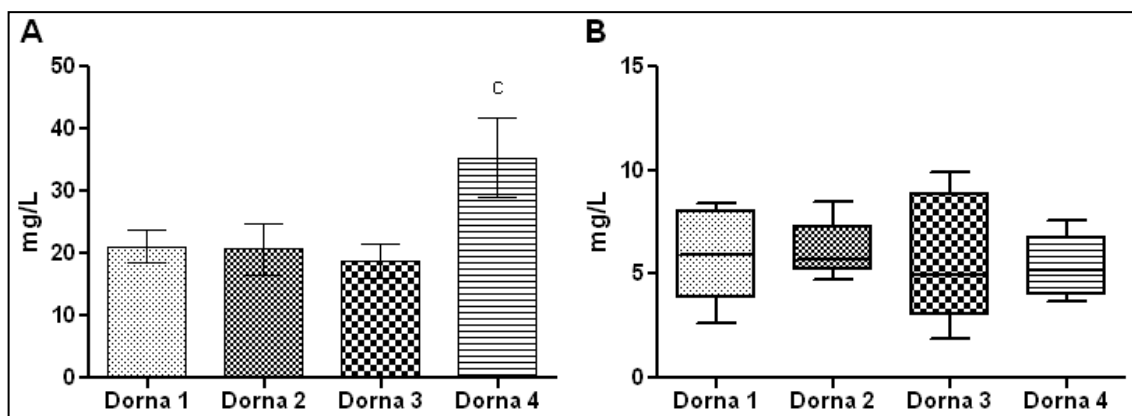


Figura 15 – Presença de lactato de etila (A) e somatório de hexanoato, octanoato e decanoato de etila (B) em cachaças produzidas em fermentações consorciadas (escala piloto) entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*. ‘c’ indica diferença significativa para a Dorna 3 pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 7 – Concentrações dos compostos presentes nas cachaças produzidas em fermentações consorciadas (*Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*) em escala piloto

Composto	Dorna 1	Dorna 2	Dorna 3	Dorna 4
Teor Alcoólico <u>mg/100mL álcool</u>	43,60 ^a ± 1,37	43,40 ^a ± 0,98	44,20 ^a ± 1,52	42,90 ^a ± 1,69
<u>anidro</u>				
Acidez Volátil	12,716 ^a ± 4,141	11,711 ^a ± 3,191	11,442 ^a ± 2,435	17,521 ^b ± 3,471
Acetaldeído	2,973 ^a ± 1,668	4,449 ^a ± 2,678	3,075 ^a ± 1,750	5,866 ^a ± 3,866
Metanol	2,904 ^a ± 1,352	3,067 ^a ± 0,915	3,416 ^a ± 0,861	3,133 ^a ± 0,802
Acetato de etila	0,975 ^a ± 1,014	2,500 ^a ± 2,184	2,967 ^a ± 1,613	3,120 ^a ± 1,958
n-propanol	41,580 ^a ± 5,369	44,120 ^{ab} ± 7,446	44,920 ^{ab} ± 7,466	49,390 ^b ± 5,363
Álcool Isobutílico	46,997 ^a ± 16,173	47,638 ^a ± 17,534	50,055 ^a ± 18,212	62,858 ^a ± 7,655
Álcool Isoamílico	185,598 ^a ± 36,574	206,865 ^{ab} ± 33,838	201,517 ^{ab} ± 33,564	242,423 ^b ± 25,109
Álcoois Superiores	274,175 ^a ± 53,551	298,627 ^{ab} ± 50,7383	312,633 ^{ab} ± 73,286	354,667 ^b ± 27,778
<u>mg/L</u>				
Cobre	3,223 ^a ± 0,700	3,036 ^a ± 0,502	3,033 ^a ± 0,564	4,141 ^b ± 0,537
Lactato de Etila	21,073 ^{ab} ± 8,010	20,649 ^{ab} ± 12,235	18,753 ^a ± 8,118	35,300 ^b ± 18,141
Hexanoato de Etila	0,149 ^a ± 0,057	0,154 ^a ± 0,019	0,156 ^a ± 0,039	0,256 ^b ± 0,081
Octanoato de Etila	0,533 ^a ± 0,163	0,605 ^a ± 0,106	0,602 ^a ± 0,341	0,691 ^a ± 0,271
Decanoato de Etila	5,182 ^a ± 2,031	5,369 ^a ± 1,225	4,979 ^a ± 2,597	4,451 ^a ± 1,161

Resultados expressos em “Média ± Desvio Padrão”; n=9

Valores identificados com as mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de significância (teste de Tukey).

encontraram valores médios de 0,26 mg/L nas bebidas oriundas das dornas com o inóculo da bactéria láctica. Além disso, contrastando com nossos resultados, estes autores encontraram redução nos níveis de lactato de etila em cachaças produzidas em consorciação com *Lactobacillus fermentum*.

Este fato pode residir na diferença do metabolismo entre as bactérias lácticas (*Lactobacillus casei* é homofermentativa e *Lactobacillus fermentum* é heterofermentativa) assim como na interação entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria láctica correspondente, como constatado por Carvalho (2011).

Nascimento *et al.* (2008) também encontraram valores médios próximos ao deste trabalho (27,1 mg/L), entretanto a grande variabilidade de seus resultados (0,0367 a 244 mg/L) pode ser explicada por ser um trabalho de levantamento do perfil químico de ésteres presentes em aguardentes do estado de São Paulo. Diferentemente do exposto por esse autor, dizendo que a ocorrência do lactato de etila em cachaças está relacionada à presença de *Lactobacillus* sp., os resultados deste trabalho mostram que a adição e os reinóculos de *Lactobacillus casei* não garantem, necessariamente, uma maior presença de lactato de etila. Constata-se que a relação entre a cepa de levedura e a espécie de bactéria láctica presente é fator importante para a presença do éster em estudo, pois quando presente na fermentação somente a cepa *Saccharomyces cerevisiae* com o *Lactobacillus casei* (Figura 15A, dorna 4) houve maior quantidade de lactato de etila quando comparado às outras dornas que não tiveram o tratamento térmico (autoclavagem) do caldo.

Com relação aos resultados dos ésteres de ácidos graxos de cadeia média (hexanoato, octanoato e decanoato de etila) estão representados na Figura 10B, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as dornas. Resultados semelhantes foram relatados por Nascimento *et al.* (2008), onde encontraram valores médios de 2,23 mg/100mL a.a. em cachaças comerciais do estado de São Paulo. Duarte *et al.* (2011) encontraram valores mais baixos (0,020 a 0,033 mg/L) para octanoato de etila que aqueles em nosso trabalho (Tabela 7). Apesar da produção de ésteres ser extremamente dependente da cepa de levedura utilizada durante a fermentação, muitas variáveis do ambiente fermentativo podem afetar a regulação dos níveis de ésteres. Isto ocorre, por exemplo, com a diminuição nos níveis de ésteres quando a fermentação ocorre com presença de oxigenação e altos níveis de ácidos graxos insaturados no meio fermentativo. O aumento de temperatura na fermentação pode aumentar os níveis de

ésteres, exceto para o hexanoato de etila (Saerens *et al.*, 2008).

A Tabela 7 resume os valores médios e desvio padrão dos parâmetros químicos avaliados nas cachaças produzidas nas fermentações consorciadas. Outro éster analisado foi o acetato de etila, que não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados. Os resultados encontrados são menores que aqueles relatados na literatura em cachaças comerciais, em torno de 45 mg/100mL de álcool anidro (Silva *et al.*, 2009 e Nascimento *et al.*, 2008), e bem abaixo do máximo permitido pela legislação brasileira (Anexo 1). Essa diferença pode ser explicada pelo fato das cachaças avaliadas serem recém destiladas e a concentração deste composto tende a aumentar durante o envelhecimento (Parazzi *et al.*, 2008).

Sobre a acidez volátil da cachaça produzida, observa-se que os valores obtidos são inferiores ao máximo permitido pela legislação brasileira (Anexo 1), podendo ser justificados pelas condições controladas de higiene do ambiente, equipamentos, utensílios e equipe técnica durante o período do experimento. Percebe-se ainda que a dorna 4 foi diferente das demais ($p \leq 0,05$), podendo-se inferir que a adição (dorna 2) e os reinóculos (dorna 3) de *Lactobacillus casei* na fermentação não interferem na acidez volátil. Resultados semelhantes foram encontrados por Duarte *et al.* (2011), realizando a co-inoculação com *Lactobacillus fermentum* para a produção de cachaça, com valores médios de 28,72 mg/100 mL a.a. em cachaças produzidas somente com *Saccharomyces cerevisiae* e valores médios de 33,79 mg/100 mL a.a. naquelas produzidas com o co-inóculo da bactéria láctica avaliada. Já Sousa (2005), avaliando a interação de *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça artesanal, constatou aumento da acidez volátil nas cachaças produzidas com a bactéria láctica e maior rejeição sensorial das mesmas.

Avaliando diferentes tempos de inoculação da bactéria láctica iniciadora da fermentação maloláctica em vinhos, *Oenococcus oeni*, Semon *et al.* (2001) não observou diferença na acidez volátil dos vinhos, corroborando com nossos resultados relacionados ao tempo de inoculação de *Lactobacillus casei* (somente inóculo inicial na dorna 2 e inóculo inicial e reinóculos na dorna 3). Ainda segundo esses autores, e diferentemente de nossos resultados (Tabela 7), houve aumento na acidez volátil de vinhos que passaram pela fermentação maloláctica, mesmo não alcançando concentrações indesejáveis.

Analisando-se ainda a Tabela 7, o tratamento de autoclavagem do caldo (121

°C/15 min), aliado à presença exclusiva do *Lactobacillus casei* junto à *Saccharomyces cerevisiae*, parece exercer um efeito negativo sobre a acidez volátil das cachaças. Vários autores têm descrito que a qualidade da cachaça depende da ecologia microbiana durante a fermentação espontânea (Pataro *et al.* 1998; 2000; Guerra, 2001). Contrastando com nossos resultados, Duarte *et al.* (2012) relataram que a interação entre *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces* aumentou a produção de ácido acético no caldo fermentado de cana-de-açúcar, comparado a uma cepa pura de *Saccharomyces cerevisiae*. Em vinhos e tequila, as leveduras não-*Saccharomyces* têm sido estudadas (Romano *et al.*, 2003, Arrizon, 2006, López-Alvarez *et al.*, 2012), encontrando benefícios na composição volátil das bebidas, mas relatando aumento de produção de ácido acético do vinho (Viana *et al.*, 2008). Além disso, a autoclavagem pode ter influenciado na composição dos açúcares presentes no meio, visto que a sacarose é hidrolisada a glicose e frutose quando submetida a esse processo (Büter *et al.*, 1993 citado por Peixoto e Pasqual, 1995), influenciando o metabolismo dos microorganismos ali presentes e a cinética da fermentação.

Em relação aos álcoois superiores sabe-se que estes compostos podem ser sintetizados pela ação das leveduras através de dois mecanismos: via anabólica pela glicose ou catabólica por seu aminoácido correspondente (Li *et al.*, 2008). Portanto a composição dos aminoácidos presentes no meio influencia a presença desses compostos. Como pode ser visto na Figura 16 constata-se uma maior quantidade de álcoois superiores nas cachaças produzidas pelas dornas com a presença de *Lactobacillus casei*, mas principalmente na dorna abastecida com caldo submetido ao processo de autoclavagem ($p \leq 0,05$). Este resultado mostra que com a presença do *Lactobacillus casei* e a autoclavagem do meio, há maior quantidade de álcoois superiores na cachaça. Duarte *et al.* (2011) também encontraram valores mais elevados (e semelhantes) desses compostos nas cachaças produzidas em co-inoculação com *Lactobacillus fermentum*, mas sem diferença significativa.

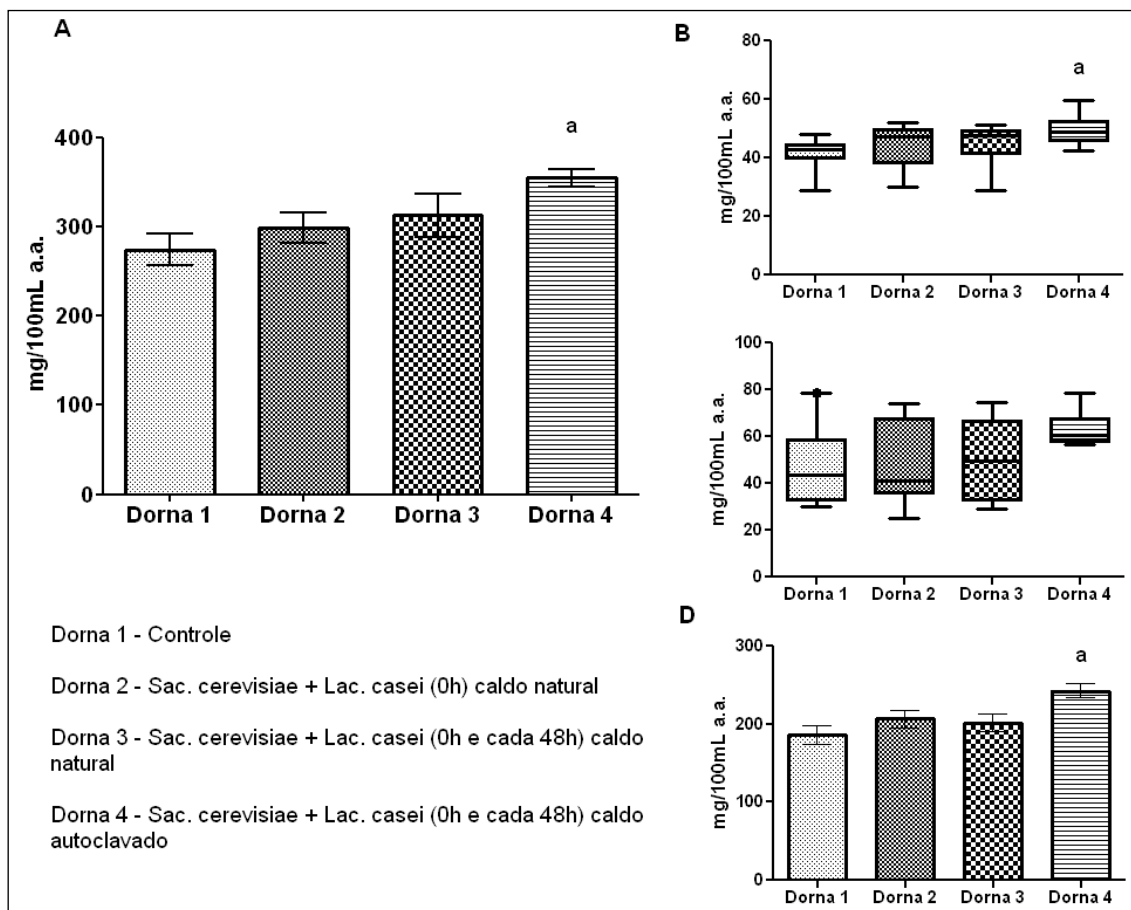


Figura 16 – Presença de Álcoois Superiores em cachaças produzidas em fermentações consorciadas (escala piloto) entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*. (A) Soma total, (B) n-propanol, (C) isobutanol e (D) álcool isoamílico. “a” indica diferença significativa para a Dorna 1 pelo teste de Tukey a 5% de significância.

6.4 – Testes de aceitação das bebidas

6.4.1 – Teste de comparação múltipla

O teste de comparação múltipla é um dos testes recomendados, dentro da categoria de testes discriminativos, para avaliar diferenças entre amostras. A sua escolha para este trabalho se deu em função da sua característica metodológica que consiste na comparação de uma ou mais amostras a serem analisadas que serão avaliadas em relação a uma amostra padrão ou de referência.

Este método apresenta como especificidade a avaliação pelos provadores da própria amostra padrão, sendo que esta é inserida dentro do conjunto de amostras a serem provadas, de forma codificada para que o provador não a identifique. Esta conduta refere-se à necessidade de verificar se o provador consegue identificar uma amostra igual aquela que lhe foi informada que seria o padrão (Meilgaard *et. al.*, 1999). E, desta forma, é possível verificar a sua habilidade no teste que requer treinamento e repetibilidade dos seus resultados. As repetições requeridas são também de um mínimo de três, assim como, no teste triangular. No entanto, neste estudo foram elaboradas quatro repetições do teste, uma vez que os provadores não puderam passar por um treinamento mais adequado para a análise das amostras.

Os valores médios das notas obtidas no teste de comparação múltipla, através de uma escala de nove pontos, para os atributos aroma, sabor, acidez e aroma frutado estão descritos na Tabela 8. Pode-se perceber que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) na percepção do aroma, sabor, acidez e aroma frutado das amostras de cachaças oriundas das diferentes condições experimentais avaliadas. Sendo assim, pode-se inferir dos resultados que os inóculos e reinóculos de *Lactobacillus casei* não interferem na percepção sensorial, para os descritores avaliados, da bebida produzida. Diferentemente do nosso trabalho, Duarte *et al.* (2011) encontraram diferenças nas cachaças oriundas de dornas com inóculos de *Lactobacillus fermentum*, sendo bebidas com menor aceitação pelos consumidores, principalmente no atributo sabor.

Tabela 8 – Valores médios das notas obtidas para os atributos aroma, sabor, acidez e aroma frutado no teste de comparação múltipla.

Atributos (MDS)	Amostras			
	Dorna 1	Dorna 2	Dorna 3	Dorna 4
Aroma (0,89)	4,90 ^a	4,48 ^a	5,19 ^a	5,00 ^a
Sabor (0,91)	5,05 ^a	4,81 ^a	4,90 ^a	5,05 ^a
Acidez (0,84)	4,71 ^a	5,05 ^a	4,95 ^a	4,95 ^a
Aroma Frutado (0,94)	5,38 ^a	5,71 ^a	5,10 ^a	5,00 ^a

Legenda: MDS – mínima diferença significativa; Letras sobrescritas - iguais, na mesma linha, indicam que não existe diferença significativa (nível de 5%) por teste de médias de Dunnett

A figura 17 mostra os resultados analisando-se o comportamento de cada descritor avaliado. No painel A, correspondente a aroma, observou-se que as dornas 3 (reinóculos) e 4 (caldo autoclavado e reinóculos) produziram uma maior percepção sensorial nos provadores. Em relação ao aroma é possível inferir que os reinóculos, além do tratamento do caldo, não interferem na percepção desse descritor em relação à dorna controle (Dorna 1), indicando que o *Lactobacillus casei* não deprecia a bebida nesse quesito.

Em relação ao sabor (Fig. 17B) nota-se que a percepção sensorial não foi alterada em função do tratamento do caldo, e ainda que a presença de leveduras e reinóculos foram suficientes para manter essa percepção (dornas 1 e 4). Cachaças oriundas da dorna 4 tiveram maior percepção sensorial dos descritores aroma e sabor, o que corrobora com os resultados das análises químicas, indicando que a maior quantidade de ésteres e álcoois superiores encontrados nesta dorna influenciam estes dois parâmetros sensoriais.

Para acidez observa-se uma maior percepção do descritor nas amostras oriundas de dornas com os inóculos de *Lactobacillus casei* (Fig. 17C). Nesse mesmo sentido, para as dornas com reinóculos de *Lactobacillus casei* (Dorna 3 e 4), houve uma menor percepção sensorial para o descritor aroma frutado que pode ter sido mascarado justamente pelo aumento da percepção da acidez (Fig. 17D).

6.4.2 – Teste de aceitação de consumidores

Os testes de aceitação são empregados quando a finalidade é avaliar se os consumidores gostam ou desgostam do produto. As escalas usadas nestes testes podem ser balanceadas ou não balanceadas. As escalas balanceadas são as mais aplicadas, sendo consideradas mais discriminativas e discutidas por apresentarem igual ao número de categorias positivas e negativas e termos igualmente espaçados, ao contrário das não-balanceadas. As escalas não balanceadas proporcionam mais termos do lado positivo do que do negativo e os termos são mais espaçados (Minim, 2006). De acordo com Cardello *et al.* (2000), o teste de aceitação é hábil para cogitar o grau de aceitabilidade pelo consumidor de determinado produto.

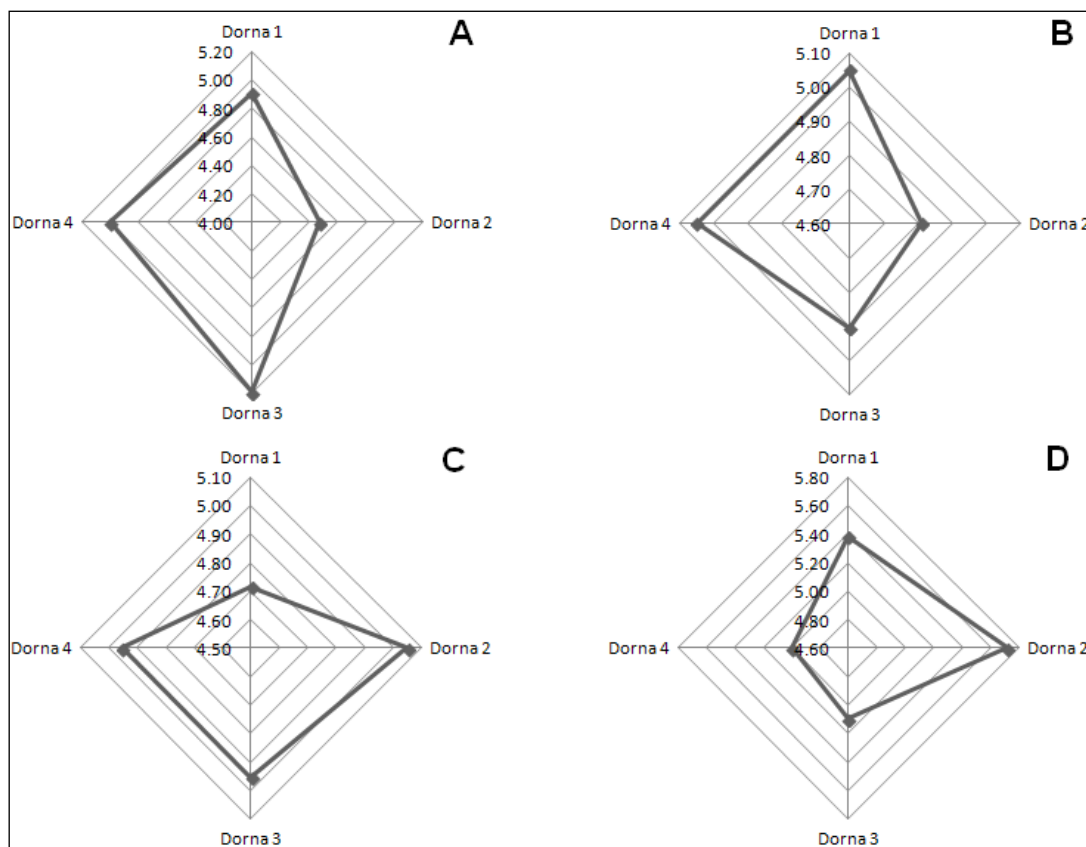


Figura 17 – Análise dos descritores Aroma (A), Sabor (B), Acidez (C) e Aroma Frutado (D) das cachaças produzidas nas condições experimentais adotadas. Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) para os descritores, entretanto pode-se observar diferentes comportamentos para as dornas avaliadas, especialmente maior percepção do descritor acidez para as dornas contendo *Lactobacillus casei* e maior percepção de aroma e sabor para a dorna 4, correspondendo à maior quantidade de ésteres e álcoois superiores nas análises químicas.

Com relação às características dos consumidores, a faixa etária 21 a 25 anos foi o grupo que obteve maior participação no teste de aceitação com 50%. Isso corrobora o trabalho de Carneiro (2007), onde a faixa etária predominante foi entre 20 e 49 anos. Com relação ao sexo verificou-se que 69% eram do sexo masculino, confirmando dados de Coutinho (2003), que relata a predominância de homens no consumo da cachaça. Com relação a frequência de consumo, 25% dos consumidores participantes do teste de aceitação fazem consumo de cachaça ocasionalmente e a razão do consumo que a maioria o faz por prazer (53%), dados semelhantes aos de Castro *et al.* (2008).

Os resultados para avaliação global pelos consumidores no teste de aceitação estão resumidos na Figura 18. As amostras foram aceitas pelos consumidores em relação à impressão global, pois apresentam notas de avaliação sensorial entre 6 e 8 na escala hedônica, não apresentando diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre cachaças oriundas das diferentes condições experimentais. Esses resultados se assemelham aos de Oliveira (2006) que observou que as cachaças produzidas apresentaram variações nos teores dos principais compostos secundários, que não resultaram em diferenças perceptíveis em relação aos atributos de impressão global. Entretanto diferem do apresentado por Duarte *et al.* (2011), que encontraram piores avaliações para os descritores impressão global, aroma e sabor (principalmente) das cachaças oriundas de dornas com fermentação consorciada com *Lactobacillus fermentum*.

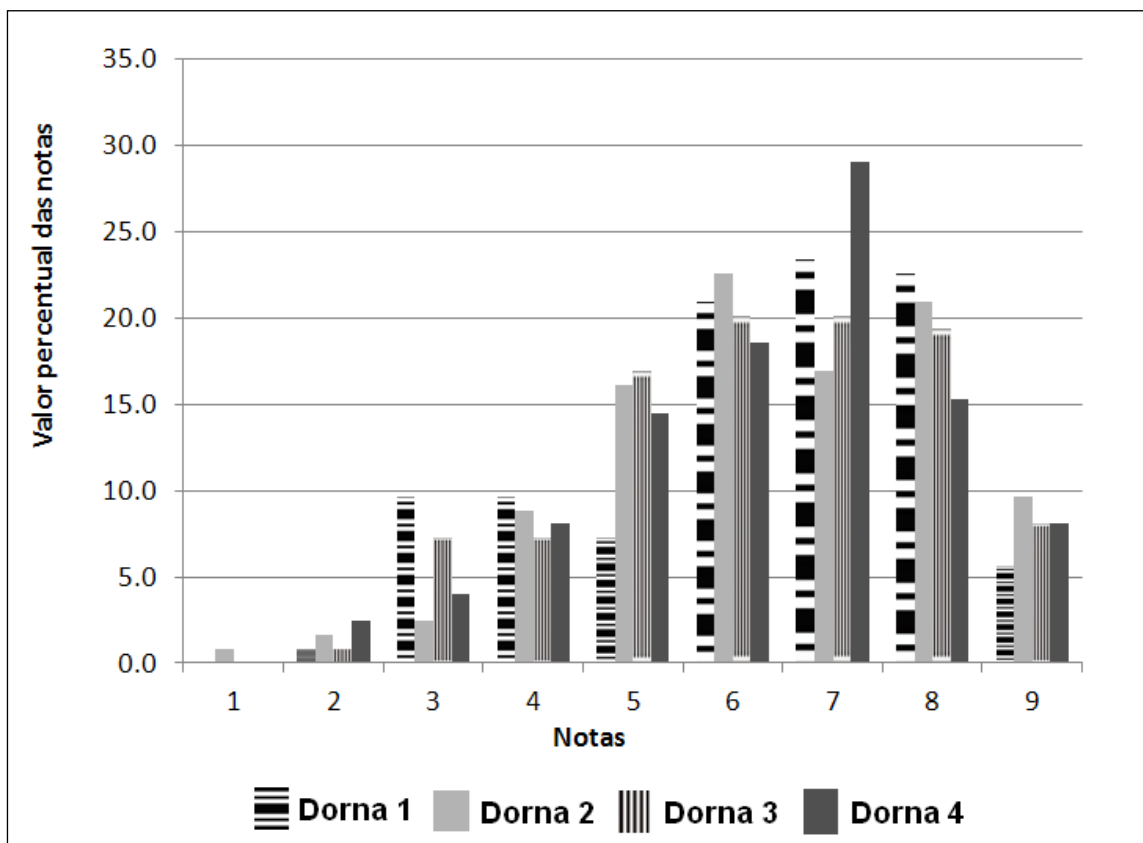


Figura 18 – Resultados de impressão global no teste de aceitação, com 124 consumidores, das cachaças oriundas das diferentes dornas das fermentações consorciadas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*. Não houve diferença entre as amostras indicando que os inóculos de *Lactobacillus casei* não influenciaram a aceitação das cachaças nas condições avaliadas.

7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Não existe correlação entre contagem de bactérias lácticas e produção de lactato de etila. Nas condições de fermentação em escala piloto avaliadas, pode-se constatar que a interação entre as cepas de leveduras e bactérias lácticas presentes na dorna de fermentação é determinante para uma maior ou menor produção do éster em estudo.
- O gênero *Lactobacillus* spp é o predominante entre as bactérias lácticas na fermentação de cachaça. Parece que na região de Salinas/MG há predominância do *Lactobacillus casei* no processo fermentativo. É importante realizar mais estudos de caracterização molecular de bactérias lácticas da região, abrangendo mais alambiques para se ter um melhor perfil microbiano.
- A presença de *Lactobacillus casei* não interfere na taxa de consumo de sólidos solúveis e rendimento alcoólico pela *Saccharomyces cerevisiae*, assim como não acarretou em aumento da acidez do mosto fermentativo.
- O *Lactobacillus casei* não se mantém ao longo dos ciclos fermentativos sem ajuda dos re-inóculos. Estudos mostrando em detalhes a evolução dos açúcares presentes na fermentação podem fornecer dados importantes sobre esse comportamento ao longo dos ciclos fermentativos.
- Ficou evidenciado que o tratamento térmico do caldo de cana não trouxe prejuízos significativos para os parâmetros fermentativos avaliados. Mais estudos devem ser realizados analisando-se a composição química do caldo autoclavado, como concentração de açúcares redutores, aminoácidos, dentre outros, que possam contribuir para elucidar a menor velocidade fermentativa encontrada.
- A interação entre as cepas dos micro-organismos utilizados na fermentação consorciada (*Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei*), é determinante para uma maior produção de lactato de etila e álcoois superiores. Estudos verificando a composição de aminoácidos e açúcares redutores (inclusive produtos da reação de Maillard) devem ser realizados para dar mais subsídios a esse comportamento.

- As inoculações de *Lactobacillus casei* nas fermentações não depreciaram o produto final, contribuindo, ainda, para uma maior percepção sensorial de atributos como aroma e sabor.
- Experimentos em escala de produção devem ser realizados para verificar o comportamento dessa interação. Sugere-se a aplicação de técnicas como liofilização para otimizar o inóculo das bactérias lácticas assim como o uso de pasteurizador de caldo-de-cana para o tratamento térmico do caldo que irá abastecer as dornas de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Determinação do teor alcoólico – NBR 138920. São Paulo: ABNT, 1997a.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856. São Paulo: ABNT, 1997b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS (ABRABE) (2008). A Cachaça. <http://www.abrabe.org.br/cachaca>. (25/03/2013).

Alterthum F., Cruz M.R.M., Vairo M.L.R. et al. (1984). Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, **3**:42-49.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., et al. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**:403-410.

AMPAQ (2007) - Associação mineira dos produtores de cachaça de qualidade. <http://www.ampaq.com.br>. (25/03/2013).

Angelis D. F. (1992). Agente físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação etanólica. In: *Aguardente de cana: produção e qualidade*. Mutton, M. J. R., Mutton, M. A. Jaboticabal: UNESP-FCAV, pp.49-65.

Arrizon J., Concetta F., Acosta G., Romano P., & Gschaedler A. (2006). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**:181–189.

Barry T., Colleran G., Glennon M. et al. (1991). The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Research*, **1**:51-56.

Basso L.C., Alves D.M.G., Amorim H.V.(1997). The antibacterial action of succinic acid production by yeast during fermentation. *Revista de Microbiologia*, **28**:77-82.

Bayrock D., Ingledew W.M. (2005). Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**:83-88.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Decreto nº 2314 de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização produção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**, Brasília, 05 de setembro de 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial**, Brasília, 30 de junho 2005a, nº 124, Seção 1, p 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005. **Diário Oficial**, Brasília, 20 de setembro de 2005b, Seção 1, p11.

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

Câmara, Marcelo. (2004). *Cachaça: prazer brasileiro*. Rio de Janeiro: Mauad.

Campos C.R., Silva C.F., Dias D.R., Basso L.C., Amorim H.V., Schwan R. F. (2010). Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **108**:1871–9.

Cardello H.M.A.B.; Faria J.B. (1997). Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardentes de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho. *B. CEPPA*, **15**:87-100.

Cardoso D. R., Lima-Neto B. S., Franco D. W. (2003). Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. *Química Nova*, **26**:165–169.

Carvalho S. A. (2001). Efeito do envelhecimento em tonéis de três espécies de madeira sobre a qualidade sensorial de aguardente de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Carvalho F.P. (2004). Avaliação da interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação da cachaça artesanal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Carvalho, B.T. (2011). Fermentação consorciada leveduras/bactérias lácticas aplicada à produção de cachaça como possibilidade de melhoria do padrão de qualidade. Dissertação de Mestrado. NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

Carvalho-Netto O.V., Rosa D.D., Camargo L.E.A. (2008). Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Scientia Agricola*, **65**:508-515.

Cassini, C. E. B. (2004). Produção de aguardente de cana-de-açúcar por células imobilizadas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Cherubin, R.A. (2003). Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP.

- Coutinho, E.P. (2003a). Aspectos da evolução do mercado da cachaça. XXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção - Ouro Preto, MG, Brasil.
- Coutinho, E. P. (2003b). Práticas Ultrapassadas e Mitos de Qualidade na Cadeia de Produção de Cachaça Artesanal. XXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção - Ouro Preto, MG, Brasil.
- Davis C. R., Wibowo D., Eschenbruch R. *et al.* (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**:290-301.
- De Souza A.P.G, Vicente M.A., Klein R.C., Fietto L.G., Coutrim M.X., Afonso R.J.C.F., Araújo L.A., Da Silva P.H.A., Bouillet L.E.M., Castro I.M., Brandão R.L. (2012). Strategies to select yeast starter culture for production of flavor compounds in cachaça fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**:379–392.
- Dias, D. R. (2001). *Elaboração de bebidas fermentada a partir de frutas tropicais*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. MG.
- Duarte W.F., De Sousa V.F., Dias D.R. & Schwan R.F. (2011). Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. *Journal of food science*, **76**:1307-1318.
- Duarte W.F., Amorim J.C. & Schwan R.F. (2012). The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek*, DOI 10.1007/s10482-012-9798-8, online publication.
- Edwards C.G., Beelman R.B., Bartley C.E. *et al.* (1990). Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**:48–56.
- Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S. & Ribereau-Gayon D.P. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, **48**:1034-1038.
- Fugelsang K.C. & Zoecklein B.W. (1993). MLF survey. *Practical Winery and Vineyard*. **9**:12–18.
- Galinaro C. A. (2006). Distinção entre cachaça produzida com cana-de-açúcar queimada e não queimada. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.
- Gallo C.R. (1992). Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *STAB*, **10**:30-34.
- Garabal J.I. (2007). Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products.

International Microbiology, **10**:1-3.

Gomes W.O. O perfil da cachaça. (2004). Biblioteca Digital SEBRAE, BDS: SEBRAE.

Gomes F.S. (2009). Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, SP.

Gomes, F.C.O., Silva, C.L.C., Vianna, C.R. et al. (2010). Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**:486-492.

Gonçalves M. F., Vidal M. F., Figueiredo Junior C. A. (2008). *Cachaça e rapadura na área de jurisdição do BNB: produção, tecnologia e mercado*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil.

Guedes P.A., & Riffkin H.L., (1989). Influence of lactic acid bacteria on aldehyde, ester and higher alcohol formation during Scotch whisky fermentations. In: *Distilled beverage flavour: recent developments*. PIGGOTT, J.A.; PATERSON, A. New York: VCH, p.193-199.

Guerra J. B., Araújo R. C. A., Pataro C., Franco G. R., Moreira E. S. A., Mendonça-Hagler L. C. & Rosa C. A., (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal “cachaça”. *Letters in Applied Microbiology*. **33**:106–111.

Gurtler V. & Stanisich V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**:3–16.

Hart H., Schuetz R. D. (1983). *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Campus, p. 218-244.

Huang Y.C., Edwards C.G., Peterson J.C. et al. (1996). Relationship between sluggish fermentations of grape juice and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**:1–10.

Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer.

Júnior A. F. (2008). Influência do fracionamento no destilado para a otimização da produção da cachaça de alambique: uma prática pedagógica no processo produtivo. Dissertação de Mestrado - Instituto de Agronomia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Jussier D., Morneau A.D., Orduña R.M. (2006). Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:221–227.

- Kabadjova P., Dousset X., Le Cam V., Prevost H. (2002). Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied of Environmental Microbiology*, **68**:5358-5366.
- Kaji K.A. & Canhos V.P. (1989). Contaminantes do processo de produção de açúcar e álcool. In: Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool. EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P. *et al.* Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, p. 1-9.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**:209-24.
- Khan A.R., Hoq M.M. (1990). Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. *Bangladesh Journal of Microbiology*, **7**:119-121.
- Lachance M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **68**:151-160.
- Lambrechts M.G. & Pretorius I.S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**:97- 129.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. (1995). Bioquímica. 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher, v.1, 262 p.
- Li H., Tao Y.S., Wang H., Zhang L. (2008). Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *European Food Research and Technology*, **227**:287-292.
- Lima, U.A. (1992). Produção nacional de aguardentes e potencialidade dos mercados interno e externo. In: Aguardente de cana: produção e qualidade. Mutton M.J.R.; Mutton M.A. (Eds). Jaboticabal: FUNEP, p.54-98.
- Lima Neto B. S., Franco D.W. (1994). A aguardente e o controle químico de sua qualidade. *Engarrafador Moderno*, **4**:5-8.
- Liu S.Q. (2002). A review: malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. **92**:589-601.
- Liu S.Q. (2003). Review article: Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **83**:115-131.
- Lloret A.; Boido E.; Lorenzo D. et al. (2002). Aroma variation in Tannat wines: effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. Short communication. *Italian Journal of Food Science*, **2**:175-180.
- Lonvaud-Funel A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular

aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 126:209-214.

López-Alvarez A., Díaz-Pérez A.L., Sosa-Aguirre A., Macías-Rodríguez L. E, Campos-García J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**:614–618.

Ludwig K.M., Oliva-Neto P. & Angelis D.F.D. (2001). Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **21**:63-66.

Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed.

Maia A. B. R. A., De Campelo E. A. P. (2005). *Tecnologia da cachaça de alambique*. Belo Horizonte: SEBRAE-MG / SINDBEBIDAS, 129 p.

Maicas S., Gil J.V., Pardo I., Ferrer S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* **32**:491-496.

Makanjuola D.B., Tymon A. & Springham D.G. (1992). Some effects of lactic acid bacteria on laboratory scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* **14**:351-357.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2013/02/cachaca-e-reconhecida-como-produto-exclusivo-do-brasil>. (15/05/2013).

Moreira J. L.S., Mota R.M., Horta M.F. *et al.* (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, 5:15.

Morais P.B., Rosa C.A., Linardi V.R. *et al.* (1997). Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**:241-243.

Narendranath N., Hynes S., Thomas K. & Ingledew W. (1997). Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, p.4158- 4163.

Nascimento E.S.P.D. (2007). Ésteres em aguardente de cana: seu perfil. Tese de Doutorado, Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), São Carlos,SP.

NASCIMENTO E.S.P., CARDOSO D.R. & FRANCO D.W. (2008). Quantitative Ester Analysis in Cachaça and Distilled Spirits by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:5488-5493.

Nascimento R. F., Cardoso D. R., Lima-Neto B. S. Faria J. B., Franco D. W. (1998). Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. *Química Nova*, **21**:735-739.

Nielsen J. & Richelieu M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 740 -745.

Nobre T.D.P. (2005). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, SP.

Nobre T.P., Horri J., Alcarde A.R. (2007). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27:20-25.

Nóbrega I.C.D.C. (2003). Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do "headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23:210 - 216.

Novaes F.V., Stpiello J.P., Oliveira A.J. et. al. (1971). "Tecnologia das aguardentes". Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Tecnologia Rural.

Oliva Neto P.D. (1995). Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Tese de doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos (DCA) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Oliva-Neto P. & Yokoya F. (1996). Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **16**:170-174.

Oliveira E.R. & Ribeiro E. M. (2000). Indústria Rural, Agricultura Familiar e Desenvolvimento Local: O Caso da Produção de Cachaça Artesanal em Salinas – Minas Gerais. X Seminário sobre a Economia Mineira. Diamantina, MG.

Oliveira E.D.S. Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.

Oliveira I. T. (2004). Determinantes da Formulação de estratégia em Indústrias

Emergentes: Análise do Setor de Destilarias de Cachaça Artesanal de Qualidade (AMPAQ). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

Oliveira E. S., Maia A. B. R. A, Rosa C. A. *et al.* (2006). Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não produtoras de h₂s e de referência). *B.CEPPA*, **24**: 405-422..

Oliveira V.A., Vicente M.A., Fietto L.G. *et al.* (2008). Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**:693-701.

Oliveira-Freguglia R.M. & Horii J. (2008). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. *Scientia Agricola*, **55**:520-527. 1998.

Parazzi C., Arthur C.M., Lopes, J.J.C., Borges M.T.M.R. (2008). Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, **28**:193-199.

Pataro C., Santos A., Correa S. R., Morais P. B., Linardi V. R., Rosa C. R. (1998). Physiological characterization of yeast isolated from artisanal fermentation in aguardente distillery. *Revista de Microbiologia* **29**:104-108.

Pataro C., Guerra J.B., Petrillo-Peixoto M.L. *et al.* (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, **88**:1-9.

Pataro C., Gomes F.C.O., Araújo R.A.C. *et al.* (2002). Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, **23**:37-43.

Peddie H.A.B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Breweing*, **96**:327-331.

Peixoto P.H.P & Pasqual M. (1995). Influência da autoclavagem e filtração da sacarose na multiplicação *in vitro* da videira. *Revista Ceres*, **42**:599-604.

Perestrello R., Fernandes A., Albuquerque F.F., Marques J.C., Camara J.S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, **563**:154–164.

Pozo-Bayon M., Alegria E., Polo M., Tenorio C., Martin-Alvarez P., De La Banda M., Ruiz-Larrea F. & Moreno-Arribas M. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2**:8729-8735.

- Regodon J., Perez F., Valdes M., Demiguel C. & Ramirez M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, 247-254.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso A. & Capece A. (2003). Function of yeasts species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**:169–180.
- Ruiz P., Izquierdo P., Sesena S. & Palop M. (2010). Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control*, 70 - 75.
- Sabate J., Cano J., Querol. A., Guillamón J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations: analysis for two consecutive years. Letters of Applied Microbiology. **26**:452-455.
- Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijck P., Thevelein J.M., Delvaux F.R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied Environmental Microbiology* **74**:454–461.
- Salminen S., Von Wright A. (1993). *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 442p.
- Sanni A. I., Lonner C. (1993). Identification of yeast isolated Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* **10**:517-523.
- Schwan F.F., Mendonça A.T., Silva Junior J.J. *et al.* (2001). Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, **79**:89-96.
- Sebrae/MG. (2001). *Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais*. Belo Horizonte: 241 p.
- Sebrae. (2002). *Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique de minas gerais*.
- Sebrae/NA. (2008). *Cachaça artesanal: estudos de mercado SEBRAE, ESPM 2008: relatório completo*. Série Mercado, 152 p.
- Sefa-Dedeh S., Sanni A. I., Tetteh G. Sakyi-Dawson E. (1999). Yeast in the traditional brewing of pito in Ghana. *World Journal Microbiology Biotechnology* **15**:593-597.
- Semon M.J., Edwards C.G., Forsyth D. & Dinn C. (2001). Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **7**:52-59.
- Sousa M.V.F. (2005). Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal. Dissertação de Mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Souza A.P.G. De, Vicente M.A., Klein R.C. *et al.* (2012). Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, **101**:379-392.

Silveira D. da *et al.* (2010). *Anuário Brasileiro da cana-de-açúcar 2010*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz,. 136 p.

Silva P.H.A., Santos J.O., Araújo L.D., Faria F.C., Pereira A.F., De Oliveira V.A., Vicente M.A. & Brandão R.L. (2009). Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**:100-106.

Stroppa C.T., Serra G., Andrietta M.G.S. *et al.* (1998). Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. *STAB*, **16**:35-38.

Tanaka K., Yoshikawa R., Ying C., Kita H., Okamoto K. (2002) Application of zeolite T membrane to vapor-permeation-aided esterification of lactic acid with ethanol. *Chemical Engineering Science*, **57**:1577-1584,

Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Ng J, Munro K., Alatossava T. (1999). Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied Environmental Microbiology*, **65**:4264-4267.

Thomas K., Hynes S. & Ingledew W. (2001). Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*, 819- 828.

Tilsala A., Alatossava T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **35**:49-56.

Turner S., Pryer K.M., Miao V.P.W. & Palmer J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**:327–338.

Ugliano M. & Moio L. (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:10134-10139.

Van Beek S. & Priest F. (2002). Evolution of the lactic bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:297-305.

Venturini Filho W. G. (2005) *Tecnologia de Bebidas*. São Paulo: Edgar Blücher.

Viana F., Gil J.V., Genovés S., Vallés S., Manzanares P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, **25**:778–785.

Vicente M.D.A., Fietto L.G., Miranda I.C., Santos A.N.G., Coutrim M.X. & Brandão R.L. (2006). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit. *International Journal of Food Microbiology*, **108**:51-59.

Vicente M.D.A. (2007). Caracterização Molecular e Bioquímica de Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Utilizadas na Fabricação de Cachaça de Alambique. Tese de doutorado, NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

Vilanova M. & Sieiro C. (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albarino. *Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology*, **33**:929-933.

Yokoya F. (1991). Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. *STAB*, **9**:38-39.

Yokoya, F. (1995). Fabricação de aguardente de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias “André Tosello”.

ANEXO 1 – Padrões de identidade e qualidade para a cachaça segundo Instrução Normativa 13

COMPONENTES	LIMITES	UNIDADE
Gradação Alcoólica	$38 \leq e \leq 48$	% em volume de álcool etílico a 20 °C
Acidez volátil, em ácido acético	≤ 150	mg.(100mL de álcool anidro) ⁻¹
Ésteres totais, em acetato de etila	≤ 200	
Aldeídos totais, em acetaldeído	≤ 30	
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	≤ 5	
Soma dos álcoois superiores *	≤ 360	
Soma dos congêneres **	$200 \leq e \leq 650$	
Álcool metílico	≤ 20	
Álcool séc-butílico	≤ 10	
Álcool n-butílico	≤ 3	
Acroleína	≤ 5	
Carbamato de etila	≤ 150	$\mu\text{g.L}^{-1}$
Chumbo	≤ 200	
Arsênio	≤ 100	
Cobre	≤ 5	mg.L^{-1}

* Álcoois superiores = (isobutílico + isoamílicos + n-propílico)

** Congêneres = (Acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + hidroximetilfurfural + álcoois superiores).

Fonte: Instrução Normativa nº. 13 (Brasil, 2005).

ANEXO 2 – Identificação das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas, com o respectivo produtor de origem, na microrregião de Salinas – MG e utilizadas nos experimentos de fermentação piloto.

Cepas *	Destilaria
630	Cachaça Preciosa
631	Cachaça Preciosa
633	Cachaça Tabua
670	Cachaça EAFSalinas
668 ^a	Cachaça Anísio Santiago
671 ^a	Cachaça Meia Lua
672	Cachaça Cachoeirinha
673	Cachaça Canarina
674 ^a	Cachaça Seleta selvagem
675	Cachaça Seleta Caipira
676	Cachaça Terra de Ouro Curralin
677	Cachaça Terra de Ouro Indaiá
678	Cachaça Salineira F.C.
679	Cachaça Salineira F.P
680 ^a	Cachaça George
681 ^a	Cachaça Lua Cheia

* Cepas isoladas de caldo fermentado da safra 2008.

^a Destilarias utilizadas para isolamento de bactérias lácticas.

ANEXO 3

Teste de comparação múltipla

Nome: _____

Data: ____/____/____

Você está recebendo uma amostra Padrão (P) de cachaça e quatro amostras codificadas. Prove primeiro a amostra Padrão (P) e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas, da esquerda para a direita. Avalie, usando a escala abaixo, o quanto cada amostra difere do Padrão, em termos de aroma, sabor, acidez e aroma frutado.

	Amostra		Nota	
	Aroma	Acidez	Sabor	Frutado
+4 – extremamente mais forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
+3 – muito mais forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
+2 – moderadamente mais forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
+1 – ligeiramente mais forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
0 – igual ao padrão	_____	_____	_____	_____
-1 – ligeiramente menos forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
-2 – moderadamente menos forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
-3 – muito menos forte que o padrão	_____	_____	_____	_____
-4 – extremamente menos forte que o padrão	_____	_____	_____	_____

ANEXO 4

Escala hedônica de nove pontos para teste de aceitação

TESTE DE ACEITAÇÃO PARA CACHAÇA

Provador No. _____

NOME: _____

IDADE: () 21-25 anos () 26-30 anos () 31-40 anos () 40-50 anos () maior 50 anos

SEXO () Feminino () Masculino

Você está recebendo amostras codificadas de cachaça. Avalie cada amostra isoladamente, de forma global, utilizando a escala abaixo e indique o quanto você gostou ou desgostou de cada uma das amostras.

Amostra: _____	Nota: _____
Amostra: _____	Nota: _____

- 9 - Gostei muitíssimo
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei regularmente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Nem gostei / nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei regularmente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei muitíssimo

Por favor, indique assinalando no quadro abaixo, o motivo que o levou a dar a nota para cada uma das amostras, em relação ao seu aroma, sabor e acidez.

Amostras	Aroma Característico da cachaça	Sabor Característico de Cachaça	Acidez Característico da queimação na deglutição	Frutado Característico do aroma de frutas
Amostra _____ _____	<input type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/> adequado <input type="checkbox"/> fraco	<input type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/> adequado <input type="checkbox"/> fraco	<input type="checkbox"/> muito forte <input type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/> adequada	<input type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/> adequado <input type="checkbox"/> fraco

Amostra _____	() forte () adequado () fraco	() forte () adequado () fraco	() muito forte () forte () adequada	() forte () adequado () fraco
Amostra _____	() forte () adequado () fraco	() forte () adequado () fraco	() muito forte () forte () adequada	() forte () adequado () fraco
Amostra _____	() forte () adequado () fraco	() forte () adequado () fraco	() muito forte () forte () adequada	() forte () adequado () fraco

Dados de identificação do consumo de cachaça

1-Você toma cachaça com que frequência:

- Frequentemente (uma ou mais vezes por semana)
- Regularmente (duas a três vezes ao mês)
- Ocasionalmente (uma vez ao mês)
- Quase nunca (2 a 6 vezes ao ano)
- Nunca consome
- Outro, especifique: _____

2-Se você é um consumidor de cachaça, por favor nos indique qual a sua razão de consumo

- por que gosta (prazer)
- por motivos de insatisfação
- hábito na família
- Outros, especifique: _____