

AValiação DE PARâMETROS FERMENTATIVOS DE INÓCULOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE

CLEBER MIRANDA GONÇALVES*
ARISTÓTELES GÓES NETO**
ALICE FERREIRA DA SILVA HUGHES***
SAMUEL DE CARVALHO SILVA****
HENRIQUE REIS SERENO*****
GERVÁSIO PAULO DA SILVA*****
ANA PAULA TROVATTI UETANABARO*****

A Cachaça de Alambique é uma bebida tipicamente brasileira, dotada de sabor e aroma característico, sendo produzida exclusivamente do caldo de cana-de-açúcar, sem a adição de produtos químicos, nos chamados engenhos, e destilada em alambiques de cobre. Na produção da Cachaça de Alambique, o inóculo utilizado na fermentação do caldo de cana pode ser de três tipos. Existem os inóculos selvagens, formados pela microbiota natural existente na cana-de-açúcar; os selecionados, que consistem em linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação da cachaça; e o comercial, que é produto destinado a panificação contendo células da levedura *S. cerevisiae*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o rendimento, a eficiência e a produtividade da fermentação realizada por linhagem selecionada de *S. cerevisiae* SC82, por inóculo selvagem e por inóculo comercial. Verificou-se que o tempo médio fermentativo das três bateladas de fermentações realizadas alcançado pela cepa SC82 foi de 14 h, já o do inóculo comercial foi de 21 h. O inóculo selvagem no final da etapa de multiplicação não conseguiu zerar o Brix da etapa para dar prosseguimento as fermentações e por conta disso foi descartado. Na avaliação do desempenho fermentativo, verificou-se que a cepa SC82 apresentou um rendimento médio (47,46 %), uma eficiência média (92,89 %) e uma produtividade média (1,91 g/Lh) melhor que os valores médios do rendimento (42,90 %), da eficiência (83,95 %) e da produtividade (1,25 g/Lh) alcançados pelo inóculo comercial ao final das três bateladas de fermentações realizadas.

PALAVRAS-CHAVE: CACHAÇA. FERMENTAÇÃO. LEVEDURAS SELECIONADAS. MULTIPLICAÇÃO CELULAR.

* Doutorado em Biotecnologia, Instituto Federal de Sergipe (IFS) – Campus São Cristóvão/SE, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)/BA; (e-mail: cleber_bahia@hotmail.com).

** Pós-Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)/MG, PPGBiotec da UEFS, (e-mail: arigoesneto@gmail.com).

*** Pós-Doutora, UFMG (e-mail: alicefshughes@gmail.com).

**** Pós-doutorando, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)/BA, (e-mail: samuelmicrobiologia@gmail.com).

***** Doutorando, Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos (PPGBBM) da UESC, Instituto Federal Baiano – Campus Senhor do Bonfim/BA, (e-mail: henriquesereno@gmail.com).

***** Doutorando em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual da Bahia (UNEB)/BA, (e-mail: gpaulosilva@yahoo.com.br).

***** Doutora em Ciência de Alimentos, PPGBBM da UESC, (e-mail: aptuetanabaro@gmail.com).

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida destilada tipicamente brasileira que corresponde ao destilado mais consumido no Brasil, ocupando o segundo lugar entre todas as bebidas alcoólicas vendidas no país, ficando atrás somente da cerveja (Barbosa 2013).

O processo de produção da Cachaça de Alambique é feito exclusivamente do caldo de cana, sem a adição de produtos químicos, nos chamados engenhos ou alambiques. A destilaria da Cachaça de Alambique é popularmente chamada de alambique, que é, na verdade, a estrutura de cobre onde é feita a destilação (Cardoso 2006). Basicamente, a produção de Cachaça de Alambique consiste em multiplicar o inóculo, extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho em cachaça por meio da destilação (Maia 2002).

Na produção da Cachaça de Alambique, o inóculo utilizado na fermentação do caldo de cana pode ser preparado de diversas maneiras, conforme a experiência de cada produtor. Existem os inóculos naturais, os selecionados e os prensados (Malta 2006). No inóculo natural, dito selvagem, cada produtor possui sua receita e seu método e o agente fermentativo é a microbiota natural existente que acompanha a cana-de-açúcar desde a lavoura. Já o inóculo prensado é um produto comercial contendo células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, preparado para servir aos propósitos da panificação e não para fazer cachaça. Por sua vez, o inóculo selecionado consiste em linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação da cachaça (Pereira, Rosa e Faria 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o rendimento, a eficiência e a produtividade de três bateladas de fermentações realizadas por linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* SC82, por inóculo selvagem e por inóculo comercial, e com isso verificar o desempenho fermentativo dos referidos inóculos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 INÓCULOS PARA A FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA

Para a avaliação dos parâmetros fermentativos (rendimento, eficiência e produtividade), foram utilizados três inóculos. A linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*, SC82, isolada de fermentações em fábricas de cachaça, localizadas no estado da Bahia, Brasil. Essa cepa foi identificada bioquimicamente e molecularmente como *Saccharomyces cerevisiae* no trabalho de Silva (2009). O inóculo comercial (fermento biológico seco instantâneo), disponibilizado comercialmente na forma de sachê (10g), contendo células liofilizadas da levedura *S. cerevisiae*. E o inóculo selvagem que corresponde a microbiota presente no caldo de cana utilizado para a fermentação dos citados inóculos.

2.2 REATIVAÇÃO DOS INÓCULOS PARA A FERMENTAÇÃO

A levedura selecionada SC82 foi reativada em **água sabouraud dextrose e em seguida incubada na estufa a 30°C durante 24 h.**

Para o inóculo comercial, adotou-se primeiro o procedimento de transferir assepticamente metade do conteúdo do sachê de 10g, do fermento biológico seco instantâneo, para 100 mL de caldo sabouraud dextrose estéril e em seguida foi incubado em agitador tipo shaker a 150 rpm, temperatura de 30°C/24h. Após as 24h, foi transferido uma alçada da cultura pura para uma placa de Petri estéril com água sabouraud dextrose e depois foi incubada na estufa a 30°C/24h. Depois das 24 h de incubação, foi transferida uma alçada carregada da cultura pura para quatro placas de

Petri com ágar sabouraud dextrose e em seguida foram incubadas na estufa a 30°C por 24 h.

Para o inóculo selvagem, não foi necessária a reativação uma vez que as células de leveduras do citado inóculo correspondem à microbiota presente no caldo de cana utilizado nesta pesquisa. Assim, começou-se já da primeira etapa da multiplicação (M1).

A etapa de reativação da cepa SC82 e do inóculo comercial foi realizada de modo que os dois inóculos iniciassem a primeira etapa (M1) de multiplicação no mesmo dia e horário que se iniciou a etapa M1 do inóculo selvagem, para que os três inóculos começassem ao mesmo tempo que as etapas M1 até M4 de multiplicação, visando uma melhor avaliação do desempenho fermentativo dos três inóculos testados.

Após a reativação da cepa SC82 e do inóculo comercial, foram verificadas a pureza das culturas pelo aspecto macroscópico e microscopia óptica.

2.3 MULTIPLICAÇÃO DOS INÓCULOS PARA A FERMENTAÇÃO

Inicialmente, em condições assépticas de laboratório, foram feitas as inoculações da cepa SC82 e do inóculo comercial através da transferência de quatro alçadas carregadas das culturas puras para cada um dos quatros frascos de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de caldo de cana a 5°Brix (etapa M1). Depois foram iniciadas as três etapas sequenciais de multiplicação dos inóculos (M2, M3 e M4) (Tabela 1) em laboratório. Na etapa M2, foram usados frascos de 500 mL, na etapa M3, frascos de 1 L e, na etapa M4, frascos de 2 L de capacidade.

Em cada uma das etapas (M1 a M4) de multiplicação, foram utilizados quatro frascos, contendo caldo de cana estéril (121°C/15min), suplementado com fubá de milho (20g/L) e farelo de arroz (1g/L), com valores de Brix, 5°, 7°, 9° e 11°Brix, e volume, de 100 mL, 100 mL, 200 mL e 600 mL, nas etapas M1, M2, M3 e M4, respectivamente. A incubação de cada etapa foi feita em incubadora tipo shaker a 150 rpm, temperatura de 30°C, por 24 h. No final da Etapa M4, foi obtido o volume de 4 L de inóculo, conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. ETAPAS DE MULTIPLICAÇÃO (M1 A M4) DA CEPA SC82 E DO INÓCULO COMERCIAL SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS DE LABORATÓRIO PARA A REALIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO.

ETAPAS DA MULTIPLICAÇÃO	M1 (1a etapa)	M2 (2a etapa)	M3 (3a etapa)	M4 (4a etapa)
Procedimento / Etapa / Frasco	Levedura inoculada + 100 mL de CC a 5°Brix	M1 (100mL) + 100 mL de CC a 7°Brix	M2 (200mL) + 200 mL de CC a 9°Brix	M3 (400mL) + 600 mL de CC a 11°Brix
Volume obtido (L)	(0,4)	(0,8)	(1,6)	(4)

CC = Caldo de cana-de-açúcar.

A etapa da multiplicação do inóculo selvagem seguiu o mesmo procedimento adotado para a cepa SC82 e para o inóculo comercial, conforme apresentado na Tabela 1, com a diferença de se utilizar em cada etapa de multiplicação, M1 até M4, caldo de cana não estéril, apenas aquecido a 30 °C, bem como sem necessidade de inoculação de cultura pura na etapa M1 da multiplicação.

Após as 24 h de multiplicação na etapa M4, o total, 4 L, de meio de cultura de cada inóculo testado foi transferido para três dornas de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 30 L. Uma para cada inóculo.

Com intuito de aumentar o volume inicial de inóculo obtido na etapa M4 de multiplicação (20 L), foram incluídas as etapas M5 a M8 (Tabela 2). Essas etapas da multiplicação foram feitas

em condições não controladas de temperatura e de agitação e utilizando-se caldo de cana com diferentes concentrações de Brix.

O critério de permanência na etapa para adição de caldo de cana foi até o Brix inicial da etapa ser reduzido à metade, com uma variação de até $\pm 1^\circ$ Brix.

Na etapa M5 de multiplicação, utilizou-se caldo de cana a 5° Brix pasteurizado e suplementado com 20 g/L de fubá de milho e 1,0 g/L de farelo de arroz. A pasteurização foi feita aquecendo o caldo de cana até $70^\circ\text{C}/15\text{s}$ e depois resfriando-o até 32°C . Por sua vez, na etapa M6, utilizou-se caldo de cana a 7° Brix novamente suplementado e apenas aquecido a 30°C . Por fim, nas etapas M7 e M10, foram utilizados caldos de cana a 9° Brix, 11° Brix, 13° Brix e 15° Brix, respectivamente, aquecidos a 30°C e sem suplementação.

Assim, os 4 L obtidos após 24 h na etapa M4 da multiplicação foram transferidos para uma dorna de fermentação de aço inoxidável (capacidade de 30 L) higienizada (álcool a 70%) para dar início as etapas M5 a M8 da multiplicação em laboratório para o aumento do volume de inóculo, conforme apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. ETAPAS DE MULTIPLICAÇÃO (M5 A M8) PARA O AUMENTO DO VOLUME DA CEPA SC82, DO INÓCULO COMERCIAL E DO INÓCULO SELVAGEM.

ETAPAS DA MULTIPLICAÇÃO	Volumes e Brix das etapas
M5 (5a etapa)	4 L de M4 + 4 L de CC a 5° Brix pasteurizado e suplementado
M6 (6a etapa)	8 L de M5 + 4 L de CC a 7° Brix suplementado e aquecido a 30°C
M7 (7a etapa)	12 L de M6 + 4 L de CC a 9° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação
M8 (8a etapa)	16 L de M7 + 4 L de CC a 11° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação
M9 (9a etapa)	20 L de M8 + 4 L de CC a 13° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação
M10 (10a etapa)	24 L de M6 + 4 L de CC a 15° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação

CC = Caldo de cana-de-açúcar.

Zerado o teor de Brix da etapa M10 dos três inóculos, foram retirados 20 L de vinho de cada dorna dos inóculos testados e em seguida foram feitas adições de 5 L de caldo de cana a 15° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação nas dornas de fermentação dos respectivos inóculos para dar início a avaliação dos parâmetros fermentativos de cada inóculo.

Foram feitas três bateladas de 5 L de caldo de cana a 15° Brix aquecido a 30°C e sem suplementação na dorna de cada inóculo para a avaliação dos parâmetros fermentativos. Além

disso, entre cada batelada, o inóculo foi reutilizado mediante decantação das células ao final da fermentação.

As etapas M5 até M10 foram realizadas em condições não controladas em termos de agitação e de temperatura e com a utilização de caldo de cana não estéril, com o objetivo de forçar e de uma certa forma induzir o rápido desenvolvimento e estabelecimento da levedura em condições não estéreis e não controladas de temperatura e de agitação para a sua multiplicação, conforme utilizado por muitos produtores de cachaça (Mendes and others, 2013).

Os procedimentos de multiplicação dos inóculos testados bem como de reativação foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

2.4 COLETA DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Foram coletados a cada duas horas com auxílio de uma pipeta volumétrica automática de 10 mL, da dorna de fermentação de cada inóculo, 1500 µL do mosto e depois transferidos para três tubos de 2,0 mL estéreis. Em seguida esses tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 3 min e o sobrenadante transferido para tubos novos estéreis de 2,0 mL e depois armazenados sob congelamento para posterior avaliação dos parâmetros fermentativos.

As coletas a cada duas horas para cada inóculo foram feitas até o teor de Brix da fermentação zerar, medido com auxílio de um sacarímetro. O tempo zero (T0) foi considerado a partir do momento que se colocava caldo de cana na dorna de fermentação.

A análise das amostras da fermentação dos inóculos testados foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos da Universidade Estadual da Bahia (UNEB), campus Senhor do Bomfim, Bahia, Brasil. Foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação dos açúcares totais consumidos e do etanol produzido nas amostras da fermentação dos inóculos testados.

2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS AMOSTRAS DA FERMENTAÇÃO

Para a quantificação dos compostos (açúcares totais e etanol) da fermentação por CLAE, as amostras foram diluídas 20 vezes em água ultrapura e filtradas em membranas de difluoreto de polivinilideno, com poro de 0,45 µm e diâmetro de 13 mm (Millex HV, Millipore). Curvas padrão foram construídas para os açúcares (sacarose, glicose, frutose) e para o álcool (etanol), diluídos em água ultrapura (*Direct Q3UV*, Millipore, Massachusetts, USA).

O equipamento utilizado foi *Ultimate 3000* (Dionex, Alemanha), equipado com detector de índice de refração para detecção de açúcares e do álcool (Sodhex RI-101, Showa Denko, Japão). Para o álcool, utilizou-se a coluna de troca iônica *Rezex ROA Organic Acids*, 300 x 7,8 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), mantida a 60 °C, ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel em um fluxo de 0,6 mL/min-1. Os açúcares foram separados empregando-se a coluna *HPX-87C*, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mantida a 80 °C, água ultrapura como fase móvel em um fluxo de 0,6 mL/ min-1.

Os cromatogramas foram integrados pelo software *Chromeleon Server monitor* (Dionex); a identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção e a quantificação de acordo com a curva padrão para cada analito.

2.6 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

O rendimento (R) da fermentação foi determinado utilizando-se os valores do etanol produzido (%p/v) em relação aos açúcares consumidos (%p/v) x 100. O etanol produzido foi obtido da diferença da concentração final de etanol (g/L) pela concentração inicial de etanol (g/L). Já os açúcares consumidos foram calculados da diferença da concentração inicial de açúcares (g/L) pela concentração final de açúcares (g/L).

A eficiência (E) da fermentação foi determinada pela relação etanol produzido (%p/v) / etanol teórico (%p/v) x 100. O etanol teórico foi calculado a partir dos açúcares consumidos x 0,5111, conforme descrito por Bortolini, Santanna e Torres (2001).

Já a produtividade (P) (g/Lh) da fermentação foi calculada pela relação etanol produzido (p/v) / tempo total da fermentação (h).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MULTIPLICAÇÃO DOS INÓCULOS PARA A FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA

Durante a multiplicação celular dos inóculos testados, verificou-se que apenas a levedura selecionada SC82 e o inóculo comercial conseguiram zerar, após 16 horas de inoculação, o Brix do caldo de cana a 15°Brix adicionado na etapa M10 da multiplicação.

O inóculo selvagem não conseguiu zerar o Brix da etapa M10 após 24 horas de inoculação na citada etapa, em que o valor do Brix ainda estava em 2,5°, medido com auxílio de um sacarímetro. Por conta disso, deixou-se o inóculo selvagem mais dois dias na etapa M10 para ver se ainda ocorria algum tipo de reação por parte desse inóculo. Fato que não foi observado e com isso, após dois dias do término da etapa M10, e com o Brix ainda em 1°, mosto parado, temperatura em torno de 25°C e com aroma não agradável, o inóculo selvagem foi descartado.

O baixo desempenho alcançado na etapa de multiplicação pelo inóculo selvagem pode ser devido a diversidade de micro-organismos envolvidos no processo de multiplicação para a realização da fermentação espontânea (Barbosa 2013), em que pode ter ocorrido o predomínio, ao longo das etapas de multiplicação M1 a M10, de diferentes espécies e linhagens de leveduras, bem como de bactérias que podem ter interferido na condução da fermentação alcoólica, desviando para outros tipos de fermentações (Cardoso 2006).

De acordo com Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), a utilização de inóculos selvagens proporciona fermentações totalmente aleatórias, pois depende da quantidade e da qualidade dos micro-organismos presentes no caldo de cana. Silva-Filho (2003) comenta que contaminações da fermentação por leveduras nativas de baixa capacidade fermentativa pertencentes ou não a espécie *S. cerevisiae* podem trazer consideráveis prejuízos por retardarem o tempo de fermentação, provocando expressivas quedas de rendimento na produção de etanol e quase sempre levando ao descarte total do fermento uma ou mais vezes no mesmo período de safra.

Após terem conseguido zerar o Brix da etapa M10, a levedura selecionada SC82 e o inóculo comercial foram utilizados para dar início ao processo de avaliação do rendimento, da eficiência e da produtividade da fermentação realizada por esses inóculos. Assim, na Tabela 3 estão descritos os tempos fermentativos dos citados inóculos durante as três bateladas de fermentações realizadas, utilizando-se caldo de cana a 15°Brix, aquecido a 30°C e sem suplementação, para a avaliação dos parâmetros fermentativos.

TABELA 3. TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA SELECIONADA SC82 E DO INÓCULO COMERCIAL DURANTE TRÊS BATELADAS DE FERMENTAÇÕES REALIZADAS, UTILIZANDO-SE CALDO DE CANA A 15°BRIX, AQUECIDO A 30°C E SEM SUPLEMENTAÇÃO.

INÓCULOS	TEMPO PARA FERMENTAR (h)			TEMPO MÉDIO (h)
	1a fermentação	2a fermentação	3a fermentação	
Cepa SC82	16	16	12	14
Comercial	24	22	18	21

Verifica-se na Tabela 3 que a levedura selecionada SC82 nas três bateladas de fermentações realizadas zerou o Brix em menos de 24h, apresentando em cada fermentação sempre um tempo menor para fermentar do que o inóculo comercial. O que demonstra uma das vantagens em relação à rápida capacidade de fermentar ao se utilizar inóculos selecionados, isolados da fermentação da cachaça, para a produção da cachaça, visando a melhoria do processo fermentativo da bebida. Barbosa (2013) comenta que a utilização de leveduras selecionadas na produção de cachaça apresenta vantagens, como permite minimizar as contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta a produtividade do processo e melhora a padronização da qualidade química e sensorial da bebida.

Já Martins (2013) comenta que a capacidade das leveduras de desenvolver respostas rápidas são importantes para que elas possam sobreviver a mudanças em seu ambiente em decorrência de fatores como temperatura, pH, níveis de nutrientes, disponibilidade de água e outros, que muitas vezes geram estresses e podem comprometer suas funções celulares normais.

3.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Neste tópico experimental, foram avaliados o desempenho fermentativo em relação ao rendimento, à eficiência e à produtividade das três bateladas de fermentações conduzidas pela cepa SC82 e pelo inóculo comercial, em que os tempos fermentativos da primeira, da segunda e da terceira fermentação realizadas (Tabela 3) duraram, respectivamente, 16 h, 16 h e 12 h para a levedura selecionada SC82, e 24 h, 22 h e 18 h, respectivamente, para o inóculo comercial.

Assim, a Tabela 4 mostra os valores obtidos dos açúcares totais consumidos, do etanol produzido, do rendimento, da eficiência e da produtividade alcançados no final das três bateladas de fermentações realizadas pela cepa SC82 e pelo inóculo comercial para a avaliação do desempenho fermentativo dos citados inóculos.

TABELA 4. AÇÚCARES TOTAIS CONSUMIDOS, PRODUÇÃO DE ETANOL, RENDIMENTO, EFICIÊNCIA E PRODUTIVIDADE NAS TRÊS BATELADAS FERMENTATIVAS PARA A CEPA SC82 E PARA O INÓCULO COMERCIAL.

Parâmetros Fermentativos	1a Fermentação		2a Fermentação		3a Fermentação	
	Cepa SC82	Inóculo Comercial	Cepa SC82	Inóculo Comercial	Cepa SC82	Inóculo Comercial
Açúcares consumidos (g L ⁻¹)	55,93 b	56,73 b	58,71 ab	62,02 a	58,73 ab	60,67 ab
Etanol produzido (g L ⁻¹)	26,11 ab	19,17 b	28,01 ab	28,41 ab	28,19 ab	29,78 a
Etanol teórico (g L ⁻¹)	28,58 b	28,98 b	30,00 ab	31,69 a	30,01 ab	31,00 ab
Rendimento (%)	46,68 ab	33,79 b	47,71 a	45,81 ab	48,00 a	49,09 a
Eficiência (%)	91,36 ab	66,15 b	93,37 ab	89,65 ab	93,94 ab	96,06 a
Produtividade [g (Lh) ⁻¹]	1,63 abc	0,80 c	1,75 ab	1,29 bc	2,35 a	1,65 abc

Linhas que apresentam valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%.

Verifica-se na Tabela 4 que na primeira fermentação realizada, partindo-se de um valor de 55,93 g/L de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 16 h de fermentação um

rendimento de 46,68 % e uma eficiência fermentativa de 91,36 %. Por sua vez, o inóculo comercial, partindo-se de um total de 56,73 % de açúcares consumidos, obteve no final de 24 h de fermentação um rendimento de 33,79 % e uma eficiência de 66,15 %.

Na segunda fermentação realizada, visualiza-se na Tabela 4 que, partindo-se de um valor de 58,71 g/L de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 16 h de fermentação um rendimento de 47,71 % e uma eficiência fermentativa de 93,37 %. Já o inóculo comercial, partindo-se de um total de 62,02 % de açúcares consumidos, obteve no final de 22 h de fermentação um rendimento de 45,81 % e uma eficiência de 89,65 %. Observa-se, assim, que ambos os inóculos apresentaram uma melhora no rendimento e na eficiência fermentativa na segunda batelada de fermentação em relação à primeira batelada. Tendo novamente a cepa SC82 apresentado os melhores resultados.

Já na terceira fermentação realizada, constata-se na Tabela 4 que, partindo-se de um valor de 58,73 g/L de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 12 h de fermentação um rendimento de 48,00 % e uma eficiência fermentativa de 93,94 %. Por sua vez, o inóculo comercial a partir de um total de 60,67 % de açúcares consumidos obteve no final de 18 h de fermentação um rendimento de 49,09 % e uma eficiência de 96,06 %.

Verifica-se com isso que novamente ambos os inóculos apresentaram uma melhora no rendimento e na eficiência fermentativa ao iniciar mais uma batelada (terceira) de fermentação, em que a cepa SC82 conseguiu mais uma vez terminar a batelada da fermentação em menos tempo e com bons resultados em relação ao inóculo comercial.

A partir desses resultados do rendimento e da eficiência fermentativa obtidos ao final das três bateladas de fermentações realizadas, verificou-se que o rendimento médio (47,46 %) das três fermentações alcançado pela cepa SC82 foi maior que o valor médio obtido (42,90 %) pelo inóculo comercial. Esse maior rendimento médio alcançado pela cepa SC82 indica que essa linhagem selecionada de *S. cerevisiae* apresentou uma maior quantidade de álcool produzido por açúcares totais consumidos ao longo das três bateladas de fermentações executadas do que o inóculo comercial.

Já com relação a eficiência fermentativa, constatou-se que a eficiência média (92,89 %) obtida ao final das três bateladas de fermentações realizadas pela cepa SC82 foi maior que o valor médio alcançado (83,95 %) pelo inóculo comercial. Tal fato indica que a cepa SC82 executou uma melhor conversão dos açúcares totais consumidos em etanol nas três bateladas de fermentações do que o inóculo comercial.

O termo produtividade refere-se à velocidade de produção de etanol ao final da fermentação (Maia e Campelo, 2006). Observa-se na Tabela 4 que a produtividade obtida pela cepa SC82 no final da primeira (16 h), da segunda (16 h) e da terceira (12) batelada de fermentação alcançaram valores, respectivamente, de 1,63 g/Lh, 1,75 g/Lh e 2,35 g/Lh, com uma média de 1,91 g/Lh. Valores esses maiores do que a produtividade de 0,80 g/Lh, 1,29 g/Lh e 1,65 g/Lh obtida, respectivamente, pelo inóculo comercial no final da primeira (24 h), da segunda (22 h) e da terceira (18 h) fermentação realizada pelo referido inóculo, o qual obteve uma produtividade média de 1,25 g/Lh. Alencar et al. (2009) verificando a capacidade fermentativa de culturas de *S. cerevisiae* encontraram valores de produtividade variando de 1,12 a 3,15 g/hL para o tempo de 12 h de fermentação e valores entre 1,64 e 2,03 g/hL para o tempo fermentativo de 24 h.

Segundo Maia e Campelo (2006), quanto menor for o tempo requerido para zerar o Brix, maior será a produtividade da fermentação. Diante disso, os valores superiores alcançados da produtividade no final de cada fermentação pela cepa SC82 em relação ao inóculo comercial justifica-se pelo rápido tempo para zerar o Brix nas três bateladas de fermentações realizadas, as quais alcançaram um tempo médio de 14 h. Por sua vez, as três bateladas de fermentações realizadas pelo inóculo comercial alcançaram um tempo médio de 21 h (Tabela 3).

O menor tempo fermentativo alcançado nas três bateladas de fermentações pela cepa SC82 evidencia uma melhor adaptação ao processo, bem como uma rápida velocidade de produção

de etanol obtida pela citada cepa em relação ao inóculo comercial.

O melhor desempenho fermentativo em termos de rendimento, de eficiência e de produtividade da fermentação obtidos pela cepa SC82 em relação ao inóculo comercial demonstrou como a linhagem selecionada de *S. cerevisiae* SC82, isolada do processo fermentativo de produção de cachaça, visando a sua utilização como culturas iniciadoras, alcançou melhores respostas fermentativas em relação à produção de etanol e ao menor tempo de fermentação quando comparado com o inóculo comercial.

O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* que contribuam para o aumento do rendimento, da eficiência e da produtividade da fermentação pode se constituir em uma alternativa importante para a melhoria do desempenho do processo fermentativo de produção de cachaça, bem como para a obtenção de uma bebida com boas qualidades químicas e sensoriais. Oliveira (2005) comenta que a busca de linhagens iniciadoras e a caracterização de leveduras que prevalecem no processo de fermentação da cachaça poderão permitir uma interferência bem-sucedida no processo fermentativo e para o estabelecimento de padrões de qualidade elevados para o produto final.

A melhor resposta fermentativa alcançada nesta pesquisa, com a utilização de linhagem selecionada de *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação para avaliação de parâmetros fermentativos ao se utilizar inóculo selecionado, comercial e selvagem, reforça a importância da utilização de leveduras selecionadas para a melhoria do desempenho da fermentação para a produção de cachaça. Soares, Silva e Schwan (2011) comentam que o uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de produção de cachaça tem aumentado a produtividade e melhorado a qualidade da bebida, pois essas linhagens selecionadas são competitivas e apresentam características tecnológicas mais desejáveis para a produção de cachaça.

Diante disso, a prática de alguns produtores de cachaça em utilizar inóculos comerciais durante a fermentação deve ser evitada, uma vez que, além de serem inóculos selecionados para atender aos propósitos da fermentação de massas alimentícias (Pereira, Rosa e Faria, 2006), apresentaram nesta pesquisa parâmetros fermentativos inferiores aos obtidos com o uso do inóculo selecionado (SC82).

Assim, o uso de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* isoladas do processo de fermentação espontânea para a produção de cachaça possibilita a realização de fermentações sem contaminações, regulares (com tempos de duração similares), rápidas (menor tempo e maior produtividade) e de maior rendimento (alta conversão de açúcar para álcool). Além de permitir uma melhor padronização da qualidade química e sensorial da bebida produzida (Cardoso, 2006).

4. CONCLUSÕES

O melhor desempenho fermentativo em relação ao rendimento, à eficiência e à produtividade alcançado nas três bateladas de fermentação realizadas pela linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* SC82 reforça a importância da utilização de leveduras selecionadas isoladas do processo de fermentação da cachaça para a obtenção de uma melhor resposta fermentativa na produção da bebida. Além disso, indica o potencial da citada cepa para a utilização na produção de cachaça de qualidade.

EVALUATION OF FERMENTATIVE PARAMETERS OF INOCULES USED IN THE PRODUCTION OF ALEMBIC CACHAÇA

ABSTRACT

The alembic cachaça is a typical Brazilian drink, with characteristic flavor and aroma, produced exclusively from the sugar cane juice, without the addition of chemicals, in the so-called

mills, and distilled in copper stills. In the production of the alembic cachaça, the inoculum used in the fermentation of the sugarcane juice can be of three types. There are the wild-type inoculum, formed by the micro-organisms existing in sugarcane; the selected ones, which consist of selected strains of *S. cerevisiae* isolated from the fermentation of cachaça; and the commercial one, which is a product destined to bakery containing cells of *S. cerevisiae* yeast. The present work had the objective to evaluate the yield, efficiency and productivity of the fermentation carried out by a selected strain of *S. cerevisiae* SC82, by wild-type inoculum and by commercial inoculum. It was verified that the average fermentation time of the three fermentations batches achieved by the strain SC82 was 14 h, while the commercial inoculum was 21 h. At the end of the multiplication stage, the wild-type inoculum was not able to zero the Brix of the stage to continue the fermentations, and because of this, it was discarded. In the evaluation of the fermentative performance, it was found that strain SC82 showed an average yield (47.46%), an average efficiency (92.89%) and an average productivity (1.91 g / Lh) better than the average values of Yield (42.90%), efficiency (83.95%) and productivity (1.25 g / Lh) reached by the commercial inoculum at the end of the three fermentations batches performed.

Key-words: Cachaça. Fermentation. Selected yeasts. Cell multiplication.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A.R.; MONTEIRO, B.M.S.; BELLUCO, A.E.S. Chemical composition of sugar cane spirits fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Quim. Nova.* v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012.
1. ALENCAR, Elvira Maria Bezerra de. SOUZA-MOTTA, Cristina Maria de. WALTER, Bruno Souza. SANTOS, Rejane Maria Pessoa. MARQUES, Olga Martins. QUEIROZ, Lusinete Aciole de. Fermentation Capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 52, n.4: p. 819-824, jul/agt, 2009.
 2. ANJOS, J.P. Compostos fenólicos e carbamato de etila: caracterização e quantificação em diferentes períodos de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho. 2010. 135 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
 3. BORTOLINI, F.; SANTANNA, E.S.; TORRES, R.C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 21, n. 2, p. :236-243, maio-ago. 2001.
 4. BOSQUEIRO, A.C. Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples. 84 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
 5. BARBOSA, E. A. Caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região de salinas para fins de identificação geográfica. 2013. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
 6. BRAGA, V.S. A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça. 2006. 96 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
 7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2005a. Seção 1, p. 54.
 8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005. Aprovar o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2005b. Seção 1, p. 11.
 9. CARDOSO, M.G.C. Produção de Aguardente de Cana. 2 ed. Lavras:Editora UFLA, 2006. 445 p.
 10. FERNANDES, O. W. B. Avaliação da composição físico-química da cachaça de alambique obtida de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
 11. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo:Edgar Blucher. v. 3, n. 1, 2001. 593 p.
 12. MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. Tecnologia da cachaça de alambique. Belo Horizonte: Sebrae/MG/Sindbebidas, 2006. 129p.

13. MAIA, Amazile Biagioni R. A. Equipamentos para a produção de cachaça. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 63-66, 2002.
14. MALTA, Hélia Lucila. Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique. 2006. 70p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2006.
15. MENDONÇA, J.G.P. Análise de carbamato de etila em cachaças de alambique produzidas por levedura selecionada e fermentação espontânea. 2014. 128 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
16. MARTINS, R. L. Importância das reservas energéticas para a resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces*. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
17. MENDES, T.A.O.; PINTO, L.M.; MENDES, D.S.O.; MALTA, H.L.; OLIVEIRA, E.S. Increase in yeast biomass production in batch and semi-continuous aerated propagators in the production of sugarcane spirit. Braz. J. Food Technol. v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013.
18. OLIVEIRA, V.A. Seleção e caracterização de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de cachaça de alambique no estado de Minas Gerais. 135 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2005.
19. PEREIRA, A.F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. 2007. 113 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
20. PEREIRA, J.A.; ROSA, C.A.; FARIA, J.B. Cachaça de Alambique. Brasília (Brasil):LK Editora e Comunicação, Coleção Tecnologia Fácil, 2006. 180 p.
21. SANTOS, T. M. 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. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
22. SILVA, A.F. Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
23. SILVA FILHO, E.A. Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. 2003. 107 f. Tese (Doutor) – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
24. SOARES, T.L.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Acompanhamento do processo de fermentação para a produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 33, n. 1, p. 184-187, 2011.
25. STROPPIA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIGUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Kinetic parameters of yeasts strains isolated from cachaça distilleries in Minas Gerais/Brazil. Ciênc. agrotec. v. 33, p. 1978-1983, 2009.
26. VIEIRA, É.N.R. Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos. 2011. 167 f. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores de cachaça da Bahia, Brasil, em especial a Cachaça Rio do Engenho, pelo apoio, a Agroindústria da UESC pelo suporte técnico experimental, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro.