



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



GABRIEL MARQUES TEIXEIRA

**TRIAGEM DE ESTIRPES DE LEVEDURAS POTENCIALMENTE CAPAZES DE
MELHORAR O PROCESSO PRODUTIVO E A QUALIDADE DA CACHAÇA**

OURO PRETO
2024

GABRIEL MARQUES TEIXEIRA

**TRIAGEM DE ESTIRPES DE LEVEDURAS POTENCIALMENTE CAPAZES DE
MELHORAR O PROCESSO PRODUTIVO E A QUALIDADE DA CACHAÇA**

Autor: **Gabriel Marques Teixeira**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado de
Farmácia, pertencente à Escola de
Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto, como requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes
Brandão

Coorientadora: Dra. Mariana Furtado
Granato de Albuquerque.

OURO PRETO

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

T266t Teixeira, Gabriel Marques.

Triagem de estirpes de leveduras potencialmente capazes de melhorar o processo produtivo e a qualidade da cachaça. [manuscrito] / Gabriel Marques Teixeira. - 2024.

60 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão.

Coorientadora: Dra. Mariana Furtado Granato de Albuquerque.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leveduras (Fungos). 2. Fermentação. 3. Cachaça. I. Brandão, Rogélio Lopes. II. Albuquerque, Mariana Furtado Granato de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 663.543

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Marques Teixeira

Triagem de estirpes de leveduras potencialmente capazes de melhorar o processo produtivo e a qualidade da cachaça

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 22 de fevereiro de 2024

Membros da banca

Dr. Rogelio Lopes Brandão - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr^a. Mariana Furtado Granato de Albuquerque - Co-Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr^a. Raquel Silva Araújo - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto

[Digite o nome do orientador (apenas a primeira letra de cada nome maiúscula)], orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 22/02/2024



Documento assinado eletronicamente por **Rogelio Lopes Brandao, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/02/2024, às 23:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0672262** e o código CRC **F9AF879D**.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), agradeço imensamente por fomentar o alicerce intelectual que me permitiu alcançar o ensino superior.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pelo oferecimento de educação de qualidade, mesmo frente há tempos complexos como os que estamos enfrentando.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBCM) por abrir suas portas e permitir não só a execução deste trabalho, como também o meu desenvolvimento enquanto futuro profissional farmacêutico.

À empresa CERLEV, tanto pelo apoio financeiro quanto pela oportunidade de aprendizado prático, sem o qual seria inviável chegar até este momento.

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão e à Dra. Mariana Furtado Granato de Albuquerque, pelo companheirismo e por incentivarem, tutorarem, acolherem e ensinarem valores que vão além das bancadas de laboratório.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, fica aqui meu muito obrigado!

A minha família, desde os meus parentes de sangue até os meus amigos queridos, agradeço por todo apoio. Sem os ter por perto não conseguiria caminhar rumo aos meus sonhos.

RESUMO

A produção de cachaça, uma bebida tipicamente brasileira, está experimentando um aumento significativo na demanda, tanto no mercado interno quanto no internacional. A alta demanda pela bebida cria a necessidade de aumento do volume de produção e o processo produtivo não consegue acompanhar o ritmo do mercado, muitas vezes pela falta do advento da tecnologia. Nesse contexto, a padronização da qualidade da bebida torna-se ainda mais difícil e a utilização de leveduras selecionadas pode ser uma ferramenta para otimizar o processo. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo selecionar estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* promissoras para a produção de cachaça com base em fenótipos de interesse como resistência a condições estressantes (alta temperatura, alto teor de álcool e de açúcares), potencial para produção de compostos aromáticos, alta taxa de floculação e bom desempenho fermentativo. Para isso, a seleção de leveduras foi realizada em sete etapas, sendo cinco relacionadas a testes microbiológicos envolvendo a utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, cultivo dos isolados a 37°C, com 10% e 15% de etanol, com 20% de sacarose, na presença de drogas relacionadas às vias metabólicas de compostos aromáticos, análise qualitativa e quantitativa do comportamento floculativo e desempenho fermentativo. Já as outras duas etapas foram relacionadas a triagem genética para *Saccharomyces cerevisiae*, por meio da realização de PCT- ITS e digestão enzimática com enzima de restrição dos isolados que chegaram ao final dos testes microbiológicos. Das 480 colônias isoladas inicialmente, 476 foram pré-selecionadas na primeira etapa por provavelmente pertencerem ao gênero *Saccharomyces*, uma vez que não apresentaram crescimento nas condições testadas. Após a segunda etapa, os 133 isolados considerados mais resistentes a estresses inerentes ao processo produtivo foram pré-selecionados. Já na terceira etapa, apenas 9 isolados foram pré-selecionados por apresentarem resistência a pelo menos duas drogas dentre as quatro analisadas. Estes 9 isolados foram submetidos aos testes de floculação quali e quantitativa, e seguiram para a etapa de desempenho fermentativo os candidatos A1-1 e F1-2 por serem bastante floculantes, resistentes a todas as condições estressantes e drogas avaliadas. Tais isolados apresentaram desempenho fermentativo muito semelhante ao controle positivo, a cepa Pe-2, que é amplamente utilizada em ambiente industrial. Finalmente, os isolados A1-1 e F1-2 foram identificados como *Saccharomyces cerevisiae* e considerados, portanto, cepas promissoras para melhoramento do processo produtivo e qualidade sensorial da cachaça.

Palavras-chave: Cachaça; *Saccharomyces cerevisiae*; Fermentação; Levedura Selecionada.

ABSTRACT

The production of cachaça, a typically Brazilian drink, is experiencing a significant increase in demand, both in the domestic and international markets. The high demand for the drink creates the need to increase production volume and the production process cannot keep up with the market, often due to the lack of the advent of technology. In this context, standardizing beverage quality becomes even more difficult, and the use of selected yeasts can be a tool to optimize the process. Therefore, the present study aimed to select promising strains of *Saccharomyces cerevisiae* to produce cachaça based on phenotypes of interest such as resistance to stressful conditions (high temperature, high alcohol and sugar content), potential for production of aromatic compounds, high flocculation rate and good fermentative performance. For this, the selection of yeasts was carried out in seven stages, five of which were related to microbiological tests involving the use of different sources of carbon and nitrogen, cultivation of the isolates at 37°C, with 10% and 15% ethanol, with 20% of sucrose, in the presence of drugs related to the metabolic pathways of aromatic compounds, qualitative and quantitative analysis of flocculation behavior and fermentative performance. The other two stages were related to genetic screening for *Saccharomyces cerevisiae*, by performing PCT-ITS and enzymatic digestion with restriction enzyme of the isolates that reached the end of the microbiological tests. Of the 480 colonies initially isolated, 476 were pre-selected in the first stage because they probably belonged to the genus *Saccharomyces*, as they did not show growth under the tested conditions. After the second stage, the 133 isolates considered most resistant to stresses inherent to the production process were pre-selected. In the third stage, only 9 isolates were pre-selected because they were resistant to at least two drugs among the four analyzed. These 9 isolates were subjected to qualitative and quantitative flocculation tests, and candidates A1-1 and F1-2 went to the fermentative performance stage as they are highly flocculating, resistant to all stressful conditions and drugs evaluated. These isolates showed fermentative performance very similar to the positive control, the Pe-2 strain, which is widely used in industrial environments. Finally, isolates A1-1 and F1-2 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and were therefore considered promising strains for improving the production process and sensorial quality of cachaça.

KEYWORDS: Cachaça; *Saccharomyces cerevisiae*; Fermentation; Selected Yeast.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos na primeira fase da seleção de leveduras referente à capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.	41
Tabela 2: Resultados obtidos na segunda fase da seleção de leveduras referente à tolerância a diferentes tipos de estresse inerente ao processo produtivo da cachaça.	42
Tabela 3: Classificação dos isolados após sobreposição de dados obtidos na primeira e segunda etapas da seleção de leveduras destinadas à produção de cachaça.	43
Tabela 4: Resultados obtidos na terceira fase da seleção de leveduras referente à resistência a drogas associadas a rotas metabólicas de síntese de compostos aromáticos.	44
Tabela 5: Resultados do teste de floculação qualitativa ao longo de 30 minutos.	46
Tabela 6: Resultados do teste de floculação quantitativa.	47
Tabela 7: Resumo das características apresentadas pelos nove isolados pré-selecionados nas cinco primeiras etapas da seleção de leveduras	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de produção da cachaça de alambique	14
Figura 2: Fermentação alcoólica da glicose	21
Figura 3: Rotas metabólicas do piruvato a partir da glicose	22
Figura 4: Compostos voláteis importantes na produção de cachaça, sintetizados por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Figura 5: Vias metabólicas da formação de álcoois superiores e seus ésteres de acetato em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 6: Reações químicas na biossíntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia média.....	26
Figura 7: Floculação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> exemplificada. Mediante aos íons de cálcio (a) glicoproteínas específicas de membrana alteram conformação, fazendo interações com resíduos de manose (b) em células vizinhas.....	29
Figura 8: Demonstração de método de diluição	32
Figura 9: Fluxograma experimental para isolamento e seleção de estirpes de leveduras com potencial para otimizar a produção e a qualidade da cachaça.....	40
Figura 10: Produção estimada de bioetanol pelos isolados pré-selecionados A1-1 e F1-2 e pela cepa industrial Pe-2.....	50
Figura 11: Identificação de espécie por PCR-ITS e digestão com enzima de restrição Hae III. Em A, eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação do produto da PCR-ITS, sendo da direita para a esquerda, padrão de peso molecular 1 Kb, controle positivo BY4741, A1-1, F1-2 e branco. Em B, eletroforese em gel de agarose 3% para avaliação da digestão enzimática sendo, da esquerda para a direita, padrão de peso molecular 100 pb, controle positivo BY4741, A1-1 e F1-2.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
	2.1 <i>A cachaça: processo produtivo, características e importância econômica</i>	<i>13</i>
	2.2 <i>Desafios enfrentados na produção da cachaça.....</i>	<i>17</i>
	2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>19</i>
	2.4 <i>Fermentação alcoólica.....</i>	<i>20</i>
	2.5 <i>O papel dos compostos secundários no sabor da cachaça.....</i>	<i>23</i>
	2.5.1 <i>Álcoois superiores:.....</i>	<i>24</i>
	2.5.2 <i>Ésteres.....</i>	<i>25</i>
	2.6 <i>A floculação associada a levedura Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>27</i>
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS.....	31
	4.1 <i>Objetivo geral:</i>	<i>31</i>
	4.2 <i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>31</i>
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
	5.1 <i>Obtenção e armazenamento da amostra</i>	<i>31</i>
	5.2 <i>Isolamento de colônias.....</i>	<i>32</i>
	5.3 <i>Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.</i>	<i>32</i>
	5.4 <i>Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse.....</i>	<i>33</i>
	5.4.1 <i>Estresse alcoólico</i>	<i>33</i>
	5.4.2 <i>Estresse térmico</i>	<i>33</i>
	5.4.3 <i>Estresse osmótico.....</i>	<i>33</i>
	5.5 <i>Confecção de novas placas-mães.....</i>	<i>33</i>
	5.6 <i>Teste de resistência a drogas.....</i>	<i>34</i>
	5.6.1 <i>Resistência à cerulenina.....</i>	<i>34</i>
	5.6.2 <i>Resistência à 5,5',5"-trifluoro-D, L-leucina (TFL)</i>	<i>34</i>
	5.6.3 <i>Resistência ao íon cobre (Cu²⁺).....</i>	<i>34</i>
	5.6.4 <i>Resistência à p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP):.....</i>	<i>34</i>

5.7	<i>Teste de Floculação</i>	35
5.7.1	<i>Avaliação Qualitativa</i>	35
5.7.2	<i>Avaliação Quantitativa (Helm's Test)</i>	35
5.8	<i>Desempenho fermentativo</i>	36
5.9	<i>Identificação de Espécie</i>	38
5.9.1	<i>Amplificação da região ITS</i>	38
5.9.2	<i>Digestão com enzimas de restrição</i>	38
5.10	<i>Fluxograma experimental:</i>	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1	<i>Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.</i>	41
6.2	<i>Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse</i>	42
6.3	<i>Teste de resistência a drogas</i>	44
6.4	<i>Avaliação da floculação</i>	45
6.5	<i>Desempenho fermentativo</i>	48
6.6	<i>Identificação de espécie dos isolados pré-selecionados</i>	50
7	CONCLUSÕES	51
8	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Configurando-se como um dos símbolos nacionais de bebidas alcoólicas, a cachaça é um elemento cultural brasileiro, a qual possui crescente valor econômico associado. Sua produção tem despertado interesse elevado, não apenas em âmbito nacional, como também em cenário internacional, evidenciando a necessidade contínua de aprimoramento em sua qualidade, tanto em quesito de sabor quanto de eficiência produtiva. Todavia, infelizmente é fato que a manufatura associada ao produto não está acompanhando a alta demanda, em grande parte devido à ausência de tecnologias modernas e padronização no método de fabricação. Nesse sentido, a busca por métodos inovadores na seleção de leveduras destaca-se como um componente crucial para a otimização desse processo, influenciando diretamente as características sensoriais, complexidade aromática do destilado e impactando nas características produtivas associadas (COSTA, 2018).

Segundo Souza *et al.* (2012), a utilização de técnicas de genética clássica pode auxiliar na obtenção de cepas de leveduras que favoreçam uma maior produção de compostos de sabor, como álcoois superiores e ésteres. A não utilização de cepas editadas geneticamente na produção de cachaça está atrelada ao fato de o processo produtivo ser mais artesanal e rústico, muitas vezes envolvendo pequenos produtores, além da necessidade de se obter autorização legal para se utilizar microrganismos geneticamente modificados, principalmente em alimentos. Essa burocracia, de certa maneira, favorece o desenvolvimento de estratégias de seleção utilizando-se testes microbiológicos que visam simular condições inerentes ao processo produtivo da bebida. Explorar as razões subjacentes para a não adoção de cepas geneticamente modificadas pode fornecer insights valiosos para orientar futuras estratégias na busca pela excelência na produção de cachaça.

Já Araújo *et al.* (2018) também demonstraram o potencial de cepas de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para aplicações biotecnológicas, como a produção de cachaça e cerveja. Além disso, a fermentação espontânea e o envelhecimento da cachaça podem afetar a composição química e microbiológica da bebida, alterando sua qualidade e aceitação sensorial (CASTRO *et al.*;2010). Portanto, a seleção de leveduras adequadas para a produção de cachaça é um fator determinante para o sucesso dessa atividade econômica e cultural.

No contexto da fermentação alcoólica, as leveduras desempenham papel preponderante na conversão de açúcares em álcool e compostos secundários. Nesse

sentido, a escolha adequada de cepas leveduriformes torna-se fundamental para alcançar padrões desejados de qualidade e sabor. Como ressaltado por Basso *et al.* (2016), a diversidade genética entre as leveduras impacta diretamente na produção de compostos voláteis, conferindo características únicas e distintivas aos produtos fermentados.

A crescente demanda por cachaças de alta qualidade impõe desafios à indústria, que busca incessantemente por métodos de seleção de leveduras mais eficazes. Nesse contexto, a implementação de novos protocolos de seleção emerge como uma estratégia promissora para superar as limitações observadas em métodos tradicionais. Como destacado por Silva e Ricardo (2018), a resistência ao estresse e a capacidade de adaptação das leveduras são aspectos cruciais a serem considerados na seleção de cepas, impactando diretamente na eficiência do processo fermentativo.

O desenvolvimento de protocolos para selecionar leveduras com fenótipos desejáveis é uma estratégia que pode ajudar os produtores de cachaça a vencerem alguns desafios enfrentados durante a produção da bebida, como o extravasamento das dornas de fermentação devido à produção exagerada de espuma, dificuldade de separação das leveduras do vinho fermentado quando o fermento não sedimenta porque passou a flocular, ou ainda o baixo desempenho fermentativo.

Diante deste contexto, no presente estudo buscou-se obter culturas puras e selecionar colônias de *S. cerevisiae* que sejam resistentes às condições estressantes inerentes ao processo produtivo de cachaça, capazes de produzir compostos aromáticos e aumentar a qualidade sensorial da bebida, altamente floculantes, produtoras de pouca ou nenhuma espuma e ainda apresentem um bom desempenho fermentativo. Dessa forma, o presente trabalho contribui para o aprimoramento da produção de cachaça, por meio da obtenção de leveduras potencialmente capazes de sanar as “dores” dos produtores dessa bebida.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A cachaça: processo produtivo, características e importância econômica

O poder legislativo, a partir do Decreto n. 4851, de 02/10/2003, Art. 92, denomina cachaça como bebida típica do Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, apresentando características sensoriais peculiares e teor alcoólico variando de 38% a 48%, podendo ser adicionada açúcares até 6g/L, expressos em sacarose, com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2005).

Em geral, a produção do destilado ocorre pela fermentação espontânea, ou seja, pela ação dos microrganismos naturalmente encontrados nos substratos, no ambiente e nos utensílios utilizados. Por se tratar de um processo semi-contínuo e aberto, novos microrganismos podem ser inseridos no processo, acarretando oscilações nas características sensoriais da bebida. Uma alternativa para evitar essas oscilações é a utilização de leveduras selecionadas, contribuindo para a padronização do processo (PATARO *et al*;1998, *apud* ARAÚJO, 2018).

Configurando-se como a mais tradicional bebida destilada brasileira, a aguardente de cana marca presença em todo território nacional. Devido as características do solo, clima propício e umidade adequada, o cultivo da cana-de-açúcar é amplamente difundido no país, permitindo um desenvolvimento acentuado da planta desde o início da colonização portuguesa. Registros indicam que desde meados de 1532, o plantio associado já marcava presença a partir da introdução feita por Martim Afonso de Sousa – militar e administrador colonial -da espécie na Capitânia São Vicente (VENTURINI FILHO, 2010).

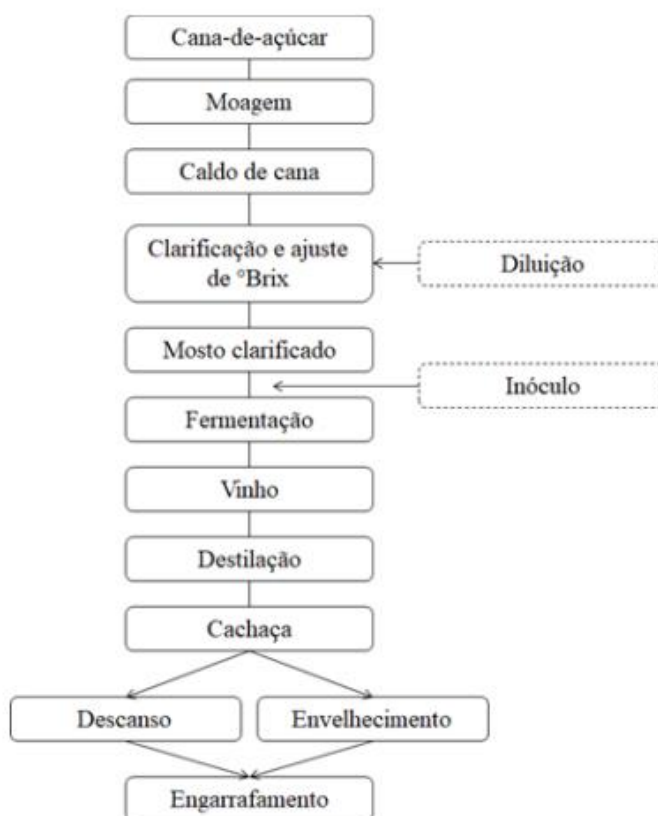
Quanto ao processo de fabricação do destilado, temos como matéria prima a cana-de-açúcar. Conforme Schoeninger, Coelho e Silochi (2014), a fabricação do destilado inicia-se a partir da moagem da matéria prima, a cana-de-açúcar, da qual obtêm-se o caldo rico em características aromáticas marcantes, esse que se faz presente nos colmos da espécie vegetal. A etapa é procedida por filtrações e decantação, sendo o produto final utilizado para preparação do mosto fermentativo, como demonstrado pela FIG.1.

Findando uma melhor adequabilidade às necessidades das leveduras que realizarão a desejada fermentação, a matéria rica em açúcares na etapa anterior é

diluída em água permitindo dessa forma a redução do teor desses carboidratos para 14 a 16° Brix, sendo 1° Brix equivalente a 1g de açúcar por 100g de solução (VENTURINI FILHO, 2010). Nas dornas fermentativas, o processo biotecnológico tem duração entre um e dois dias, durante o qual os microrganismos, inoculados ou não, realizarão a fermentação alcoólica. O mosto fermentado deve ser submetido à destilação para a separação do etanol e outros compostos voláteis da fase aquosa. Além disso, o processo de aquecimento do material propicia a formação de novos compostos que influenciarão no sabor do destilado.

O processo químico descrito se inicia a partir do mosto obtido, gerando três porções. A primeira, chamada de cabeça, concentra a maior parte dos compostos indesejáveis – como o metanol e aldeídos – já a porção intermediária, chamada de coração, gera o “destilado novo” contendo ésteres e álcoois superiores agradáveis ao consumidor, já a cauda conserva ácidos voláteis (MIRANDA, 2005).

Figura 1: Fluxograma de produção da cachaça de alambique



Adaptado de VENTURINI FILHO, 2016; ARAÚJO, 2018

A partir deste ponto, ocorre o tradicional envelhecimento, processo que finda a aprimoração sensorial dos compostos obtidos na segunda fração, essencial para obtenção de um produto de qualidade, valendo o destaque ao fator tempo, o qual possui relação direta com a harmonia de sabores do produto. Sendo a cachaça envelhecida, a bebida que contém, no mínimo, 50% de aguardente de cana envelhecida por período de no mínimo ano, podendo ainda, ser adicionado caramelo para a correção da cor (BRASIL, 2009).

A cachaça é o destilado de maior consumo pelos brasileiros, se fazendo presente em âmbito internacional e ocupando o posto de quarto mais consumido em todo mundo. Em 2018, o consumo de cachaça foi de 520,9 milhões de litros, o que se correlaciona a 72% do mercado de destilados em âmbito nacional, com uma movimentação econômica que supera os 14 bilhões de reais. (SEBRAE, 2019). Entre as destiladas, a cachaça ocupa a primeira posição no país, com cerca de 87% do mercado e um consumo de 7 litros per capita por ano (FOOD SAFETY BRAZIL, 2023).

O Brasil possui uma capacidade produtiva de 1,3 bilhões de litros por ano. Ao analisarmos a manufatura nacional 75% da manufatura é proveniente da produção industrial (em pequena, média ou larga escala) enquanto 25% correlaciona-se a produção artesanal (EMBRAPA, 2022). O mercado atua de forma a oferecer dos mais variados tipos e apresentações da bebida para uma clientela exigente e crescente.

Tal destilado apresenta uma grande diversidade e complexidade de características, que dependem de diversos fatores relacionados à sua produção, tais como: a matéria-prima utilizada, o processo de fermentação, a destilação, o armazenamento e o envelhecimento, etapas que influenciam o perfil sensorial e organoléptico da cachaça, conferindo-lhe identidade e singularidade. A exploração das diferentes tipologias e qualidades da cachaça é fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de seleção de leveduras, que são os micro-organismos responsáveis pela transformação do açúcar em álcool e compostos aromáticos (LIMA, 2019).

A escolha da matéria-prima é o primeiro aspecto que determina a diversidade da cachaça. Embora a cana-de-açúcar seja a base tradicional da bebida, existem variações regionais que utilizam outros ingredientes, como o melado, o melaço ou a rapadura, que resultam em cachaças com características distintas de cor, aroma e sabor (SILVA *et al*;2018). Além disso, a variedade da cana-de-açúcar, o tipo de corte,

o tempo de moagem e a qualidade do caldo também interferem na composição química e sensorial da cachaça (SILVA; ALMEIDA, 2017).

Outro aspecto relevante para a complexidade da cachaça é o terroir, que engloba os fatores climáticos, geográficos, históricos e culturais que afetam a produção da bebida em uma determinada região. O terroir pode influenciar desde a qualidade da cana-de-açúcar até as condições das adegas de envelhecimento, passando pelo papel das leveduras e bactérias autóctones na fermentação. Sendo que esse confere à cachaça uma expressão única do seu local de origem, podendo ser reconhecido por meio de indicadores químicos e sensoriais (JANNUZZI, 2019).

O tipo de alambique utilizado, seja de cobre ou de inox, a forma de fermentação, seja natural ou controlada, e o tempo de envelhecimento em barris de madeira, são alguns dos aspectos que influenciam o perfil físico-químico e aromático da cachaça (LIMA, 2019).

A legislação brasileira estabelece diferentes categorias do destilado, de acordo com o seu processo de produção e o seu tempo de envelhecimento. Sendo assim, a cachaça branca é aquela que não passa por nenhum tipo de envelhecimento, podendo ser armazenada em recipientes inertes, como o aço inox. Já a cachaça ouro é aquela que é envelhecida ou armazenada em recipientes de madeira que alteram a sua cor, sabor e aroma. Temos ainda a cachaça prata, que é armazenada em recipientes de madeira que não alteram a sua cor, mas podem conferir sabor e aroma. A cachaça envelhecida é aquela que passa por um período mínimo de um ano em recipientes de madeira de capacidade máxima de 700 litros (BRASIL, 2005).

O conhecimento dessas categorias é importante para a avaliação e seleção de leveduras, que são os microrganismos responsáveis pela transformação dos açúcares do caldo de cana em álcool e compostos aromáticos. Cada categoria de cachaça demanda considerações específicas para a obtenção de perfis desejados, pois as leveduras podem influenciar o rendimento, a eficiência e o perfil sensorial da cachaça, sendo um fator determinante para a diferenciação do produto (SILVA; ALMEIDA, 2017).

Explorar as características e tipos de cachaças existentes não apenas enriquece a compreensão dessa bebida emblemática, mas também fornece a base necessária para a implementação de novos métodos de seleção de leveduras que visam aprimorar e inovar na produção de cachaça.

2.2 Desafios enfrentados na produção da cachaça

A produção de uma das bebidas fermentadas mais consumidas do Brasil enfrenta desafios variados, os quais vão desde questões legislativas até econômicas e produtivas. Do ponto de vista regulamentário, a burocracia e as exigências relacionadas ao registro de alambiques representam uma barreira significativa para os produtores de cachaça.

Muitas vezes, os custos e a complexidade envolvidos na obtenção de registros podem ser um impedimento, especialmente para produtores menores e artesanais contribuindo para um mercado sem garantia legal, pondo em risco tanto a geração da bebida de qualidade via processo reprodutível, quanto ao crescimento saudável de um mercado potencial. A busca por soluções que facilitem esse processo é crucial para promover a legalidade na produção e contribuir para a sustentabilidade do setor (SOUZA *et al*;2012)

A forma de manufatura da bebida também é um ponto que merece destaque na discussão. Sendo um patrimônio cultural, a cachaça tem como já discutido nesse trabalho, um percentual significativo de sua produção associado a pequenos produtores, os quais por maioria não dispõem de tecnologia de ponta e seguem a geração do produto com base em técnicas por muito rudimentares, dando continuidade a uma tradição já aprendida e enraizada no contexto. Tal ausência de padronização e controle sobre as características do produto pode levar a variações indesejadas na bebida (SOUZA *et al*;2012; ROSA *et al*;2003, *apud* ARAÚJO, 2018), resultando em impacto negativo na reputação do produtor e satisfação do consumidor.

A maioria dos pequenos produtores utiliza a fermentação natural (espontânea) como alternativa para a produção de aguardente, essa é conduzida por uma microbiota mista de leveduras, provenientes da cana-de-açúcar, dos equipamentos e da mescla conhecida como “fermento caipira” (SOUZA *et al*;2012, *apud* ARAÚJO, 2018). O fermento caipira pode ser originado de uma mistura de caldo de cana, milho moído, arroz, fécula e cítricos que fermenta espontaneamente para depois ser adicionada ao mosto (VICENTE *et al*;2006). Essas leveduras são frequentemente chamadas de “nativas”, “indígenas”, “selvagens”, “tradicionais” (VARELA *et al*;2009, *apud* ARAÚJO, 2018) ou “naturais”, e sua diversidade durante as fermentações pode dificultar a padronização da aguardente entre as safras.

As estirpes tradicionais de leveduras podem ser sensíveis a condições estressantes durante o processo de fermentação. Fatores como variações de

temperatura, presença de contaminantes e diferenças na composição do mosto podem impactar negativamente o desempenho das leveduras, resultando em processos fermentativos menos eficientes e na produção de compostos indesejados (CASTRO *et al*;2014; SCHULLER *et al*;2019).

A obtenção de perfis aromáticos específicos é um desafio para as cepas clássicas. A diversidade de aromas desejados pelos consumidores modernos demanda uma abordagem mais precisa na seleção de leveduras (SOUZA *et al*;2012; ARAÚJO *et al*;2018), por vezes, essas podem não oferecer a variedade necessária para atender às preferências do mercado, tornando crucial a busca por microrganismos mais versáteis e adaptáveis (KLEIN *et al*;2014; GOMES *et al*;2009).

Outro fator em discussão é a eficiência fermentativa das cepas tradicionais pode ser um fator limitante na produção de cachaça. A busca por processos fermentativos mais rápidos e eficientes é essencial para aumentar a produtividade e a viabilidade econômica (MORRISSEY *et al*;2015; ARAÚJO *et al*;2018).

A compreensão desses desafios ressalta a importância da inovação na seleção de leveduras, buscando abordagens que superem as limitações das cepas tradicionais. Essa busca não apenas aprimora a qualidade da cachaça, mas também fortalece a competitividade da indústria diante dos desafios contemporâneos (CASTRO *et al*;2016; SCHULLER *et al*;2019).

O caráter floculante associado as leveduras é merecedor de destaque. A formação de grumos mais densos que sedimentam rapidamente, favorecendo a clarificação do mosto fermentado, apesar de interessante pode oferecer riscos ao processo. Tais desvantagens na produção de cachaça correlacionam-se a intensidade da floculação, que pode dificultar a separação das células e comprometer a qualidade da bebida.

Fator que por vezes não pode ser controlado de forma eficiente em cepas selvagens, tornando necessária a intervenção da engenharia genética e utilização de técnicas gênicas clássicas de manipulação. Sendo assim, é necessário entender os fatores que afetam a floculação e desenvolver técnicas para controlar esse fenômeno, buscando garantir uma produção de cachaça de alta qualidade e consistência (LUDWIG *et al*;2006).

É notório que a introdução de leveduras selecionadas pode oferecer uma solução para os problemas enfrentados pelos produtores. Ao adotar culturas selecionadas, os produtores podem garantir maior controle sobre o processo

fermentativo, resultando em uma produção mais consistente e previsível (ARAÚJO *et al*;2018; KLEIN *et al*;2014). Além disso, o uso de leveduras selecionadas pode contribuir para a obtenção de perfis aromáticos desejados, agregando valor à cachaça e ampliando as possibilidades de inovação na produção (SOUZA *et al*;2012; GOMES *et al*;2009).

A utilização de leveduras selecionadas não apenas resolve desafios práticos enfrentados pelos produtores, mas também tem um impacto direto na qualidade do produto final. A padronização do processo fermentativo e a capacidade de ajustar características específicas do perfil sensorial conferem à cachaça uma consistência superior e a capacidade de atender às demandas do mercado, elevando seu status como uma bebida autêntica e de alta qualidade (IBRAC, 2023).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Tal espécie de levedura pertence ao filo *Ascomycota*, da classe *Hemiascomycetes* e apresenta-se amplamente dispersa em vários ambientes, sendo frequentemente isoladas da superfície de frutas, tendo ocorrência ainda no solo e até na água. Na fauna essas também se fazem presentes, sejam nas camadas superficiais da derme de diversas espécies ou no tecido do trato gastrointestinal de animais endotérmicos (SCHNEITER, 2004, *apud* ARAÚJO, 2018).

Com relação à sua composição química, as leveduras apresentam de 68 a 83% de água e, também, apresentam substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais (TORTORA *et al*;2002). As leveduras compõem o grupo destaque na produção de alimentos fermentados, valendo o destaque para a espécie em voga, a qual tem um protagonismo histórico na produção de vinhos, pães, cervejas e demais fontes de alimento que compõe nosso cardápio diário (SICARD E LEGRAS, 2011), utilizando-se da fermentação de carboidratos em grãos variados (como a cevada e o milho) para geração dos produtos desejados (SCHNEITER, 2004; HUBMANN *et al*;2013).

Além da aplicabilidade nutricional, a utilização em pesquisas de caráter biotecnológico em frentes variadas merece destaque, o que se torna possível graças a versatilidade atrelada a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que são facilmente adaptadas às técnicas de cultivo em grande escala, crescendo em substratos

distintos, chamando atenção pela tolerância frente às condições físico-químicas extremas (BERRY, 1988; QUEROL *et al*;2003), além da manipulação gênica já bem fundamentada (GIBSON E MUSE; SCHNEITER, 2004; PEVSNER, 2015; WILLAERT, 2017).

Ao analisarmos as cepas selvagens, temos uma alta variabilidade genética associada. Dessa forma, a partir da ação humana, a pesquisa massiva em torno de características favoráveis à produção de alimentos já destacados permitiu a seleção das linhagens que contribuam para a geração de um resultado próspero.

Estudos realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) pertencente ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), coordenado pelo Prof. Rogelio Lopes Brandão, permitiram o desenvolvimento de uma estratégia de isolamento e seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com características adequadas à produção de cachaça de qualidade. Dessa forma, um protocolo de isolamento e seleção de estirpes com características desejáveis à produção de cachaça foi patenteado por Vicente e colaboradores (2006), gerando uma coleção de centenas de leveduras de interesse biotecnológico, as quais derivam de unidades produtoras de cachaça presentes nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia.

A produção de etanol relacionada aos microrganismos em destaque leva em análise parâmetros fundamentais como a fonte de carbono utilizada e a temperatura disponível. Em geral, células eucariotas respiram em condições aeróbicas, devido ao maior rendimento de ATP, todavia leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* realizam fermentação mesmo na presença de oxigênio. Apesar da menor produção energética, a alta geração de etanol – composto tóxico para outras espécies – oferece ao microrganismo vantagem competitiva, justificando a rota metabólica escolhida (DE DEKEN, 1966).

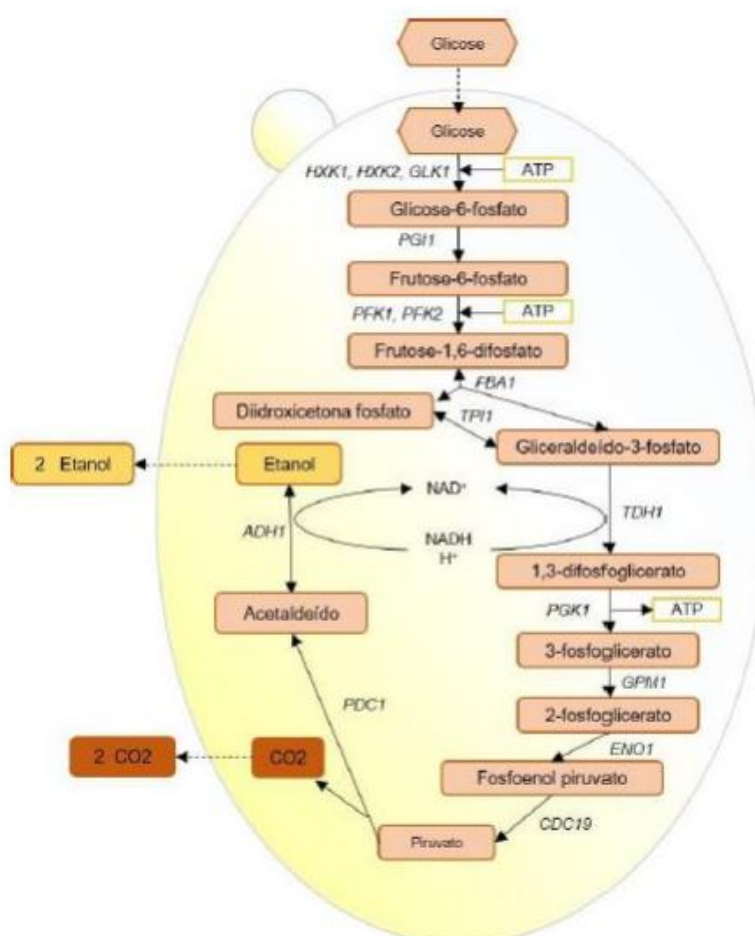
2.4 Fermentação alcoólica

Configurando-se como um processo crucial para produção do produto destacado no trabalho, a fermentação alcoólica consiste em um fenômeno anaeróbio de geração de energia a partir da degradação de fontes orgânicas de carbono com um rendimento líquido associado de duas moléculas de ATP. A baixa obtenção de energia advinda da reação relaciona-se à uma degradação parcial dos compostos

associados, havendo um grande potencial energético contido nas ligações químicas presentes nos compostos finais (FARIA-OLIVEIRA *et al*;2015, *apud* ARAÚJO, 2018).

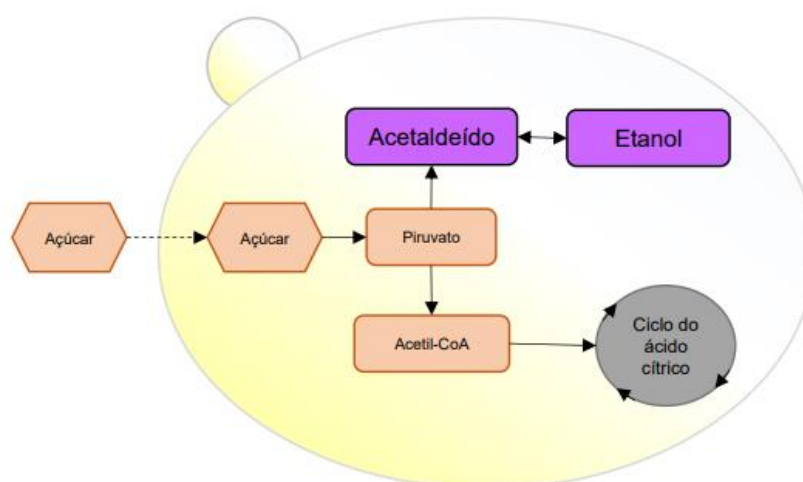
A geração de etanol, dióxido de carbono e ATP a partir dos açúcares contidos no meio no qual a levedura está inserida é derivada da ocorrência de doze reações consecutivas enzimaticamente catalisadas (FIG. 2). O processo celular relacionado aos microrganismos utilizados na manufatura da cachaça estende-se à capacidade de processamento de unidades monoméricas de carboidratos – como a glicose - uma vez que esses conseguem metabolizar estruturas complexas como a maltose, sacarose e maltotriose (FARIA-OLIVEIRA *et al*;2015; VENTURINI FILHO, 2016, *apud* ARAÚJO, 2018), fator essencial já que o meio no qual se encontram no âmbito produtivo é rico em tais compostos.

Figura 2: Fermentação alcoólica da glicose



Inicialmente, o produto alcoólico parte da conversão de açúcar em piruvato, o que gera energia na forma de ATP e reduz os cofatores em NADH. Desse ponto, duas são as rotas metabólicas associadas: a respiração e a fermentação (FIG.3). Nos eucariotos em grande maioria, a presença de oxigênio é determinante para a rota preferencial. Em condições aeróbicas, o piruvato é convertido em acetil-CoA via ação enzimática da piruvato desidrogenase, dando sequência ao ciclo do ácido cítrico. Já na ausência de oxigênio, o piruvato encaminha-se para metabolização via rota fermentativa (VENTURINI FILHO, 2010).

Figura 3: Rotas metabólicas do piruvato a partir da glicose



VENTURINI FILHO, 2010

A conversão de piruvato em etanol acontece em duas etapas: primeiro, o piruvato é convertido em acetaldeído pela ação da piruvato descarboxilase, liberando dióxido de carbono; em seguida, o acetaldeído é convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH). As enzimas representam papel chave na escolha das vias respiratória e fermentativa, metabolizando o piruvato (LIMA;2001, *apud* ARAÚJO, 2018).

É importante pontuar sobre esse processo que, especificamente para bebidas, a presença do dióxido de carbono é fator essencial na garantia da qualidade sensorial do produto (RANDEZ-GIL ET AL;2013). Quando analisamos a levedura em destaque, temos que o composto químico possui uma capacidade de mediar interações

celulares, o que contribui ao brotamento celular (VOLODYAEV *ET AL*;2013). Já o acetaldeído, apesar de ser apenas um intermediário entre o piruvato e o etanol, também é um composto volátil e sendo assim impacta na percepção olfativa da cachaça. Estudos indicam que, em baixas concentrações, a substância confere um aroma frutado interessante que pode contribuir a experiência do consumidor, já em altas concentrações, passa a conferir um aroma de grama, o que nem sempre é desejado (VENTURINI FILHO, 2010, *apud* CAMPOS, 2022).

2.5 O papel dos compostos secundários no sabor da cachaça

Em um mercado cada vez mais exigente, a otimização da experiência do consumidor com a cachaça é essencial para garantir a competitividade do produto. É fato que o aroma e o sabor da bebida se tornam objetos essenciais de estudo e a busca pelo entendimento do que influencia tais características fomenta espaço para o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas.

A percepção sensorial final da bebida fermentada é resultado de um conjunto de interações químiossensoriais complexas que se derivam do processo produtivo escolhido (FLEET, 2003, *apud* CAMPOS, 2022). O perfil sensorial passa a estar diretamente ligado tanto ao fator biológico associado ao fenômeno fermentativo e o microrganismo de escolha para realização desse, como aos compostos químicos gerados tanto no processo metabólico quanto dos já inerentes do substrato utilizado para preparação da bebida alcoólica.

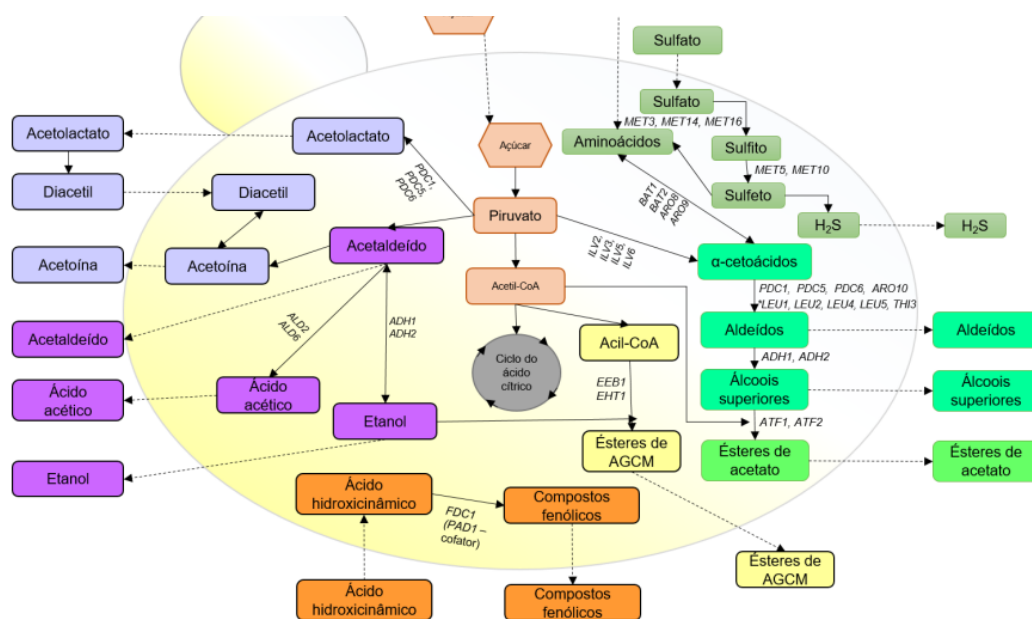
Durante a fermentação, algumas substâncias são produzidas pela ação bioquímica da levedura, gerando os compostos secundários que como já citado tem impacto direto no sabor e aroma do produto. Para que haja um acréscimo na qualidade final da cachaça, as substâncias benéficas (como álcoois superiores e ésteres) além de se fazerem presentes, devem estar em equilíbrio. Por outro lado, existem compostos indesejáveis que podem ser inerentes à fermentação e causam aromas desagradáveis, como o sulfeto de hidrogênio, diacetil e compostos fenólicos (KOBAYASHI *et al.*,2008; MOURET *et al*.;2015). A FIG.4 demonstra alguns compostos voláteis passíveis de obtenção durante o processo fermentativo.

Dos compostos fenólicos, sabe-se que os únicos que podem derivar do metabolismo de leveduras são o 4-vinilfenol (produto de descarboxilação do ácido p-

cumárico) e o 4-vinilguaiaacol, produto da descarboxilação do ácido ferúlico (KOBAYASHI *et al*;2008, *apud* CAMPOS, 2022).

Nesse quesito, cabe ao desenvolvimento selecionar a melhor rota produtiva, levando em conta análises massivas de características do microrganismo selecionado para que haja uma previsão correta sobre o comportamento aromático da bebida. Evitando a fabricação de um produto desagradável a percepção do paladar e olfato do consumidor.

Figura 4: Compostos voláteis importantes na produção de cachaça, sintetizados por *Saccharomyces cerevisiae*



Adaptado de PRETORIUS, 2016; DZIALO *et al*;2017

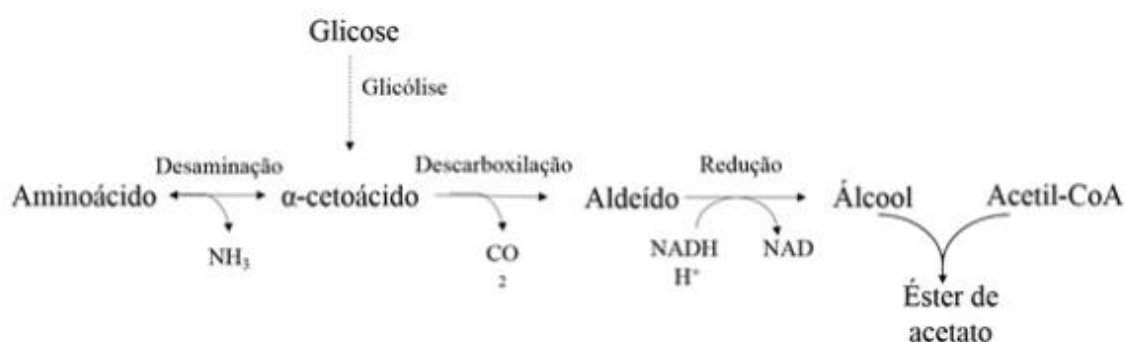
2.5.1 Álcoois superiores:

São considerados álcoois superiores os compostos que possuem mais que dois átomos de carbono, com peso molecular e ponto de ebulição maiores que o do etanol (LAMBRECHTS E PRETORIUS, 2000, *apud* CAMPOS, 2022). Essas substâncias podem ser produzidas via duas rotas bioquímicas, uma catabólica e outra anabólica.

Sendo considerada uma das mais bem descritas rotas bioquímicas na produção de aromas, a via catabólica de Ehrlich é um objeto de estudo poderoso (HAZELWOOD *et al*, 2008). Nela, os aminoácidos sofrem transaminação, ocorrendo

transferência do grupamento amino até os α -cetoácidos correspondentes. Em seguida, uma descarboxilação irreversível ocorre ao α -cetoácido, gerando um aldeído correspondente, e na conclusão da rota, esse composto é convertido nos álcoois a partir da reação mediada pela enzima álcool desidrogenase ou pela formaldeído desidrogenase. Já a via anabólica para produção de álcoois superiores ocorre a partir α -cetoácidos derivados da biossíntese de novos aminoácidos, a partir de carboidratos (FIG.5) (PIRES *et al*;2014, *apud* CAMPOS, 2022)

Figura 5: Vias metabólicas da formação de álcoois superiores e seus ésteres de acetato em *Saccharomyces cerevisiae*



FIGUEIREDO, 2016

De acordo com as substâncias pertencentes a esse grupo químico, temos um aroma respectivo gerado, permitindo assim – a partir da manipulação das características desejadas – a fabricação de produtos que atendam as preferências distintas de vários consumidores.

Os principais álcoois superiores encontrados em bebidas fermentadas, são: o 1-propanol, 1-butanol e isobutanol, que geram um aroma alcoólico marcante da bebida em destaque. Dentre eles, o álcool isoamílico tem a capacidade de produzir um aroma clássico de banana e o 2-fenil-etanol é responsável por um aroma agradável de rosas (SWIEGERS *et al*;2005; SAERENS *et al*;2006).

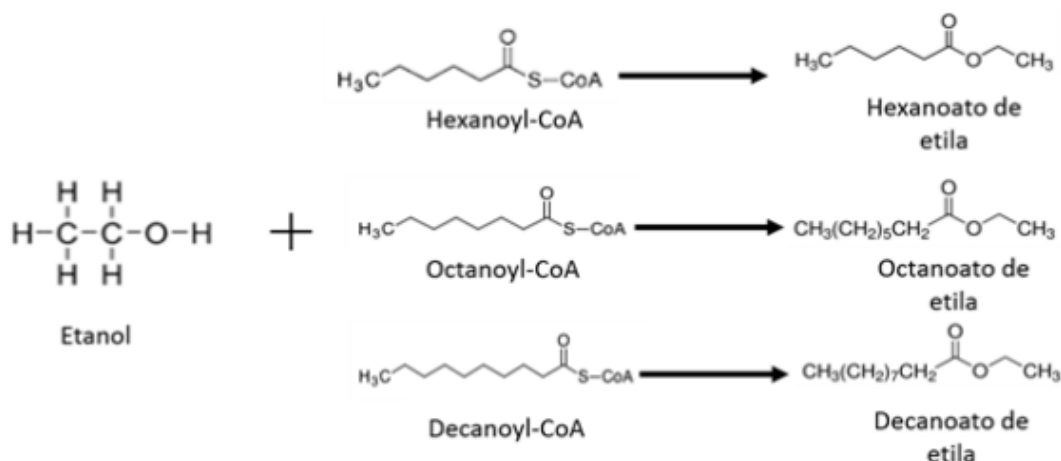
2.5.2 Ésteres

Sendo outro grupo químico de extrema importância aromática, os ésteres têm relação direta com os álcoois superiores, uma vez que as enzimas álcool acetil transferases os utilizam para gerar os representantes dessa classe química como produto. Além disso, tais compostos apresentam um efeito sinérgico, exaltando ou

mascarando a percepção de determinados grupamentos aromáticos (SAERENS *et al*;2008; PIRES *et al*;2014), tornando-o um alvo de estudo essencial.

Sua biossíntese se dá por reações de condensação que ocorrem nos álcoois presentes, graças a ação enzimática, que originarão os compostos em destaque, sendo duas as enzimas com destaque no assunto. A acetil-CoA irá gerar como produto ésteres de acetato, enquanto a ação da ACil-CoA resultará nos ésteres de ácidos graxos de cadeia média (AGCM). Nessa reação, o grupo acil, proveniente do Acil-CoA, é transferido para a molécula de etanol (FIG.6).

Figura 6: Reações químicas na biossíntese de ésteres de ácidos graxos decadeia média



FIGUEIREDO, 2016

Os ésteres possuem duas características essenciais para sua influência ao sabor final da bebida: a natureza lipofílica associada e o baixo tamanho de partícula. Ambas atuam de forma a facilitar a difusão dos compostos do citoplasma ao meio extracelular, o que permite um aumento na disponibilidade do composto aromático e, dessa forma, gera maior percepção de sabor, diferenciando o produto e o oferecendo maior destaque em comparação a tantos outros.

O entendimento do impacto dos ésteres aromáticos no sabor e aroma da bebida produzida também passa pela fisiologia humana. Sabe-se que o ser humano possui uma percepção acentuada para tais compostos, dessa forma, alterações nos níveis de produção dessas substâncias – por mais sutis que sejam – podem gerar impacto na percepção de aroma no produto final. A premissa expõe não só a importância desses compostos, como também a necessidade de um equilíbrio na

presença desses, uma vez que o excesso desses compostos tornaria o produto não palatável (SAERENS *et al*;2008; PIRES *et al*;2014).

O controle do crescimento de leveduras em meios específicos gera mutantes com efeitos interessantes para obtenção de maiores concentrações dos compostos aromáticos alvo. Estudos mostram que a capacidade de crescimento de leveduras na presença 5,5-5''-trifluoro-DL-leucina (TFL), um análogo da leucina, seleciona mutantes com menor efeito de feedback negativo para a biossíntese de leucina. Dessa forma, há um acúmulo de álcool isoamílico e acetato de isoamila associados (OBA *et al*;2005). Partindo do mesmo raciocínio, o crescimento na presença do análogo a fenilalanina o-fluoro ou p-fluoro-DL-fenilalanina, aumenta as concentrações de 2-feniletanol (FUKUDA *et al*;1990, *apud* ARAÚJO, 2018). Ainda sobre o acetato de isoamila, estudos realizados investigaram a influência de íons cobre na atividade enzimática relacionada. Ao decorrer da pesquisa, relacionaram a resistência aos íons cobre, sob concentração de 8mM, com a maior capacidade de produção do éster em destaque (HIROKA *et al*;2010, *apud* ARAÚJO, 2018).

Já a capacidade de crescimento do microrganismo na presença de Cerulenina, droga inibidora da síntese de ácido graxo, consegue diferenciar linhagens que possuem uma mutação em FAS2, gene responsável pela codificação da enzima ácido graxo sintase. Aqueles resistentes a Cerulenina, capazes de crescer no meio enriquecido com a droga, possuem maior produção de hexanoato de etila associado com uma menor geração de ácido capróico (ICHIKAWA *et al*;1991, *apud* ARAÚJO, 2018).

2.6 A floculação associada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Por definição, entende-se que a floculação é o fenômeno reversível e dependente de cálcio de agregação celular – não relacionado a reprodução – que gera como resultado flocos, os quais tem uma sedimentação celular intensa observada (SOARES 2011). Tal acontecimento também passa a ser um mecanismo de adaptação a estresses causados por estímulos diversos, já que a aglomeração celular contribui para sobrevivência dos microrganismos (VERSTREPEN *et al.*, 2003). As células são consideradas floculantes quando possuem em sua parede celular estruturas glicoproteicas específicas, as lectinas ou floculinas, as quais tem a

capacidade de formar interações com carboidratos (resíduos de manose como as alfa-mananas) presentes na estrutura da parede celular das leveduras vizinhas (GOSENS E WILAERT 2010; SOARES, 2011).

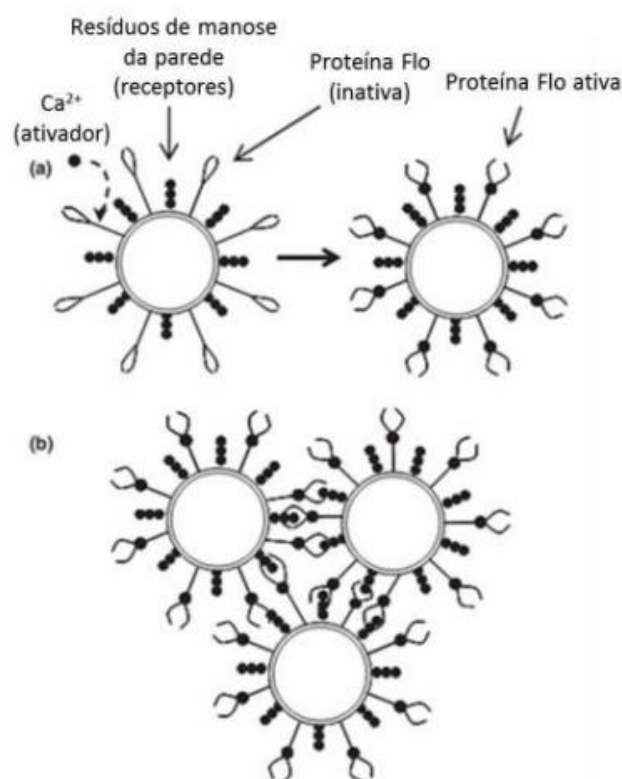
No processo descrito, faz-se por necessária a presença de íons de cálcio para a ativação e garantia da correta conformação das lectinas. Dessa forma, as floculinas, que são sintetizadas pelos microrganismos floculantes, são exportadas até a parte externa da parede celular e realizam as interações com as mananas, carboidratos que se fazem presentes nas células de qualquer célula vizinha, independente do caráter floculante estar ou não presente (BAUER *et al*;2010), como demonstrado pela FIG.6. Interações inespecíficas como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas reforçam e desempenham caráter auxiliar na estabilização dos flocos formados (SOARES, 2010).

A importância da floculação para produção de bebidas fermentadas é denotada pela facilitação de obtenção das células de levedura do meio líquido fermentativo ao fim do processo, aumentando a eficiência econômica da manufatura do produto (VERSTREPEN *et al*;2003; ALVAREZ *et al*;2014). Na produção de cachaça essa característica é essencial já que em escala industrial, a fermentação do caldo derivado da cana-de-açúcar é realizada de maneira sequencial pela *Saccharomyces cerevisiae*, ou seja, as leveduras empregadas são normalmente reutilizadas em vários lotes da bebida.

Ao considerarmos a realidade dos produtores de cachaça, em que a maioria não detém um aporte tecnológico intenso, a utilização de estirpes floculantes é de suma importância findando a obtenção mais rápida e em grande quantidade das leveduras do mosto fermentado sem a necessidade da centrifugação (VICENTE *et al*;2006; SOARES, 2011).

O caráter floculante das espécies utilizadas na produção de bebidas também evidencia um sistema de classificação eficiente. Ao analisarmos os fermentadores, é possível verificar que as cepas de alta fermentação, as que sobem para superfície do fermentador – provavelmente pela adsorção das bolhas crescentes de dióxido de carbono – possuem menor caráter floculante do que as estirpes de baixa fermentação, aquelas que são capazes de realizar floculação em maior quantidade, e por sedimentação, acabam ficando concentradas no fundo das dornas produtoras (SOARES, 2011).

Figura 7: Floculação da *Saccharomyces cerevisiae* exemplificada. Mediante aos íons de cálcio (a) glicoproteínas específicas de membrana alteram conformação, fazendo interações com resíduos de manose (b) em células vizinhas



Adaptado de SOARES, 2011

Bem como qualquer outra característica inerente ao comportamento dos microrganismos na produção de bebidas, a floculação também é influenciada por vários fatores, sendo esses: a presença de cátions, temperatura do mosto, pH associado, concentração de açúcares e álcool no meio e expressão gênica codificante das glicoproteínas específicas (VERSTREPEN *et al*;2003a; GOOSENS e WILLAERT, 2010, *apud* CAMPOS, 2022).

Dois são os fenótipos de destaque relacionados a floculação em *Saccharomyces cerevisiae*: FLO1 e NEWFLO. Analisando cepas de fenótipo FLO1, observa-se floculação constitutiva, a qual é inibida em meios com concentrações elevadas de derivados de manose. Esse fenótipo ainda se mostra associado com a expressão gênica de FLO1, FLO5 e FLO9, como observado em cepas laboratoriais da levedura em destaque. (GOOSENS e WILLAERT, 2010). Já o fenótipo NEWFLO, se mostra presente na fase estacionária com alta sensibilidade à manose, glicose ou

maltose presentes no meio. A característica fundamental dessa floculação é vista quando a concentração de carboidratos no mosto fermentativo é alta, uma vez que leva a inibição do fenômeno floculante.

3 JUSTIFICATIVA

Sendo a mais tradicional bebida destilada brasileira, com uma produção associada de 1,2 bilhões de litros por ano, mais de 40 mil produtores e 4000 marcas, a cachaça detém cerca de 6,6% do mercado nacional de bebidas alcoólicas, ocupando entre as destiladas, a primeira posição com cerca de 87% do mercado e um consumo de 7 litros per capita por ano (IBRAC, 2023). O mercado internacional, apesar do baixo volume atual de exportação, possui posição de destaque indiscutível já que a bebida ocupa a terceira posição como destilado mais consumido no planeta (SOUZA *et al.*, 2012). O interesse crescente na internacionalização da bebida é claramente demonstrado por recentes aquisições de grandes grupos econômicos, como a ação da DIAGEO ao adquirir a marca Ypioca em 2012 (CERVIERI JÚNIOR, 2017).

Fica clara a importância que a bebida tem para economia nacional, impactando desde pequenos produtores, que tiram por vezes a maior parte da sua renda com os lucros obtidos na produção da bebida, até marcas mais populares que estão sendo impulsionadas por grandes corporações. Todavia, dificuldades como a informalidade nas operações, com o cultivo técnicas rudimentares na produção, e a falta de eficiência produtiva relacionada implicam no decréscimo do potencial da bebida.

Com tais obstáculos em voga, a implementação de técnicas científicas para isolamento e seleção de leveduras nas dornas de fermentação de cachaça torna-se imprescindível para o acréscimo da qualidade do produto, tornando possível a obtenção de microrganismos com fenótipos desejáveis ao processo de produção da bebida tradicional. Portanto, o presente trabalho contribui diretamente para o isolamento e seleção de estirpes de leveduras com potencial tanto para ajudar os produtores a vencerem os obstáculos inerentes ao processo produtivo da cachaça, como dificuldade de separação das células de leveduras do mosto fermentado por sedimentação ou ainda extravasamento das dornas de fermentação por produção excessiva de espuma, como também para aumentar e/ou padronizar a qualidade sensorial da bebida.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Isolar e selecionar estirpes de leveduras de *Saccharomyces cerevisie*, com fenótipos desejáveis ao processo produtivo de cachaça, a partir de amostra coletada em dorna de fermentação de unidade produtora da bebida localizada na cidade de Caetite, no estado da Bahia.

4.2 Objetivos específicos:

- Obter cultura pura de levedura a partir de amostra coletada em dorna de fermentação para produção de cachaça;
- Avaliar a capacidade de crescimento dos isolados em diferentes fontes de carbono e nitrogênio;
- Avaliar a resistência dos isolados pré-selecionados a diferentes condições estressantes (estresse térmico, alcoólico e osmótico);
- Avaliar a resistência dos isolados pré-selecionados à presença de diferentes drogas;
- Avaliar, qualitativa e quantitativamente, o comportamento floculativo dos isolados pré-selecionados;
- Avaliar o desempenho fermentativo dos isolados pré-selecionados;
- Identificar a espécie dos isolados com melhor desempenho.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção e armazenamento da amostra

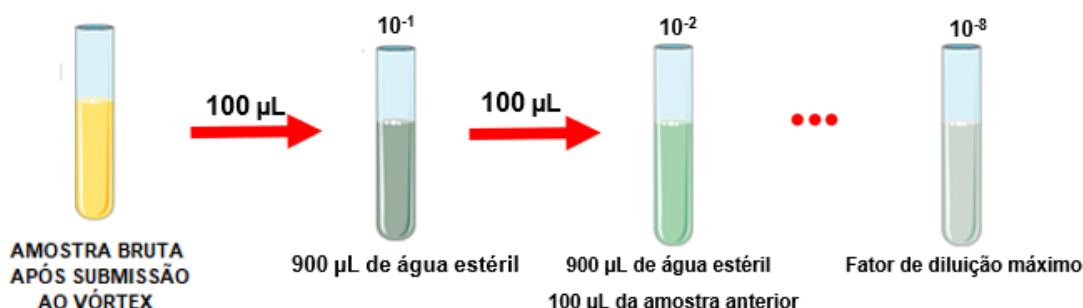
A amostra utilizada foi coletada de uma dorna de fermentação de cachaça em uma unidade produtora de pequeno porte localizada na cidade de Caetite, no estado da Bahia. A coleta foi realizada em março de 2023, utilizando-se um frasco de vidro previamente esterilizado com álcool etílico 70% (v/v), e a amostra foi mantida no frasco

tampado em baixa temperatura durante o transporte até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), onde foi armazenada sob refrigeração (4°C) durante toda a fase experimental.

5.2 Isolamento de colônias

Após homogeneização em agitador de tubos, a amostra foi submetida a diluição seriada conforme demonstrado na FIG. 8. Em seguida, alíquotas de 200 µL de amostra diluída adequadamente foram plaqueadas com auxílio de uma alça de Drigalski, em ágar YP Sacarose 8% (extrato de levedura 1% p/v, peptona bacteriológica 2% p/v, ágar-ágar 1,5% p/v e sacarose 8% p/v) com cloranfenicol (100 µg/mL). As placas de Petri inoculadas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. As colônias de leveduras isoladas obtidas foram transferidas para 5 microplacas de 96 poços preenchidas (placas-mãe) com YP Sacarose 8% e cloranfenicol (100 µg/mL) (VICENTE *et al.*, 2006).

Figura 8: Demonstração de método de diluição



Elaboração própria

5.3 Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Os 480 isolados foram submetidos ao teste de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Para isso, foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo os meios teste YP (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%) Manitol 2%, YP Lactose 2% e YNB (Yeast Nitrogen Base) 0,17% com lisina 0,14%. As microplacas foram incubadas

a 30 °C por até 48 horas e os isolados que não apresentaram crescimento foram selecionados para a próxima etapa (BARBOSA *et al.*, 2013).

5.4 Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse

5.4.1 Estresse alcoólico

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo YP Sacarose 8% acrescido com etanol 10% e 15% (v/v). As microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento nas duas condições foram considerados tolerantes ao etanol (ICHIKAWA *et al.*, 1991; ARIKAWA *et al.*, 2000; *apud* VICENTE *et al.*, 2006).

5.4.2 Estresse térmico

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo YP Sacarose 8% e as microplacas foram incubadas a 37 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados termo-resistentes (ICHIKAWA *et al.*, 1991; ARIKAWA *et al.*, 2000 *apud* VICENTE *et al.*, 2006).

5.4.3 Estresse osmótico

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo YP Sacarose 20% e as microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes ao estresse osmótico (ICHIKAWA *et al.*, 1991; ARIKAWA *et al.*, 2000 *apud* VICENTE *et al.*, 2006).

5.5 Confecção de novas placas-mães

Após análise dos resultados obtidos na primeira e segunda etapas da seleção de leveduras, foi feita uma sobreposição de dados de forma a selecionar para a terceira etapa apenas os isolados que não cresceram utilizaram lisina, manitol e lactose como fonte de carbono ou nitrogênio e que demonstraram resistência ao estresse osmótico, térmico e alcoólico (até 15% de etanol). Para tal, 10 uL de cultura celular referente aos isolados de interesse foram transferidos para as novas placas-

mãe, contendo o mesmo meio descrito no item 5.2 que foram incubadas a 30° C por 48 horas e passaram a ser utilizadas para os testes posteriores.

5.6 Teste de resistência a drogas

5.6.1 Resistência à cerulenina

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo meio teste composto por YNB 0,17%, glicose 1% e cerulenina 25 µM. As microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes à droga (ICHIKAWA *et al.*, 1991).

5.6.2 Resistência à 5,5',5'' -trifluoro-D, L-leucina (TFL)

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo meio teste composto por YNB 0,17%, glicose 1% e TFL 0,5 mM. As microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes à droga (ASHIDA *et al.*, 1987; BENDONI *et al.*, 1999; CASALONE *et al.*, 1997; CAVALIERI *et al.*, 1999; VICENTE *et al.*, 2007).

5.6.3 Resistência ao íon cobre (Cu²⁺)

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo meio teste composto por YPD 2% e CuSO₄ 8 mM. As microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes à droga (HIROOKA *et al.*, 2010).

5.6.4 Resistência à p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP):

Os isolados pré-selecionados foram transferidos das placas-mãe, com auxílio de um replicador, para microplacas de 96 poços contendo meio teste composto por YNB 0,67%, glicose 2% e PFP 1 mg/mL. As microplacas foram incubadas a 30 °C por até 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes à droga (FUKUDA *et al.*, 1990).

5.7 Teste de Floculação

5.7.1 Avaliação Qualitativa

Os isolados que apresentaram resistência a duas, três ou quatro drogas foram submetidos a análise qualitativa da floculação. Para isso, os isolados pré-selecionados foram cultivados em tubos de vidro rosqueados contendo 3 mL de YPD 4% a 30°C, em Shaker (Incubador Rotatório New Brunswick G25) a 200 rpm por 48 horas. As cepas LBCM761 e Etanol Red foram cultivadas da mesma forma e utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Todos os tubos foram agitados em agitador de tubos simultaneamente por 30 segundos e, em seguida, a formação de flocos e sedimentação das células foi avaliada a olho nu, de 5 em 5 minutos, durante 30 minutos. Os isolados foram classificados com floculação muito baixa (+), baixa (++) , intermediária (+++), alta (++++) ou muito alta (+++++), sendo a classificação dada de acordo com o comportamento da cepa controle adotada (VICENTE *et al.*, 2007).

5.7.2 Avaliação Quantitativa (Helm's Test)

A quantificação da floculação foi baseada no teste de Helm's como descrito por Alvarez *et al.* (2014). Inicialmente, os isolados que apresentaram floculação muito alta na etapa anterior foram inoculados por estria em ágar YP Sacarose 8% com cloranfenicol (100 µg/mL). Após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C, 3-4 colônias de cada isolado pré-selecionado foram transferidas para tubo de fundo cônico de 15 mL contendo 3 mL de YP Sacarose 8%, incubadas em Shaker (Incubador Rotatório New Brunswick G25) a 200 rpm, 30 °C durante 48h (D'HAUTCOURT & SMART, 1999; JIN & SPEERS, 1998; JIN & SPEERS, 2000; POWELL *et al.*, 2003; VERSTREPEN *et al.*, 2001; VERSTREPEN *et al.*, 2003b; VICENTE, 2007).

Após confirmação de ausência de contaminação por bactérias através de um microscópio, os tubos de cultivo celular foram submetidos a 5 minutos de centrifugação a 3000 rpm e o sobrenadante descartado. Os sedimentos celulares foram lavados 3 vezes com 2 mL de água destilada estéril utilizando centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram ressuspensas com 1 mL de EDTA 0,5 M pH 7,0 e a densidade ótica padronizada no intervalo de 0,35 a 0,40 a 600 nm.

Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada suspensão de células foram transferidas para 9 microtubos de 1,5 mL, onde 3 alíquotas foram tratadas como controle e 6 alíquotas tratadas como experimentais. Todas as amostras foram submetidas a 5 minutos de centrifugação a 12000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, as amostras-controle foram ressuspensas com 1 mL de EDTA 0,5 M pH 7, homogeneizadas em agitador de tubos e deixadas em repouso até a finalização do tratamento das amostras experimentais. Estas, por sua vez, foram ressuspensas em 1 mL de sulfato de cálcio (0,5 g/L), homogeneizadas em agitador de tubos e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após descarte do sobrenadante, aos sedimentos celulares foi adicionado tampão de suspensão (sulfato de cálcio 0,5 g/L, acetato de sódio 6,8 g/L, ácido acético glacial 4,5 g/L, etanol 4% pH 4,5).

As nove alíquotas de cada cepa (controles e experimentais) foram agitadas em agitador de tubos, simultaneamente, por 30 segundos e então deixadas em repouso por 15 min para a sedimentação dos flocos celulares. De cada tubo, foram coletados 100 µL de amostra (Controles e Experimentais) e adicionados a 900 µL de água para realização da leitura da D.O a 600 nm. O percentual de floculação foi calculado através da fórmula abaixo:

$$\% \text{ floculação} = \frac{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{Controle} - \text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{Experimental}}{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{Controle}} \times 100$$

5.8 Desempenho fermentativo

Cada um dos isolados pré-selecionados foram ativados em tubos de fundo cônico de 15 mL, contendo 3 mL de meio YP Sacarose 4%, que foram incubados a 30°C, sob agitação em Shaker (Incubador Rotatório New Brunswick G25) a 200 rpm durante 24 horas. Então, os 3 mL de cultura celular foram vertidos em tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 20 mL de meio YP Sacarose 8%, e os frascos foram incubados nas mesmas condições anteriores. Após 24 horas, os 20 mL de cultivo de cada um dos isolados de interesse foram vertidos em Erlenmeyers contendo 200 mL de YP Sacarose 8%, os quais foram incubados por mais 24 horas sob as condições

supracitadas. O mesmo procedimento foi realizado para cultivar a cepa PE-2, utilizada como controle positivo da fermentação.

Uma vez obtidos os cultivos celulares, suas respectivas D.O foram mensuradas e os cálculos do volume de cada célula a ser utilizado foram realizados de forma padronizar a D.O inicial igual a 5 em cada tubo de fermentação. Tais volumes das culturas celulares foram transferidos para tubos de fundo cônico de 50 mL estéreis e centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos celulares ressuspensos em 10 mL do meio de fermentação previamente esterilizado e composto por solução de açúcar cristal 15° Brix, triptona (20 g/L) e extrato de levedura (20 g/L).

A montagem do sistema fermentativo foi feita considerando análises em triplicata para cada isolado selecionado. Para isso, borrifou-se etanol 70% dentro e fora dos *airlocks*, e após secagem em temperatura ambiente, eles foram preenchidos com 10 mL de água destilada estéril e tampados. Aos tubos de fermentação, foram adicionados os sedimentos celulares ressuspensos anteriormente e 40 mL do meio de fermentação, finalizando a montagem com o encaixe dos *airlocks* na parte superior dos tubos de fermentação. O experimento foi realizado em triplicata.

Imediatamente após a montagem dos sistemas de fermentação, os tubos foram pesados e posteriormente incubados em estufa a 30 °C, agitação a 350 rpm por 24 horas. Nesse intervalo, foram realizadas pesagens dos tubos de hora em hora nas primeiras 11 horas e nas 3 horas finais. Dessa mesma maneira, foi feito o monitoramento da produção de espuma por meio de medição manual com régua.

A partir do feito, estimou-se a produção de etanol via perda de peso ao longo do experimento, respeitando a fórmula abaixo, na qual 92 corresponde à massa de duas moléculas de etanol e 88, à massa de duas moléculas de gás carbônico, geradas a partir de cada molécula de glicose metabolizada durante a fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

$$P_{\text{etanol}} (\text{g/L}) = \text{Perda de peso (g)} \cdot [(\text{MM etanol} : \text{MM CO}_2) : \text{Volume final (L)}]$$

$$P_{\text{etanol}} (\text{g/L}) = \text{Perda de peso (g)} \cdot [(92 : 88) : 0,05 (\text{L})]$$

$$P_{\text{etanol}} (\text{g/L}) = \text{Perda de peso (g)} \cdot 20,9$$

5.9 Identificação de Espécie

5.9.1 Amplificação da região ITS

A região ITS (internal transcribed spacer region), corresponde ao local intergênico do DNA ribossomal dos microrganismos em análise. Conforme Oliveira e colaboradores (2008), para promoção de sua amplificação, dois primers foram utilizados: ITS1 (5' G TAG GTG AAC CTG CGG 3') e ITS4 (5' T CCG CTT ATT GAT ATG C 3').

Para tal, foi realizada reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando como amostra parte de colônias previamente plaqueadas dos isolados pré-selecionados. Assim, uma pequena quantidade da colônia de cada isolado foi homogeneizada em 5 µL de água ultrapura em microtubos de 200 µL. Os tubos foram levados ao forno microondas por 5 minutos e, posteriormente, foram adicionados às amostras 1 µL de cada primer (10 mM), 1,5 µL de dNTP (2,5 mM), 13,8 µL de água purificada, 2,5 µL do tampão 10X com magnésio (Sinapse) e 0,2 µL da Taq DNA polimerase (Sinapse).

Primeiramente, a amplificação passou por uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida por 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Depois do último ciclo, realizou-se uma extensão final em 72°C por 2 minutos. A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X. Os produtos de PCR (5 µL) foram aplicados no gel juntamente com 5 µL de loading buffer 6X (Sinapse) contendo gel red. Após 40 minutos de corrida eletroforética a 120 V, o gel foi submetido à luz UV para visualização das bandas. O marcador de 1Kb DNA (Fisher) foi usado como padrão (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

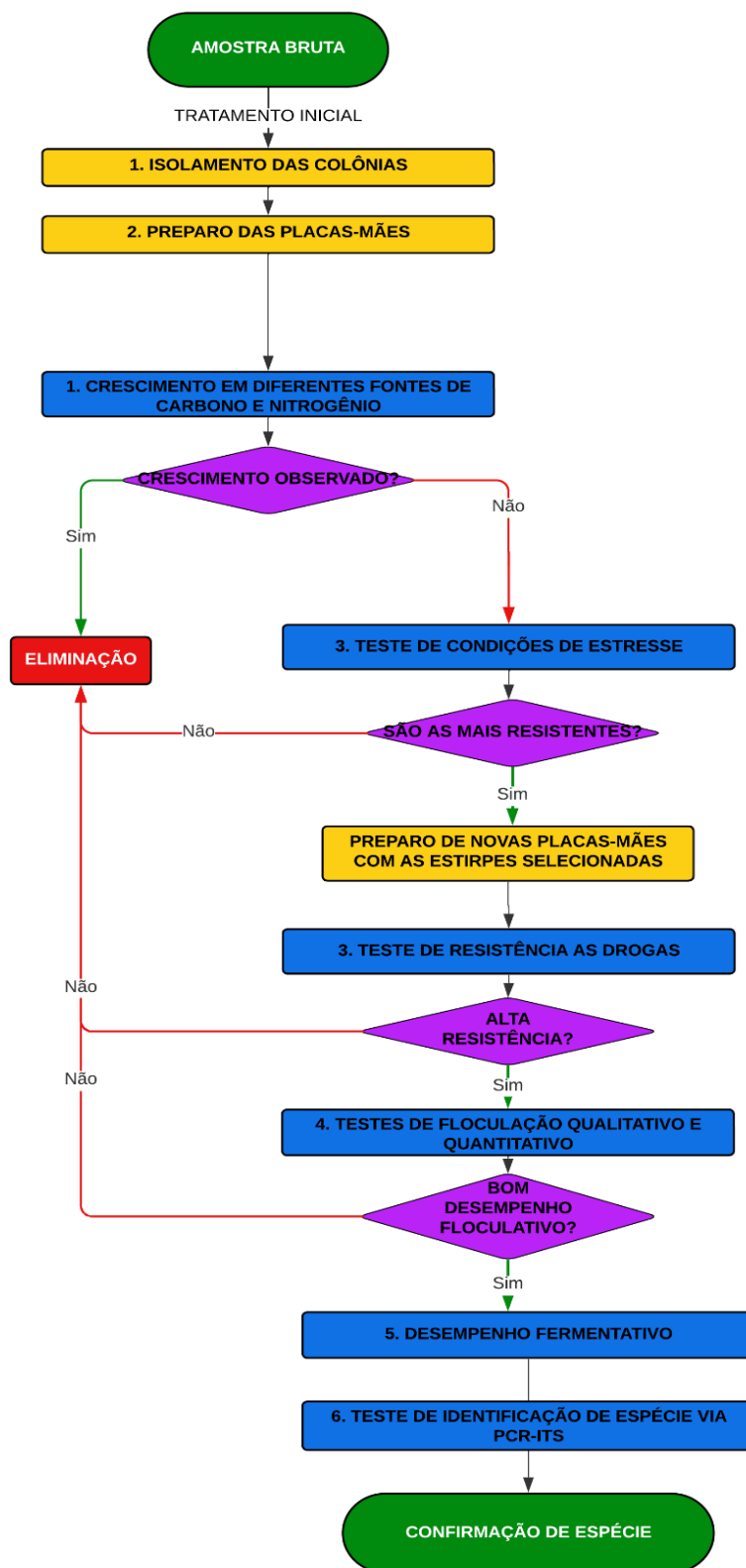
5.9.2 Digestão com enzimas de restrição

Primeiramente, adicionou-se em um microtubo de 1,5 mL 11 µL do produto PCR-ITS relativo a cada isolado pré-selecionado, 2 µL do tampão recomendado pelo fabricante, 0,7 µL da enzima Hae III e 6,3 µL de água ultrapura. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C overnight. Finalmente, o produto da

digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) em tampão TAE 1X. As amostras resultantes (20 µL) foram aplicadas no gel juntamente com 10 µL de loading buffer 6X (Sinapse) contendo gel red. Após 40 minutos de corrida eletroforética a 120 V, o gel foi submetido à luz UV para visualização das bandas. O marcador de 100 pb DNA (Invitrogen) foi usado como padrão (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

5.10 Fluxograma experimental:

Figura 9: Fluxograma experimental para isolamento e seleção de estirpes de leveduras com potencial para otimizar a produção e a qualidade da cachaça



Elaboração própria

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Teste de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Sabe-se que a glicose representa a fonte de carbono mais utilizada pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, seguida pela frutose, manose e galactose (BERRY, 1988), sendo essas de indubitável importância para biossíntese de vários constituintes celulares das leveduras tais como carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, com sua oxidação fornecendo energia para as células. Em relação ao nitrogênio, as *Saccharomyces cerevisiae* têm sido flexíveis, utilizando a maioria dos aminoácidos como fonte de nitrogênio (VURALHAN *et al.*, 2005 *apud* ARAÚJO, 2018).

Considerando que leveduras do gênero *Saccharomyces* não metabolizam lactose, manitol e lisina, realizou-se uma análise submetendo todos os 480 isolados a três condições distintas: utilização de lactose e manitol como fontes de carbono, além da utilização de lisina como fonte de nitrogênio com o objetivo de selecionar leveduras pertencentes ao gênero de interesse. Os resultados obtidos referentes a primeira etapa da seleção de leveduras estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos na primeira fase da seleção de leveduras referente à capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Isolados testados	Fontes de carbono		Fonte de nitrogênio
	Lactose 2%	Manitol 2%	Lisina 0,14%
480	2	1	2

(Fonte: Elaboração própria)

Observou-se que 476 colônias (99,2%) não apresentaram crescimento em nenhuma das três condições avaliadas, indicando que a maioria dos isolados pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Do total de isolados, apenas 4 apresentaram crescimento nas condições testadas, sendo 2 capazes de metabolizar só lisina, 1 capaz de metabolizar só a lactose e 1 capaz de metabolizar tanto o manitol quanto a lactose.

6.2 Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse

A avaliação do comportamento de leveduras, frente às diferentes formas de estresse, torna-se fundamental para obtenção de uma boa estirpe voltada para produção da cachaça. O fator correlaciona-se a duas premissas que estão interligadas, a primeira consiste no fato de que a maior parte da produção da bebida é feita por produtores de pequeno porte, que não dispõem das melhores condições de manufatura ou seguem as técnicas mais atualizadas no contexto, o que leva ao segundo ponto, que é a submissão das leveduras a condições fora da idealidade de crescimento.

Caso o microrganismo adotado não desempenhe bem em condições adversas, a produção vai ser ineficiente, gerando não só prejuízo ao produtor como também uma bebida final fora do parâmetro de qualidade esperado, o que pode prejudicar a imagem da marca frente aos consumidores, impactando negativamente no estabelecimento dentro de um mercado já complexo.

Dessa forma, as leveduras foram submetidas aos estresses térmico, alcoólico e osmótico, e os resultados da segunda etapa da seleção estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos na segunda fase da seleção de leveduras referente à tolerância a diferentes tipos de estresse inerente ao processo produtivo da cachaça.

Isolados testados	Tolerância aos estresses			
	37 °C	Sacarose 20%	Etanol 10%	Etanol 15%
480	480	480	479	136

(Fonte: Elaboração própria)

Observou-se que todas os 480 isolados demonstraram resistência ao estresse térmico e osmótico. Em relação ao estresse alcoólico, apenas 1 isolado não foi resistente à presença de etanol 10%, enquanto 136 cepas foram capazes de crescer na presença de etanol a 15%, indicando uma seletividade marcante nesse ponto. Como o etanol é o principal produto da fermentação alcoólica, para que não haja prejuízos no rendimento, é importante que a levedura empregada no processo não seja inibida pelo produto.

Após uma sobreposição de dados obtidos na primeira e segunda etapa da seleção de leveduras, os 480 isolados foram classificados em três grupos distintos conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação dos isolados após sobreposição de dados obtidos na primeira e segunda etapas da seleção de leveduras destinadas à produção de cachaça.

Classificação dos isolados		
Menos Resistentes (Não cresceram em lisina, manitol e lactose, foram resistentes ao estresse osmótico, térmico e etanol 10%)	342 de 480	71,3%
Mais Resistentes (Não cresceram em lisina, manitol e lactose, foram resistentes a todas as condições de estresse)	133 de 480	27,7%
Não Selecionadas (Cresceram em lisina, manitol ou lactose e/ou não foram resistentes a 37°, estresse osmótico ou alcoólico)	5 de 480	1,0%

(Fonte: Elaboração própria)

O grupo mais abundante, 71,3% da amostra, se refere aos isolados considerados menos resistentes, abrigando aqueles que não cresceram em lisina, manitol e lactose e toleraram alta temperatura e a presença de sacarose 20% e etanol 10% no meio, sendo 342 colônias correlacionadas ao grupo. O conjunto mais promissor, que agrupa 133 colônias classificadas como mais resistentes, representa 27,7% da amostra e é composto por isolados que não cresceram em lisina, manitol e lactose, e ainda toleraram todas as condições de estresse, inclusive etanol 15%. Já o terceiro e último grupo, composto por 5 colônias, se refere às colônias não

selecionadas por terem apresentado crescimento em lisina, manitol e/ou lactose, ou ainda não terem tolerado alta temperatura e/ou estresse osmótico.

Optou-se por seguir avaliando 133 isolados que, provavelmente, pertencem ao gênero *Saccharomyces* e se mostraram mais resistentes, sendo capazes de suportar todas as condições de estresse avaliadas no presente trabalho. Tais isolados foram transferidos para novas placas-mães, com o cuidado para resguardar a informação da correspondência de cada colônia com os resultados obtidos nas etapas anteriores.

6.3 Teste de resistência a drogas

Oferecendo insights valiosos sobre a produção de grupos químicos de interesse, o teste de resistência a drogas é descrito na literatura como metodologia para identificação indireta de produção de maiores concentrações de compostos voláteis por microrganismos fermentadores.

Nessa etapa, 133 colônias foram avaliadas quanto à presença de cerulenina, TFL, íons cobre e PFP. Os resultados obtidos na terceira etapa de seleção de leveduras estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos na terceira fase da seleção de leveduras referente à resistência a drogas associadas a rotas metabólicas de síntese de compostos aromáticos.

Isolados testados	Drogas avaliadas			
	Cerulenina	TFL	Cu ²⁺	PFP
133	4	133	4	8

(Fonte: Elaboração própria)

Todas as colônias avaliadas cresceram em TFL, indicando uma ampla resistência a esse composto. Em contrapartida, apenas algumas colônias foram capazes de crescer em presença de cerulenina (4 colônias), Cobre (4 colônias) e PFP (8 colônias), sugerindo uma maior seletividade dessas drogas em comparação ao TFL.

A capacidade de crescimento do microrganismo em cerulenina, por exemplo, relaciona-se a uma maior produção de hexanoato de etila, bem como uma menor geração de ácido capróico (ICHIKAWA *et al.*, 1991). Já a capacidade de crescimento de leveduras na presença 5,5-5"-trifluoro-DL-leucina (TFL), fornecem acúmulos de

álcool isoamílico e acetato de isoamila (OBA *et al.*, 2005). Partindo do mesmo raciocínio, o crescimento na presença do análogo a fenilalanina o-fluoro ou p-fluoro-DL-fenilalanina, aumenta as concentrações de 2-feniletanol (FUKUDA *et al.*, 1990). O acetato de isoamila tem sua maior produção também associada a leveduras que apresentam resistência aos íons cobre (HIROKA *et al.*, 2010).

Considerando que a resistência a múltiplas drogas indica produção de compostos aromáticos de interesse, os quais podem ser vantajosos na obtenção de um perfil sensorial único na bebida final, contribuindo para a popularização e estabelecimento da marca, temos como fato estabelecido que quanto mais variada a resistência à drogas apresentada pela levedura, mais altas serão as possibilidades de geração de aromas diferenciados para a bebida. Após sobreposição dos resultados, observou-se que dos 133 isolados testados, 124 foram resistentes a apenas uma droga, 5 foram resistentes a duas drogas, 1 resistente a três drogas e 3 resistentes a todas as quatro drogas testadas. Sendo assim, foram selecionados para a próxima etapa da seleção de leveduras aqueles que apresentaram resistência a pelo menos duas drogas, ou seja, 9 candidatos.

6.4 Avaliação da floculação

Considerando a realidade dos produtores de cachaça, em que a maioria não detém um aporte tecnológico avançado, a utilização de estirpes floculantes é de suma importância para a obtenção mais rápida e em grande quantidade das leveduras do mosto fermentado sem a necessidade da centrifugação (VICENTE *et al.*, 2006; SOARES, 2011). É importante destacar que quanto maior a capacidade de floculação associada, maiores são os agregados celulares formados. Esses agregados celulares têm maior peso, o que geralmente torna a sedimentação mais rápida. Por outro lado, estirpes com baixa capacidade floculante permanecem suspensas por mais tempo, o que dificulta a separação das leveduras e do mosto fermentado e causa prejuízos uma vez que diminui a massa celular a ser reutilizada em novo processo fermentativo.

Primeiramente, foi realizada uma análise qualitativa do comportamento dos isolados pré-selecionados sem a presença de fatores indutores da floculação, na qual foram observados visualmente a formação de flocos e velocidade de sedimentação.

Conforme apresentado na Tabela 5, observou-se após 5 minutos de repouso uma floculação incipiente de todos os isolados avaliados, que foi intensificada consideravelmente entre 15 e 25 minutos. A maioria dos isolados atingiu um nível máximo de floculação (+++++) em 25 minutos, dada a classificação de acordo com o comportamento da cepa controle, sendo denotadas como altamente floculantes pois, apesar da floculação não ter sido induzida, os isolados formaram flocos e se depositaram no fundo dos tubos em um tempo relativamente curto.

Tabela 5: Resultados do teste de floculação qualitativa ao longo de 30 minutos.

Controles	Classificação do comportamento floculativo					
	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
LBCM761	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Etanol Red	-	-	-	-	+	+
Isolados	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
A1-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
H1-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
A10-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
A11-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
A12-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
C12-1	++	++	+++	++++	+++++	+++++
A1-2	++	++	+++	++++	+++++	+++++
F1-2	++	++	+++	++++	+++++	+++++
H1-2	++	++	+++	++++	+++++	+++++

Legenda: (-) floculação desprezível, muito baixa (+), baixa (++), intermediária (+++), alta (++++), ou muito alta (+++++). (**Fonte:** Elaboração própria)

A fim de diferenciar o comportamento floculativo apresentado entre os isolados pré-selecionados mediante a presença de cálcio, que é um fator que pode induzir a floculação em algumas leveduras, a análise quantitativa da floculação foi realizada e os resultados estão expressos na Tabela 6.

Com base nos dados obtidos, percebe-se que a maior parte dos isolados pré-selecionados, exceto o de código C12-1, apresentou 61% a 100% das células

sedimentadas e, portanto, foi classificada como de alta floculação. Ainda é possível afirmar que os isolados com caráter mais floculante na presença de íons cálcio foram A11-1, A10-1, A1-1 e F1-2, todos com taxa de floculação acima de 80%. Quanto ao isolado C12-1, observou-se uma floculação média indicando que, na presença de cálcio, os flocos celulares formados não são tão densos quanto os observados nas cepas de alta floculação, o que pode ter contribuído para uma velocidade de sedimentação mais lenta.

Tabela 6: Resultados do teste de floculação quantitativa

Controles	Percentual de floculação	Classificação da floculação
LBCM761	91,3%	Alta
Etanol Red	17,2%	Baixa
Isolados	Percentual de floculação	Classificação da floculação
A1-1	84,1%	Alta
H1-1	72,0%	Alta
A10-1	85,2%	Alta
A11-1	85,7%	Alta
A12-1	64,0%	Alta
C12-1	47,7%	Média
A1-2	70,4%	Alta
F1-2	82,8%	Alta
H1-2	68,9%	Alta

(Fonte: Elaboração própria)

Dessa forma, pode-se dizer que tais cepas são potencialmente capazes de apresentarem alta floculação durante o processo produtivo da cachaça, permitindo a reutilização das cepas para produção de outros lotes da bebida e um menor custo produtivo, já que o tempo de espera para deposição dos microrganismos no fundo da dorna seria mais curto.

Como a maior parte dos nove isolados pré-selecionados apresentou alta semelhança nos resultados dos testes de floculação qualitativa e quantitativa, as características apresentadas pelos mesmos nas etapas anteriores foram

reconsideradas a fim de selecionar, para a etapa seguinte, apenas aqueles com fenótipos mais desejáveis ao processo produtivo da cachaça. O resumo das características apresentadas pelos nove candidatos está apresentado na Tabela 7.

Considerando os critérios de seleção até aqui avaliados, os isolados F1-2 e A1-1 foram considerados os mais promissores para obtenção de uma cachaça de qualidade, pois além de possivelmente pertencerem ao gênero *Saccharomyces*, serem tolerantes a todas as condições de estresse avaliadas e apresentarem alta taxa de floculação, ambos se mostraram resistentes a todas as quatro drogas testadas, o que indica um maior potencial de produção de compostos aromáticos por esses dois isolados, o que fez com que apenas eles fossem submetidos à etapa seguinte da seleção, de desempenho fermentativo.

Tabela 7: Resumo das características apresentadas pelos nove isolados pré-selecionados nas cinco primeiras etapas da seleção de leveduras

Isolado	Crescimento Etapa 1	Resistência Etapa 2	Tolerância Etapa 3	Floculação (Etapas 4 e 5)	
				Qualitativa	Quantitativa
A1-1	Não cresceu	Completa	4 drogas	+++++	84,1%
H1-1	Não cresceu	Completa	2 drogas	+++++	72,0%
A10-1	Não cresceu	Completa	3 drogas	+++++	85,2%
A11-1	Não cresceu	Completa	2 drogas	+++++	85,7%
A12-1	Não cresceu	Completa	2 drogas	+++++	64,0%
C12-1	Não cresceu	Completa	4 drogas	+++++	47,7%
A1-2	Não cresceu	Completa	2 drogas	+++++	70,4%
F1-2	Não cresceu	Completa	4 drogas	+++++	82,8%
H1-2	Não cresceu	Completa	2 drogas	+++++	68,9%

(Fonte: Elaboração própria)

6.5 Desempenho fermentativo

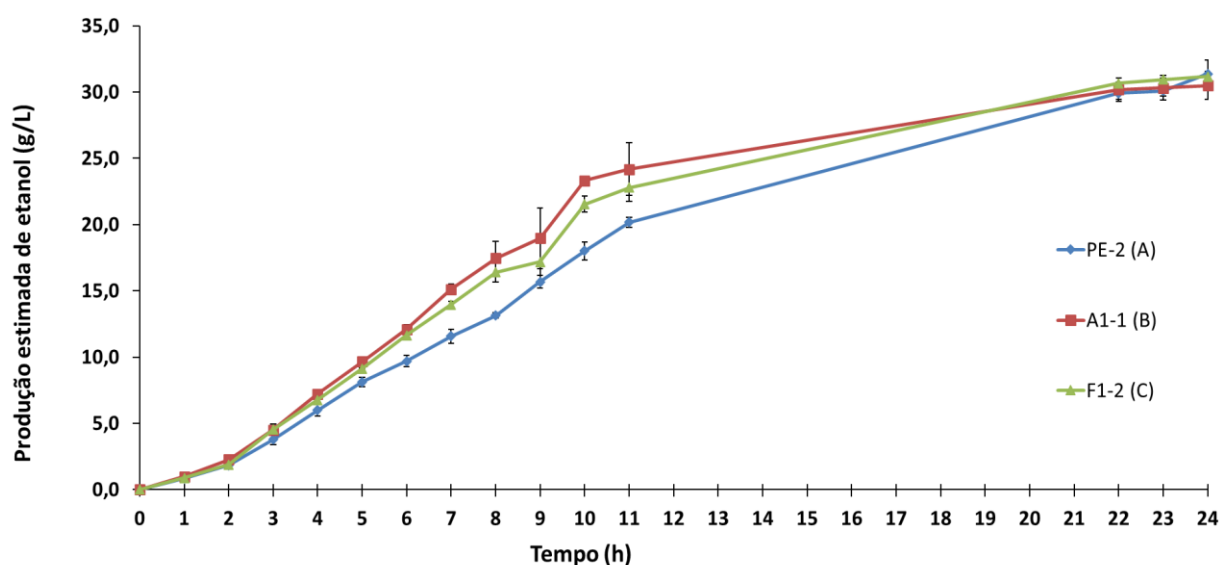
Com pesagens feitas a cada hora nas primeiras onze horas de fermentação, bem como nas últimas três horas de experimento, foi possível traçar um gráfico comparativo do desempenho fermentativo apresentado pelos dois isolados pré-

selecionados e a cepa comercial Pe-2, amplamente empregada na fermentação industrial. Os resultados de tal análise estão apresentados na Figura 21.

A análise dos dados de pesagens e cálculos da produção estimada de etanol fornece insights valiosos sobre o desempenho das cepas A1-1, F1-2 e o controle PE-2 ao longo das 24 horas de experimento. Nas primeiras 4 horas de fermentação, o desempenho fermentativo foi bem similar para as três estirpes de leveduras. No intervalo de 5 a 8 horas de fermentação, observou-se que os dois isolados pré-selecionados A1-1 e F1-2 continuaram com uma performance bem semelhante entre si, que passou a ser superior à da cepa industrial Pe-2. Entre 9 e 11 horas de experimento, foi possível notar uma ligeira diferença entre os dois isolados, sendo que o A1-1 se destacou por atingir maiores níveis de produção estimada de bioetanol em menos tempo de fermentação se comparado ao F1-2. Ao final das 24 horas de fermentação, a produção estimada de bioetanol para os isolados A1-1 e F1-2 foi, em g/L, $30,49 \pm 1,05$ e $31,15 \pm 0,15$, respectivamente, enquanto a cepa industrial produziu $31,36 \pm 1,03$ g/L do álcool.

Esses resultados são extremamente relevantes ao contexto do trabalho, pois reforça a ideia de que a seleção de leveduras provenientes do próprio processo produtivo tem alto potencial para alavancar a eficiência e qualidade da produção de cachaça. Além disso, nenhum dos dois isolados produziu mais que 0,3 cm de espuma durante as 24 horas de fermentação, indicando que ambos provavelmente não causariam extravasamento das dornas de fermentação por produção excessiva de espuma no caso de serem aplicados no processo produtivo de cachaça.

Figura 10: Produção estimada de bioetanol pelos isolados pré-selecionados A1-1 e F1-2 e pela cepa industrial Pe-2.



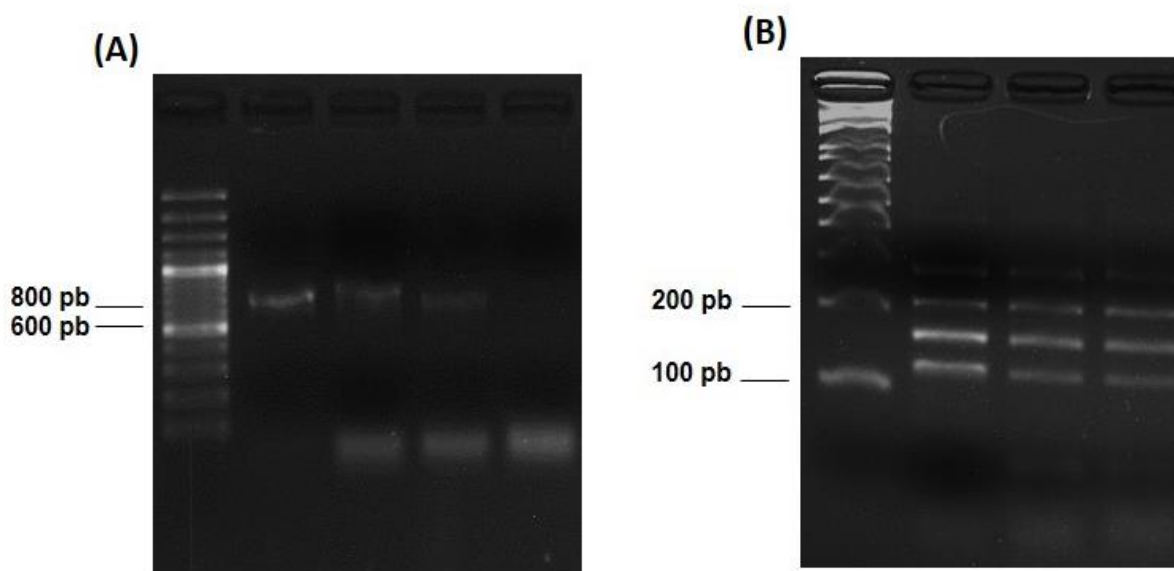
(Fonte: Elaboração própria)

Entretanto, antes de selecionar as leveduras, de fato, é necessário verificar se os candidatos são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e é por isso que os isolados A1-1 e F1-2 foram submetidos à sétima e última etapa do protocolo de seleção de cepas para produção de cachaça de qualidade.

6.6 Identificação de espécie dos isolados pré-selecionados

Pelo fato da espécie *Saccharomyces cerevisiae* ser bem conhecida geneticamente e amplamente empregada na indústria, é essencial que as leveduras selecionadas sejam dessa espécie. Portanto, os isolados pré-selecionados foram submetidos à PCR-ITS. Sabe-se que quando o fragmento de DNA amplificado nesse tipo de reação apresenta cerca de 880 pb é um indício de que a amostra de DNA em questão pertence à espécie *S. cerevisiae*. Logo, de acordo com a Figura 11A, os amplicons referentes aos isolados A1-1 e F2-1 encontram-se um pouco acima da banda de 800 pb do padrão de peso molecular, assim como o amplicon referente ao controle positivo BY4741. Tais resultados são os primeiros indícios de que ambos os isolados pertencem à espécie de interesse.

Figura 11: Identificação de espécie por PCR-ITS e digestão com enzima de restrição Hae III. Em A, eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação do produto da PCR-ITS, sendo da direita para a esquerda, padrão de peso molecular 1 Kb, controle positivo BY4741, A1-1, F1-2 e branco. Em B, eletroforese em gel de agarose 3% para avaliação da digestão enzimática sendo, da esquerda para a direita, padrão de peso molecular 100 pb, controle positivo BY4741, A1-1 e F1-2



Elaboração própria

Para reforçar essa hipótese, os produtos da reação de PCR-ITS foram digeridos com enzima de restrição Hae III e os resultados podem ser observados na FIG. 11B. Assim como o controle positivo BY4741, ambos os isolados apresentaram um perfil composto por quatro bandas, referentes a fragmentos de DNA entre 300 e 100 pb. Esses resultados indicam que os isolados A1-1 e F1-2 pertencem à espécie *S. cerevisiae*, de forma que ambos foram selecionados por terem sido considerados microrganismos com alto potencial de produção de cachaça de qualidade e de otimizar o processo produtivo desse destilado.

7 CONCLUSÕES

A aplicação do protocolo de seleção de leveduras destinadas à produção de cachaça desenvolvido pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFOP mostrou-se um método bastante efetivo para selecionar apenas leveduras que

apresentem características de interesse, de forma a otimizar o processo produtivo da cachaça e, potencialmente, melhorar a qualidade da bebida. Devido aos resultados obtidos ao decorrer das triagens microbiológicas e biomoleculares, as duas cepas selecionadas mostraram-se extremamente promissoras e foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, com ampla resistência a estresses, alta taxa de floculação e potencial de produção de compostos aromáticos, contribuindo assim para uma próspera manufatura e geração de uma bebida fermentada de maior qualidade ao mercado.

O trabalho realizado possibilita a oferta de cepas de leveduras mais promissoras ao produtor de pequeno porte localizado na cidade de Caetite - BA, mediante a amostra coletada em seu mosto fermentativo. Outras perspectivas do presente trabalho é a produção de lotes pilotos utilizando as cepas selecionadas para avaliação do desempenho fermentativo das mesmas, mediante aumento da escala, e realização de quantificação dos compostos aromáticos produzidos, bem como uma avaliação sensorial da cachaça obtida.

8 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, F.; DA MATA CORREA, L. F.; ARAÚJO, T. M.; MOTA, B. E. F.; DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R.; DE MIRANDA CASTRO, I. & BRANDÃO, R. L. 2014. **Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries.** *International journal of food microbiology*, 190, 97-104.

ALCARDE, V. E.; PASCHOALINI, G. Influência do teor alcoólico e de íons cálcio no processo de floculação entre leveduras e bactérias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 483-487, 2007.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* **Basic local alignment search tool.** *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. ISSN 0022-2836.

AQUINO, F. W. B.; NASCIMENTO, R.F.; RODRIGUES, S.; CASEMIRO, A.R.S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, P. 145-149, 2006.

ARAÚJO, Thalita Macedo. **Análises genômicas para otimização da produção de compostos aromatizantes por estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de produção de cachaça.** 2018. 201 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

ARAÚJO, E. A. *et al.* Avaliação educacional: a abordagem por competências. **Avaliação (Campinas)**, v. 20, n. 2, p. 405-426, 2015

ARAÚJO, T. M. *et al.* Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 9, p. 1749-1766, 20183

ARIKAWA, Y., YAMADA, M., SHIMOSAKA M., OKAZAKI, M., FUZUKAWA M. (2000). **Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate.** **Journal of Bioscience and Bioengineering** 90(6), 675-677.

ASHIDA S; ICHIKAWA E; SUGINAMI K. & IMAYASU S. (1987) **Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component.** **Agric.Biol.Chem.** 51: 2061-2065

ASSEFA, S. *et al.* ABACAS: **algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences.** **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1968-1969, 2009. ISSN 1460-2059.

BASSO, L. C.; SILVA, M. A.; AMARAL, P. F. F.; OLIVEIRA, A. J. P. Fermentation performance of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains in batch and fed-batch processes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 681-694, 2016.

BANKEVICH, A. *et al.* **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012. ISSN 1066-5277.

BATEMAN, A. *et al.* **The Pfam protein families database.** **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. suppl_1, p. D138-D141, 2004. ISSN 0305-1048.

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.

BENDONI B; CAVALIERI D; CASALONE E; POLSINELLI M. & BARBERIO C. (1999) **Trifluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine.** **FEMS Microbiol.Lett.** 180: 229-233

BENGTTSSON-PALME, J. *et al.* **Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data.** **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 914-919, 2013. ISSN 2041-210X.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 623- 627, 2000.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. ISSN 1460-2059.

BRASIL. **Decreto nº 4.851, de 2 de outubro de 2003.** Regulamenta 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. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 out. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta 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.** Diário Oficial da União de 05/06/2009, p. 20.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça.** Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, p. 3.

CAMPOS, A. C. S. **Identificação de perfil genético específico no genoma de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, associado a fenótipos relacionados à produção de cachaça com alto padrão de qualidade.** 2022. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2022.

CARVALHO, B. T. D. **Fermentação consorciada leveduras/bactérias lácticas aplicada à produção de cachaça como possibilidade de melhoria do padrão de qualidade.** 2011.

CASTRO, I. M. *et al.* **Effect of the spontaneous fermentation and the ageing on the physicochemical and microbiological characteristics of the Brazilian sugar cane spirit.** Ciência Rural, v. 40, n. 3, p. 531-537, 2010.

CASTRO, J. W. A. *et al.* **Holocene paleo-sea level changes along the coast of Rio de Janeiro, southern Brazil:** Comment on Castro *et al.* (2014). Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 88, n. 4, p. 2481-2492, 2016.

CAVALIERI D; CASALONE E; BENDONI B; FIA G; POLSINELLI M. & BARBERIO C. (1999) **Trifluoroleucine resistance and regulation of alpha-isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol.Gen.Genet. 261: 152-160.

CERVIERI JÚNIOR, O. **Panoramas setoriais 2030: bebidas.** 2017.

COSTA, Vanderson da Silva. **Perfil sensorial de cachaça utilizando diferentes metodologias com consumidores.** 2018.

DASARI, S.; KÖLLING, R. **Cytosolic localization of acetohydroxyacid synthase *Ilv2* and its impact on diacetyl formation during beer fermentation.** Applied and environmental microbiology, v. 77, n. 3, p. 727-731, 2011.

D'HAULTCOURT O. & SMART K.A. (1999) **Measurement of brewing yeast flocculation.** J Amer Soc Brew Chem 57: 123-128.

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

DONOHUE, D.; Goossens, K.; & Willaert, R. (2010). **The N-terminal domain of the cell wall protein Als1p from *Candida albicans* has a lectin activity with specific affinity to fucose-containing glycans.** In *Yeasterday congres, KU Leuven, Leuven Belgium*

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cachaça.** Disponível em: < <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/cachaca>>. Acesso em: 29/02/24.

FARIA-OLIVEIRA, F. *et al.* **Elemental biochemical analysis of the polysaccharides in the extracellular matrix of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Basic Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 685-694, 2015.

FIGUEIREDO, B. I. C. D. **Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas.** 2016.

FLEET, G. H. **Yeast interactions and wine flavour.** *International journal of food microbiology*, v. 86, n. 1, p. 11-22, 2003.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Cachaça boa é a cachaça segura .** Disponível em: < <https://foodsafetybrazil.org/cachaca-boa-e-a-cachaca-segura/#:~:text=O%20consumo%20per%20capita%20de,9%20L%2F%20habitante%2F%20ano.>>>. Acesso em: 29/02/24.

FUKUDA, K.; WATANABE, M.; ASANO, K. **Altered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in β -phenylethyl-alcohol-overproducing mutants of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 3151-3156, 1990. ISSN 0002-1369.

FUKUDA, K. *et al.* **Isolation and genetic study of p-fluoro-dl-phenylalanineresistant mutants overproducing β -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Current Genetics*, v. 20, n. 6, p. 449-452, 1991. ISSN 0172-8083.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; GAVA J. R. F. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo:Nobel, 2008.

GIBSON, B.; LITI, G. ***Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry.** *Yeast*, v. 32, n. 1, p. 17-27, 2015

GOMES, F. C. O. *et al.* **Comparison between two selected *Saccharomyces cerevisiae* strains as fermentation starters in the production of traditional cachaça.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 2, p. 449-455, 20095

HIROOKA, K. *et al.* **Isolation of a Copper-resistant Sake Yeast Mutant with Improved Flavour Compound Production.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 116, n. 3, p. 261-264, 2010. ISSN 2050-0416.

HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. **Colorimetric determination of active α glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of Microbiological Methods, v. 46, n. 3, p. 253-259, 2001. ISSN 0167-7012.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC). IBRAC. **Mercado interno**. Disponível em: < <https://ibrac.net/servicos/mercado-interno> >. Acesso em: 29/02/24.

ICHIKAWA, E;HOSOKAWA, N;HATA, Y;ABE, Y;SUGINAMI, K;IMAYASU, S. (1991). **Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity**. Agri. Biol. Chem. 55(8), 2153-2154.

JANNUZZI, F. **O território ou terroir da cachaça**. Mapa da Cachaça, 2019.

JIN Y.L. & SPEERS R.A. (2000) **Effect of Environmental Conditions on the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae***. J.Am.Soc.Brew.Chem. 58: 108-116.

JIN Y.L. & SPEERS R.A. (1998) **Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae***. Food Res Intern 31: 421-440.

KLEIN, R. C. *et al.* **The genetic diversity of cachaça yeasts assessed by microsatellite markers**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 105, n. 6, p. 1037-1048, 20144

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. **Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation**. Journal of bioscience and bioengineering, v. 106, n. 4, p. 317-323, 200

LIMA, C. A. **Exportação de cachaça brasileira bate recorde em 2022**. Agência Brasil, 2022.

LIMA, C. A. **Fermentação da cachaça: a diferença entre Levedura Autóctone X Levedura Comercial**. Mapa da Cachaça, 2019.

LIMA, F. S. *et al.* **Floculação de leveduras em processos de fermentação alcoólica: aspectos gerais e aplicações**. Química Nova, v. 42, n. 8, p. 917-930, 2019.

LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciência e Agrotecnologia, v. 30, n. 4, p. 645-650, 2006.

MANNA, M.; HAN, G.; SEO, Y. S.; PARK, I. **Evolution of Food Fermentation Processes and the use of multi-omics in deciphering the roles of the microbiota**. Foods, v. 10, n. 11, p. 2861, 2021.

MIRANDA, M. B. D. **Avaliação físico-química de cachaças comerciais e estudo da influencia da irradiação sobre a qualidade da bebida em tonéis de carvalho**. 2005. 86. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de alimentos. ESALQ. Universidade de São Paulo

MORRISSEY, J. P. *et al.* **The role of biotechnology in improvement of livestock: animal health and biotechnology**. Biotechnology Advances, v. 33, n. 8, p. 1525-1537, 2015.

MOURA, J. A. A.; BELISÁRIO, C. M.; VIANA, L. F.; SILVA FILHO, M. P.; MOURA, B. **A. Qualidade de cachaças artesanais produzidas com leveduras de diferentes origens.** Scientia Plena, v. 16, n. 3, 2020.

MUTTON, M.J. MUTTON, M.A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, bbf/appcc, legislação e mercado.** São Paulo: Edgard Bluncher, 2005. p.485- 524

OBA, T. *et al.* **Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 69, n. 7, p. 1270-1273, 2005. ISSN 1347-6947.

OLIVEIRA, V. A. *et al.* **Biochemical and molecular characterization of Saccharomyces cerevisiae strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaca production.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 3, p. 693-701, 2008. ISSN 0099-2240.

PATARO, C. *et al.* **Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery.** Revista de Microbiologia, v. 29, n. 2, p. 104-108, 1998. ISSN 0001-3714.

PIRES, E. J. *et al.* **Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014. ISSN 0175-7598.

POWELL C.D;QUAIN D.E. & SMART K.A. (2003) **The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation.** FEMS Yeast Res. 3: 149- 157.

ROSA, C. A. *et al.* The diversity and dynamics of the yeast populations during **the production of the Brazilian sugar cane spirit cachaça.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 84, n. 1, p. 15-22, 2003.

SAERENS, S. *et al.* **Parameters affecting ethyl ester production by Saccharomyces cerevisiae during fermentation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 2, p. 454-461, 2008. ISSN 0099-2240.

SAERENS, S. M.; DUONG, C. T.; NEVOIGT, E. **Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 86, n. 5, p. 1195-1212, 2010. ISSN 0175-7598.

SALES, A.C. **Registro de estabelecimento, equipamentos para produção e controle de operação da fabrica de aguardente.** In: CARDOSO, M. das G. Produção de aguardente de cana-de-açúcar. Lavras: UFLA, p.51-112. 2001.

SANTOS, J. C. S. *et al.* **Floculação de leveduras em processos de fermentação alcoólica: mecanismos e métodos de avaliação.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, e2019220, 2021.

SCHOENINGER, Vanderleia; COELHO, Silvia Renata Machado; SILOCHI, Rose Mary HQ. **Cadeia produtiva da cachaça.** Energia na Agricultura, v. 29, n. 4, p. 292-300, 2014.

SCHULLER, B. *et al.* **AVEC 2019 Workshop and Challenge: State-of-Mind, Detecting Depression with AI, and Cross-Cultural Affect Recognition.** In: MM 2019 - PROCEEDINGS OF THE 27TH ACM INTERNATIONAL CONFERENCE ON MULTIMEDIA. New York: Association for Computing Machinery, 2019.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Goiás, **A cachaça de alambique: um estudo sobre hábitos de consumo em Goiânia.** Goiânia, 2019. p. 8-9

SEBRAE . **Estudo de mercado SEBRAE/ ESPMCachaça artesanal** relatório completo.147 p. 2008.

SEBRAE . **Estudos Mercadológico SEBRAE/ ESPMCachaça artesanal** relatório completo.84 p. 2012.

SILVA, A. L. *et al.* **A cachaça como produto de identidade cultural e desenvolvimento regional: o caso de Salinas, Minas Gerais.** Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional, v. 14, n. 4, p. 4-26, 2018.

SILVA, A. L. S. *et al.* **Floculação de leveduras em processos de fermentação alcoólica: aspectos gerais e aplicações.** Química Nova, v. 42, n. 8, p. 917-930, 2019.

SILVA, C. F.; RICARDO, M. P. S. C. **Diversity of yeast strains of the genus *Saccharomyces* naturally occurring in the fermenting musts of 'pinga' in Serra Gaúcha region, Brazil.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 34, n. 4, p. 54, 2018.

SILVA, J. A.; ALMEIDA, A. M. **Turismo e cachaça: uma análise da produção científica no Brasil.** Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo, v. 11, n. 3, p. 406-423, 2017.

SORATTO, A.N.; VARVAKIS, G.; HORRI, J. **A certificação agregando valor à cachaça do Brasil.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, V.27, n.4, p. 681- 687, 2007.

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

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

VARELA, C. *et al.* **Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds.** Australian Journal of Grape and Wine Research, v. 15, p. 238-248, 2009.

VENTURINI FILHO, W. G. V. F. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia.** Blucher, 2010. ISBN 8521204922.

VERSTREPEN K.J; BAUER F.F;MICHIELLS C;WINDERICKX J;DERDELINCKX G;PRETORIUS I.S.,THEVELIN J.M. & DELVAUX F.R. (2001) **Late fermentation**

expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. J Am Soc Brew Chem 59: 69-76.

VERSTREPEN K.J; BAUER F.F;MICHIELLS C; WINDERICKX J;DERDELINCKX G;PRETORIUS I.S.,THEVELIN J.M. & DELVAUX F.R. (2003a) **The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways.**FEMS Yeast Res. 4: 285-296.

VERSTREPEN K.J; DERDELINCKX G; VERACHTERT H. & DELVAUX F.R. (2003b) **Yeast flocculation: what brewers should know.** Appl.Microbiol.Biotechnol. 61: 197-205.

VERSTREPEN K.J; VAN LAERE S.D; VANDERHAEGEN B.M; DERDELICKX G;DUFOUR; J.P;PRETORIUS I.S;WINDERICKX J;THEVELIN J.M. & DELVAUX F.R. (2003c) **Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters.** Appl.Environ.Microbiol.69: 5228-5237.

VERSTREPEN K.J; VAN LAERE S.D; VERCAMMEN J; D ERDELICKX G; DUFOUR J.P., PRETORIUS I.S., WINDERICKX J., THEVELIN J.M. & DELVAUX F.R. (2004) **The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles.** Yeast 21:367-377

VICENTE, M. A. *et al.* **Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit.** International Journal of Food Microbiology, v. 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

VICENTE, M.A. **Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação de cachaça de alambique.** Tese de Doutorado – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 130p, 2007.