



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIA MARIA BIZERRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PERFORMANCE FERMENTATIVA DE
LEVEDURAS DOS ENGENHOS PRODUTORES DE CACHAÇA NO ESTADO DA
PARAÍBA**

AREIA

2025

JULIA MARIA BIZERRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PERFORMANCE FERMENTATIVA DE
LEVEDURAS DOS ENGENHOS PRODUTORES DE CACHAÇA NO ESTADO DA
PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Normando Mendes Ribeiro Filho, PhD.

AREIA

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237c Santos, Julia Maria Bizerra Dos.

Caracterização fenotípica e performance fermentativa de leveduras dos engenhos produtores de cachaça no Estado da Paraíba / Julia Maria Bizerra Dos Santos. - Areia:UFPB/CCA, 2025.

74 f. : il.

Orientação: Normando Mendes Ribeiro Filho.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Ciências Biológicas. 2. Leveduras. 3. Seleção. 4. Fermentação. 5. Performance. 6. Etanol. I. Ribeiro Filho, Normando Mendes. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 573(02)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Aprovada em 07/05/2025

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PERFORMANCE
FERMENTATIVA DE LEVEDURAS DOS ENGENHOS PRODUTORES
DE CACHAÇA NO ESTADO DA PARAÍBA

Autor: JULIA MARIA BIZERRA DOS SANTOS

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Normando Mendes Ribeiro Filho
DSER/CCA/UFPB

Prof. Dr. Normando Mendes Ribeiro Filho, Ph.D. (Orientador)
DSER/CCA/UFPB



Prof. Dr.ª Loise Araujo Costa (Avaliador 1)
DB/CCA/UFPB



Dr. Gêneses da Silva Ferreira (Avaliador 2)
DB/CCA/UFPB

A “eu” do passado, com muitos sonhos e expectativas em mente; ao meu futuro “eu”, que colherá os frutos dessa jornada de constante crescimento e aprendizado, **DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus!

À minha família, meus pais Maria Gorete e Lúcio Mauro; minhas avós Maria Fiel e Etelvina Alves (in memoriam); minhas tias Maria das Graças, Maria Zélia (in memoriam), Maria Vilene, Maria Evancide e Ivete Beserra; meus primos Virgínia Graciela, Vitória Jasmine, Nicolas Alexandre, Lavínia Nicole, Lílya Kethyllym e Cláudio Victor.

Às minhas irmãs Janaína Borgonha e Giovanna Antônia, pelo companheirismo, carinho, amor, momentos bons e ruins. Juntas somos três estrelas!

A minha professora de Biologia do Ensino Médio, Jacicleuma, por fazer os meus singelos olhos castanhos “brilharem” ao ministrar o conteúdo de Genética em sala de aula. Foi nesse dia em que descobri a minha verdadeira vocação.

Aos meus colegas do curso de Ciências Biológicas, por todos os bons e maus momentos vividos durante a graduação. Eu agradeço.

Ao Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários – LTPA, por contribuir com a minha formação profissional, como Bióloga e Pesquisadora. Por me apresentar pessoas que além de colegas de trabalho, se tornaram meus amigos: Maria Lacerda, Antônio Levi, Maysa Duarte, Luanna Maia e Maria Clara. Obrigada por compartilhar suas rotinas, suas risadas e preocupações. Os guardo em meu coração!

Agradeço ao meu orientador, Normando Mendes Ribeiro Filho, por me instruir ao mundo da Fermentação e Biotecnologia envolvendo as leveduras; pela sua solidariedade e paciência durante o meu período de Iniciação Científica. Sua orientação foi essencial para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal. Aos seus sábios conselhos, os conhecimentos compartilhados e a sua paciência, um homem de grande inteligência. Tens minha admiração e respeito!

Aos que caminharam comigo durante a minha vida, inclusive aqueles que não permaneceram, agradeço de coração, pois foram necessários para o meu crescimento pessoal e, conseqüentemente, profissional.

“A Biologia é o estudo de coisas complicadas que têm a aparência de terem sido projetadas com um propósito.”

- Richard Dawkins.

RESUMO

As leveduras desempenham um papel essencial na indústria de bebidas. O caldo da cana-de-açúcar contém uma microbiota diversa que contém em média 26 mil leveduras/mL. Por isso, a produção de cachaça, geralmente, adota a fermentação espontânea. Apesar da melhoria na qualidade da cachaça produzida na Paraíba, permanece desconhecido o domínio cepas de leveduras presentes nessas produções. Este trabalho avaliou as características fenotípicas e performance fermentativa de leveduras dos engenhos produtores de cachaça no estado da Paraíba. Foram coletadas amostras de “pé de cuba” em 13 destilarias de cachaça. As leveduras foram purificadas e isoladas através de semeadura por esgotamento. Seguidos de testes de tolerância térmica, assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resistência a etanol e ácido acético, produção de sulfeto de hidrogênio, floculação, desempenho fermentativo, análises físico-químicas do vinho sintético e avaliação cinética. Os dados foram analisados pela Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), usando o índice de Gower. Os resultados revelam que todas as cepas apresentaram crescimento entre 15 °C a 37 °C. A 40 °C, apenas a cepa 9 não cresceu. Todas metabolizaram várias fontes de carbono, embora com diferenças — por exemplo, a cepa 13 não utilizou frutose, e apenas as cepas 9, 11, 12 e 13 cresceram em xilose. A tolerância ao etanol variou; a cepa 5 destacou-se por manter crescimento mesmo em 20% de etanol. A tolerância ao ácido acético foi notável até 6%, com as cepas 9 e 13 mantendo crescimento inclusive em 10%. Sete leveduras não produzem sulfeto. As cepas 4, 7 e 11 não crescem em nitrato de potássio. As cepas 4 e 11 não crescem em nitrito de sódio. A cepa 4 não cresce em lisina. Sete cepas possuem características floculantes pós-fermentação. Seis leveduras concluíram a fermentação em até 60 horas. Mudanças visuais nos mostos fermentados foram notadas ao longo da fermentação. A cepa 1 apresenta mais de 80% de viabilidade. As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata. A PCA revela que as cepas 1, 3, 4, 6, 8, 12 e 13 diferem, significativamente, das cepas 2, 5, 7, 9, 10 e 11. A cepa 2 apresentou os maiores valores de Acidez Total (AT) e Ésteres (ET); a cepa 5 teve o menor valor. As cepas 1, 3 e 13 se mostraram como as mais eficientes na fermentação, baixa AT, alto Teor Alcoólico (TA) e maior perda de CO₂. As cepas 2, 5 e 7 apresentaram maior capacidade aromática, com perfis distintos. As análises cinéticas revelaram que as cepas 1, 3, 5, 12 e 13 apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento microbiano (μ). As cepas 1 e 10 apresentaram maiores rendimentos alcoólicos e melhor conversão de carbono. O dendrograma organizou as leveduras em quatro grupos distintos. Nossas descobertas contribuem para uma melhor compreensão sobre as leveduras presentes nas produções de cachaças paraibanas, buscando o melhoramento do processo fermentativo, reconhecendo a biodiversidade microbiana regional, promovendo seu aprimoramento fermentativo e valorizando o patrimônio genético e cultural paraibano.

Palavras-chave: leveduras; seleção; fermentação; performance; etanol; ésteres.

ABSTRACT

Yeasts play an essential role in the beverage industry. Sugarcane juice contains a diverse microbiota with an average of 26,000 yeast/mL. For this reason, cachaça production generally uses spontaneous fermentation. Despite the improvement in the quality of cachaça produced in Paraíba, the domain of yeast strains present in these productions remains unknown. This study evaluated the phenotypic characteristics and fermentation performance of yeasts from cachaça-producing mills in the state of Paraíba. Samples of “pé de cuba” were collected from 13 cachaça distilleries. The yeasts were purified and isolated by depletion seeding. This was followed by tests for thermal tolerance, assimilation of different carbon and nitrogen sources, resistance to ethanol and acetic acid, hydrogen sulphide production, flocculation, fermentation performance, physico-chemical analysis of the synthetic wine and kinetic evaluation. The data was analyzed by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), using the Gower index. The results show that all the strains grew between 15 °C and 37 °C. At 40 °C, only strain 9 did not grow. They all metabolized various carbon sources, although with differences - for example, strain 13 did not use fructose, and only strains 9, 11, 12 and 13 grew on xylose. Tolerance to ethanol varied; strain 5 stood out for maintaining growth even in 20% ethanol. Tolerance to acetic acid was remarkable up to 6%, with strains 9 and 13 maintaining growth even in 10%. Seven yeasts do not produce sulphide. Strains 4, 7 and 11 do not grow on potassium nitrate. Strains 4 and 11 do not grow on sodium nitrite. Strain 4 does not grow on lysine. Seven strains have post-fermentation flocculent characteristics. Six yeasts completed fermentation within 60 hours. Visual changes in the fermented musts were noticed throughout fermentation. Strain 1 showed more than 80% viability. The physicochemical analyses were carried out in duplicate. PCA revealed that strains 1, 3, 4, 6, 8, 12 and 13 differed significantly from strains 2, 5, 7, 9, 10 and 11. Strain 2 had the highest Total Acidity (TA) and Ester (TE) values; strain 5 had the lowest. Strains 1, 3 and 13 proved to be the most efficient in fermentation, with low TA, high Alcohol Content (AT) and higher CO₂ loss. Strains 2, 5 and 7 showed greater aromatic capacity, with different profiles. Kinetic analysis revealed that strains 1, 3, 5, 12 and 13 showed the highest specific microbial growth velocities (μ). Strains 1 and 10 showed higher alcohol yields and better carbon conversion. The dendrogram organized the yeasts into four distinct groups. Our findings contribute to a better understanding of the yeasts present in the production of cachaças from Paraíba, seeking to improve the fermentation process, recognizing the regional microbial biodiversity, promoting its fermentation improvement and valuing Paraíba's genetic and cultural heritage.

Keywords: yeasts; selection; fermentation; performance; ethanol; esters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: A) A principal via glicolítica, com a quebra da glicose gerando moléculas de piruvato. B) Enzimas envolvidas no metabolismo do piruvato..... | 16 |
| Figura 2: Localização dos municípios correspondentes aos Engenhos no estado da Paraíba, Brasil..... | 24 |
| Figura 3: Monitoramento da fermentação por perda de massa (CO ₂) em um mini fermentador com airlocker. | 31 |
| Figura 4: Características Macro e Micro morfológicas das cepas de leveduras isoladas das treze unidades produtoras de cachaça, incluindo: Cepa 1, Cepa 2, Cepa 3, Cepa 4, Cepa 5, Cepa 6, Cepa 7, Cepa 8, Cepa 9, Cepa 10, Cepa 11, Cepa 12 e Cepa 13. | 41 |
| Figura 5: Crescimento das cepas selecionadas de 1 a 13 inoculadas em meio contendo 10, 15 e 20% de Etanol por 96 horas. Resultados expressos em número total de células/mL)..... | 46 |
| Figura 6: Crescimento das cepas selecionadas de 1 a 13 inoculadas em meio contendo 2, 6 e 10% de ácido acético por 96 horas. Resultados expressos em número total de células/mL)... | 47 |
| Figura 7: (A) Leveduras com aspecto floculante ao final do processo fermentativo; (B) Leveduras com aspecto floculante visualizada no microscópio (1000x). Fonte: Autoral, 2024. | 51 |
| Figura 8: Gráfico comparativo do Desempenho fermentativo de 13 cepas de levedura ao longo de 260 horas, incluindo: Cepa 1, Cepa 2, Cepa 3, Cepa 4, Cepa 5, Cepa 6, Cepa 7, Cepa 8, Cepa 9, Cepa 10, Cepa 11, Cepa 12 e Cepa 13; Tempo (h) e perda de CO ₂ | 52 |
| Figura 9: Vinho fermentado com características viscosas. | 53 |
| Figura 10: Número de células de leveduras (células/mL) identificadas por cepa isolada. Foi realizada a contagem total de células totais/mL usando uma câmara de Neubauer. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, o teste post hoc e Tukey foi usado para identificar diferenças significativas e é apresentado como letras minúsculas. Letras diferentes indicam diferenças significativas na viabilidade dentro de uma espécie (p < 0,05). | 54 |
| Figura 11: Mapa de calor (heatmap) das Análises físico-químicas do mosto sintético fermentado (Acidez total - AT (mg/100mL ác. acético), TA – Teor Alcoólico (°GL - 20°C), ET - Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mLA. Anidro), CO ₂ - Perda de dióxido de carbono (g CO ₂ loss/L)). | 56 |
| Figura 12: (A) PCA score plot demonstrando variação no parâmetros físico-químicos e cinéticos fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmetne, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça; (B) PCA loading plot demonstrando variação no parâmetros físico-químicos e cinéticos fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmetne, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça. As cepas estão enumeradas de 1 a 13. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram Acidez total – AT (mg/100mL ác. acético), Acidez Volátil – AV (mg/100mL A.A), Acidez Fixa - AF (mg/100mL ác. Acético), TA – Teor Alcoólico (°GL), ET - Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mLA. Anidro), Viabilidade Celular (%), CO ₂ ; e os parâmetros cinéticos foram μ - velocidade específica de crescimento microbiano (h ⁻¹), td - tempo de duplicação celular (h), q _s - velocidade específica de consumo de substrato (h ⁻¹), q _p - velocidade específica de formação de etanol (h ⁻¹), Y - rendimento (Y _{p/s} (g de etanol/g de açúcares totais), Y _{p/x} (g de etanol/g de células), Y _{x/s} (g de células/g de açúcares totais), YCO ₂ /EtOH (g de CO ₂ /g de etanol), YCO ₂ /s (g de CO ₂ /g de substrato), YCO ₂ /x (g de CO ₂ /g de células)). | 61 |

Figura 13: Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) baseado no índice de dissimilaridade de Gower, mostrando a semelhança entre as cepas de leveduras isoladas das treze unidades produtoras de cachaça.....64

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Relação das leveduras isoladas e cidades de coleta no estado da Paraíba..... | 23 |
| Tabela 2: Características macro morfológicas das colônias de leveduras isoladas de treze unidades produtoras de cachaça. | 36 |
| Tabela 3: Capacidade das leveduras crescerem em diferentes Temperaturas por 96 h. | 42 |
| Tabela 4: Capacidade das leveduras crescerem em diferentes Fontes de Carbono por 96 h. . | 43 |
| Tabela 5: Capacidade das leveduras produzirem Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S), por 10 dias. 48 | |
| Tabela 6: Capacidade das leveduras crescerem em nitrogênio: Nitrito de Sódio (NaNO ₂), Nitrate de Potássio (KNO ₃), Lisina (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂), por 10 dias..... | 49 |
| Tabela 7: Capacidade das leveduras formarem floculos após o processo fermentativo. | 50 |
| Tabela 8: Resultados das Análises Físico-químicas do Mosto sintético fermentado..... | 55 |
| Tabela 9: Parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça. | 59 |
| Tabela 10: Produtividade resultante das fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça. | 60 |
| Tabela 11: Tabela de Person para parâmetros físico-químicos e cinéticos..... | 62 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 | LEVEDURAS E A INDÚSTRIA DE BEBIDAS | 14 |
| 2.1.1 | Produção de Cachaça | 14 |
| 2.1.2 | A importância das Leveduras para a Indústria da Cachaça..... | 14 |
| 2.1.3 | Sabores e Aromas | 15 |
| 2.2 | PRINCÍPIOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA..... | 16 |
| 2.2.1 | Leveduras: Morfologia, Reprodução e Influências | 16 |
| 2.2.2 | Isolamento e Identificação de Leveduras | 17 |
| 2.2.2.1 | <i>Influência da Temperatura</i> | 17 |
| 2.2.2.2 | <i>Influência de Carbono Específicos</i> | 18 |
| 2.2.2.3 | <i>Influência do Etanol</i> | 19 |
| 2.2.2.4 | <i>Influência do Ácido Acético</i> | 19 |
| 2.2.2.5 | <i>Influência do Nitrogênio</i> | 20 |
| 2.2.2.6 | <i>Influência do Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)</i> | 21 |
| 2.3 | A BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA | 21 |
| 2.3.1 | Otimização do Processo Fermentativo | 21 |
| 2.3.2 | Leveduras Petit | 22 |
| 3 | METODOLOGIA | 23 |
| 3.1 | LOCAIS DE COLETA DO “PÉ DE CUBA” DOS ENGENHOS DO ESTADO DA PARAÍBA | 23 |
| 3.2 | COLETA E ARMAZENAMENTO DO “PÉ DE CUBA” DOS ENGENHOS DO ESTADO DA PARAÍBA | 24 |
| 3.3 | MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES | 24 |
| 3.4 | ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LEVEDURAS..... | 26 |
| 3.4.1 | Banco de Leveduras e Manutenção | 26 |
| 3.4.2 | Técnica de “Spot-plating” | 26 |
| 3.4.3 | Avaliação morfológica das leveduras..... | 27 |
| 3.5 | TESTES DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE | 27 |
| 3.5.1 | Teste em diferentes Temperaturas..... | 27 |
| 3.5.2 | Teste de Assimilação de Fontes de Carbono específicas | 28 |
| 3.5.3 | Teste de Resistência à Etanol (10%, 15% e 20%) e ao Ácido Acético (2%, 6% e 10%) | 28 |
| 3.5.4 | Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S) | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.5 | Assimilação de Fontes de Nitrogênio | 29 |
| 3.5.6 | Desempenho Fermentativo em Cepas Isoladas..... | 29 |
| 3.5.7 | Teste de Flocculação..... | 31 |
| 3.6 | CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO FERMENTADO:..... | 31 |
| 3.6.1 | Teor Alcoólico | 32 |
| 3.6.2 | Acidez Total, Volátil e Fixa..... | 32 |
| 3.6.3 | Ésteres Totais | 33 |
| 3.6.4 | Viabilidade Celular | 34 |
| 3.6.5 | Parâmetros cinéticos..... | 34 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 | ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E SELEÇÃO DAS LEVEDURAS | 35 |
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA | 36 |
| 4.3 | TESTES DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE | 41 |
| 4.3.1 | Teste em Diferentes Temperaturas | 41 |
| 4.3.2 | Teste de Assimilação de Fontes de Carbono específicas | 43 |
| 4.3.3 | Teste de Resistência à Etanol (10%, 15% e 20%) | 45 |
| 4.3.4 | Teste de Resistência à Ácido Acético (2%, 6% e 10%)..... | 46 |
| 4.3.5 | Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S)..... | 48 |
| 4.3.6 | Assimilação de Fontes de Nitrogênio Específica..... | 48 |
| 4.4 | TESTE DE FLOCCULAÇÃO | 49 |
| 4.4.1 | Desempenho Fermentativo das Cepas Isoladas | 51 |
| 4.5 | VIABILIDADE CELULAR..... | 53 |
| 4.6 | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO SINTÉTICO FERMENTADO | 54 |
| 4.6.1 | Avaliação cinética das leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça | 58 |
| 4.6.2 | Análise dos Componentes Principais (PCA) do Vinho Fermentado..... | 61 |
| 4.7 | ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO (HCA) | 63 |
| 5 | CONCLUSÃO | 66 |
| | REFERÊNCIAS | 67 |

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos microscópicos amplamente utilizados em processos fermentativos. Sendo micro-organismos que, durante a fermentação, convertem os açúcares em dióxido de carbono, geram etanol e outros compostos secundários de valor agregado (Da Silva et al., 2023). Leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem uma grande relevância industrial, contribuindo significativamente para a eficiência do processo fermentativo, influenciando na qualidade do produto final. A fermentação alcoólica ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar, se dá na mitocôndria (Amorim et al., 1996).

A performance fermentativa é influenciada por diversos fatores; a concentração de nutrientes e minerais no mosto a ser fermentado é importante, fornecendo fósforo, potássio, magnésio, manganês, nitrogênio e etc. A formação do etanol, sendo um subproduto da fermentação alcoólica, é influenciada por variáveis como temperatura e pH. A deficiência de nutrientes e/ou o excesso de etanol podem comprometer a eficiência do processo fermentativo (Lima et al., 2001). Esses processos bioquímicos não apenas contribuem para a produção de etanol, mas também para a formação de compostos aromáticos, como ésteres, tendo sua relevância durante a fermentação. O perfil aromático conferido às bebidas alcoólicas é atribuído às atividades bioquímicas e metabólicas que acontecem no interior da célula durante o processo fermentativo (Matos et al., 2021).

No contexto da fermentação para a produção de cachaça, originalmente, usa as leveduras autóctones oriundas da microbiota da cana-de-açúcar, sendo intitulado de ‘fermento natural’. O processo de fermentação que utiliza, unicamente, ‘fermento natural’ é conhecido como fermentação espontânea (Rosa et al., 2009). Por outro lado, na busca de adaptar as leveduras autóctones, algumas unidades produtoras de cachaça suplementam o caldo da cana-de-açúcar com farelo de milho/farelo de arroz ou pedaços de cana-de-açúcar. Assim, eles utilizam técnica de multiplicação chamada “Batelada Alimentada”. Adicionalmente, produtores tem utilizado leveduras alcoólicas comerciais como agentes iniciadores da fermentação. Embora esta técnica seja muito utilizada, inicialmente, as leveduras comerciais ficam vivas e em maior concentração por até 3 semanas, enquanto as leveduras autóctones, inicialmente, são minoria; porém, durante as 3 semanas tornam-se maioria da microbiota do mosto.

Embora todas as técnicas de uso e aplicação de leveduras para produção de cachaça sejam bem conhecidas, estas não são, completamente, dominadas. Além de aperfeiçoar as técnicas existentes, é necessário a seleção de leveduras autóctones existentes nas próprias

unidades produtoras para aumentar e otimizar o controle do processo, aumentando a produtividade. Portanto, esse trabalho avaliou as características fenotípicas e performance fermentativa de leveduras dos engenhos produtores de cachaça no estado da Paraíba. Visando melhorias no processo fermentativo nas indústrias de bebidas, no aumento do poder fermentativo, no desenvolvimento de cachaças especiais e em outros processos industriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEVEDURAS E A INDÚSTRIA DE BEBIDAS

2.1.1 Produção de Cachaça

A cachaça, uma bebida alcoólica fermento-destilada tipicamente brasileira, exibe características distintivas em sua composição química. Nos últimos tempos, tem ganhado maior popularidade devido ao incremento na sua qualidade (Granato et al., 2014). No ano de 2020, o estado da Paraíba emergiu como o principal produtor de cachaça de alambique no Brasil, bem como o maior produtor do Nordeste, devido ao florescimento das produções na cidade de Areia-Paraíba. A cachaça é elaborada a partir do caldo extraído da cana-de-açúcar, conferindo-lhe a singularidade que a caracteriza como um produto autenticamente brasileiro.

Cada destilaria, engenho ou usina adota um método único de produção de cachaça, que vai desde a escolha entre mão-de-obra manual ou mecanizada nos canaviais até a utilização de diferentes tipos de equipamentos de destilação (Silva, 2024). Durante o processo de industrialização do caldo de cana, as células de leveduras enfrentam flutuações significativas do ambiente devido à variação constante da composição nutricional. Adicionalmente, mudanças físicas e químicas no caldo de cana durante a conversão de açúcar em álcool ocorrem devido às variações iniciais e finais da osmolaridade, pH, temperatura, oferta de nutrientes, densidade e gradativo aumento na concentração de etanol. Essas mudanças têm impacto direto na eficiência do processo de fermentação industrial e na qualidade do produto resultante.

2.1.2 A importância das Leveduras para a Indústria da Cachaça

As leveduras desempenham um papel crucial em processos fermentativos, sendo organismos unicelulares de rápido crescimento amplamente utilizados em aplicações biotecnológicas (Moreira et al., 2010). Especialmente, pela sua importância na produção de cachaça, onde influenciam diretamente o desenvolvimento de sabores/aromas e a qualidade do

produto final. Boa parte das destilarias fazem uso do processo de fermentação espontânea, que depende da microbiota presente no ambiente de produção. Portanto, a produção de cachaça é caracterizada por uma fermentação mista de leveduras, com a predominância de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Como a produção de cachaça é um processo fermentativo aberto em batelada que é correspondente ao tempo da safra da cana-de-açúcar, as populações de leveduras fermentativas se encontram em constante mudança devido à introdução contínua de novas cepas oriundas do caldo de cana e às condições produtivas não estéreis (Guerra et al., 2001; Morais et al., 1999; Pataro et al., 1999, 2000). Nos diversos setores voltados ao aprimoramento de produtos fermentados, têm se destacado a importância da seleção e do estudo da diversidade de leveduras, consideradas essenciais para alcançar características organolépticas mais específicas (Angioletto, 2013).

2.1.3 Sabores e Aromas

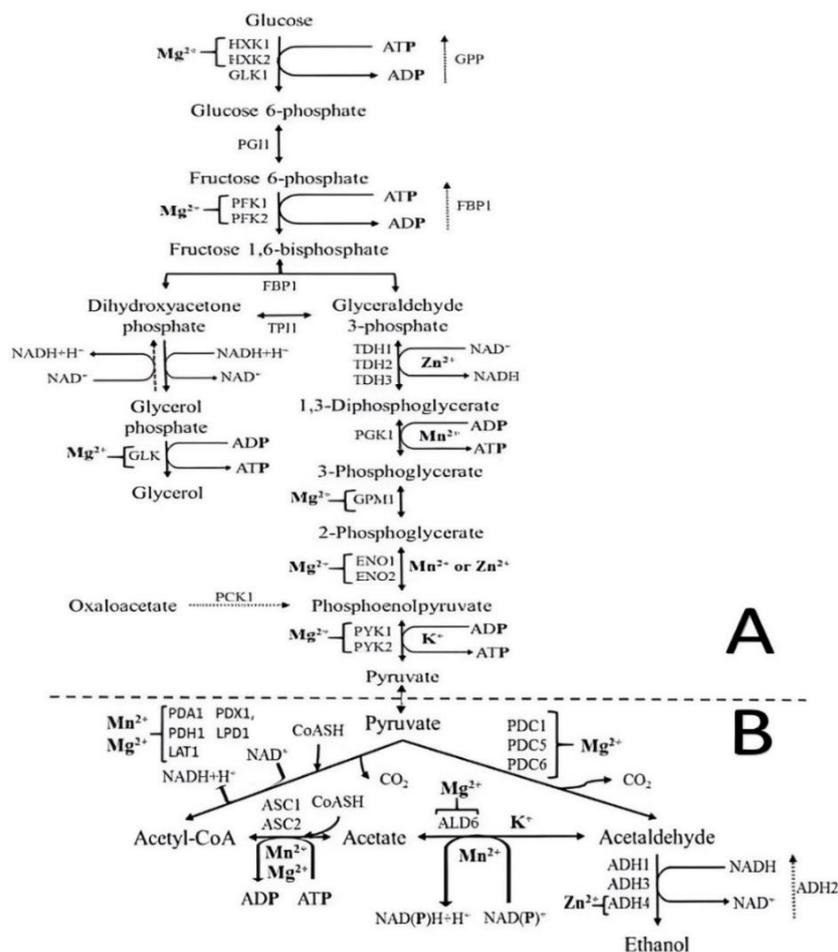
As leveduras são fontes muito utilizadas em inúmeras aplicações industriais, especialmente em produções de bebidas fermentadas como vinho e cerveja, e fermento-destiladas como cachaça e rum. Além de converterem açúcares em etanol e CO₂, as leveduras produzem compostos secundários que contribuem para a formação de aromas durante o processo fermentativo, como ésteres, álcoois superiores e ácidos graxos. Sendo divididas em dois grupos de leveduras, as *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* (Cordero-Bueso et al., 2013; Maicas, 2020). Com a evolução da indústria de fermentação moderna, o uso misto de leveduras *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* podem contribuir para a produção de bebidas alcoólicas com aromas específicos (Chen et al., 2023). O processo fermentativo é fortemente influenciado pelas condições ambientais. A concentração de etanol, temperatura, pH e a presença de contaminações bacterianas exercem forte influência sobre o processo fermentativo, impactando na sua qualidade. Esses parâmetros contribuem para a ocorrência de contaminação microbiana nas fermentações, alterando o comportamento das leveduras, resultando em perdas significativas na produção de compostos aromáticos e álcool (Nogueira et al., 2006).

2.2 PRINCÍPIOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

2.2.1 Leveduras: Morfologia, Reprodução e Influências

As leveduras são microrganismos eucarióticos que vivem em uma ampla variedade de nichos ecológicos, principalmente na água, solo, ar e nas superfícies de plantas e frutos (Maicas, 2020). Esses microrganismos exibem características distintivas, incluindo a presença de parede celular rígida composta por quitina e beta-glucano, armazenamento de glicogênio, utilizado como fonte de reserva, possuem formatos variados, podendo ser ovais ou esféricas/arredondadas. Se reproduzem de forma assexuada, via brotamento ou fissão, e sexuada, por meio da fusão de duas células haploides (Kurtzman & Fell, 1998). A fermentação vai mais além do que somente a conversão rápida de açúcares em álcool e CO₂ pelas leveduras. De acordo com Ribeiro-Filho et al. (2021), na via glicolítica, a interação entre enzimas, elementos inorgânicos e determinados genes promovem as reações fundamentais da fermentação, começando pela quebra da glicose em duas moléculas de piruvato (Figura 1.A).

Figura 1: A) A principal via glicolítica, com a quebra da glicose gerando moléculas de piruvato. B) Enzimas envolvidas no metabolismo do piruvato.



Fonte: Ribeiro-Filho et al., (2021).

Depois de produzir as moléculas de piruvato, o processo metabólico pode tomar diferentes direções, dependendo das condições impostas. As leveduras passam por uma fase de repressão metabólica da sua respiração por meio da glicose, semelhante ao processo de glicólise aeróbica encontrado em células tumorais, descoberto por Herbert G. Crabtree em 1926 (Santos et al., 2021; Pires, 2017). Em condições onde o efeito Crabtree é positivo – em altas concentrações de glicose –, o piruvato é direcionado do acetil-CoA via acetaldeído para a produção de etanol (Figura 1.B).

2.2.2 Isolamento e Identificação de Leveduras

Ao fazer a seleção de leveduras, diversas técnicas de classificação taxonômica são empregadas para a identificação, fundamentadas na descrição morfológica e fisiológica de espécies e gêneros. A partir de diferentes respostas durante a fermentação e assimilação de fontes específicas, elas se tornam critérios categóricos para a classificação e identificação das leveduras (Guimarães, 2005).

2.2.2.1 Influência da Temperatura

Variações na temperatura tendem a influenciar de maneira direta, a eficiência da atividade metabólica das leveduras. A temperatura é um parâmetro crucial para o controle do processo metabólico, influenciando nas melhores condições para a sobrevivência das leveduras, bem como as suas limitações (De-Barros et al., 2023). Walker (1998) realizou estudos em vinhos onde, em temperaturas abaixo de 15 °C contribuem em uma bebida mais aromática. Essa faixa de temperatura ocasiona a queda na taxa metabólica das células, tendo a sua atividade reduzida. Segundo Kopecká et al. (2016), a levedura *Saccharomyces pastorianus* suportam temperaturas mais baixas, variando de 6 a 12 °C. A maioria das leveduras utilizadas em processos industriais toleram temperaturas intermediárias, como 30 °C. Massanguer (2005) destaca que, quanto maior a temperatura, maior e mais eficiente será o metabolismo das leveduras, sendo também maior a formação, transformação e degradação de compostos secundários. Porém, as leveduras também possuem um limite de estresse térmico. Em um estudo realizado por De-Barros et al. (2023), leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* crescem sob condições limiares ao estresse térmico, diferentemente da *Saccharomyces*

pastorianus, sendo importantes para as indústrias. Cepas de leveduras que podem crescer a 37 e 40 °C fornecem uma informação importante para processos de fermentação rápidos.

2.2.2.2 *Influência de Carbono Específicos*

As leveduras utilizam açúcares como principal combustível para produzir energia e gerar etanol e outros compostos secundários. Sendo microrganismos muito conhecidos pela capacidade em assimilar hexoses (De-Barros et al., 2023). Leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* fermentam sacarose, glicose, manose e frutose por meio da glicólise. (Briggs et al., 2004; Galdieri et al., 2014; Van Maris et al., 2006), possuindo uma preferência pela glicose. As leveduras possuem capacidades variadas de crescimento em diferentes fontes de carbono, indicando adaptações distintas.

Para a assimilação de carbonos distintos como a galactose e lactose, as leveduras precisam de vias metabólicas específicas para realizar a quebra desses componentes. A quebra da lactose gera glicose e galactose, por ação da enzima lactase; porém, as leveduras tendem a consumir a glicose presente, gerando uma repressão metabólica, que influencia no consumo da galactose pelas leveduras (Rubio-Teixeira, 2005; Klein et al., 1998). Em um estudo feito por Kim et al. (2014), a existência de genes como: GAL1, GAL7, e GAL10, são responsáveis por converter galactose em glicose-6-fosfato, permitindo a entrada desse açúcar nas vias metabólicas usuais de fermentação.

O consumo de xilose, comum em plantas lenhosas e biomassa de origem vegetal, pelas leveduras é alcançada através da conversão da xilose em xilulose e subsequente fosforilação em xilulose-5-fosfato; posteriormente metabolizada na via das pentoses fosfato (Cunha, 2019), sugerindo que algumas cepas possuem vias metabólicas próprias para a assimilação dessa pentose. Alguns estudos realizados por Boulton e Quain (2001); Van Maris e colaboradores (2006) explicam que, existe a falta de genes codificadores de enzimas que metabolizam a ramnose em seu genoma, a exemplo de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, é incomum assimilarem a ramnose. Esse carboidrato tem origem vegetal, como parte de um dos componentes existentes, como as pectinas do tipo ramnogalacturonana, presente na parede celular vegetal em diferentes estágios de crescimento da planta (Kaczmarska et al., 2022).

A sacarose está entre os açúcares principais na composição do caldo de cana-de-açúcar, um dissacarídeo que pode ser convertido em glicose e frutose. A frutose é convertida em

frutose-6-fosfato por meio da ação da enzima hexocinase, integrando-se à via glicolítica. (Nascimento et al., 2019). Durante a fermentação alcoólica, ambos os carboidratos podem ser metabolizados pelas leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*. Frequentemente usadas para a produção de bebidas alcoólicas, como a Cachaça, e para a produção de etanol.

A maltose é um carboidrato presente em grãos e/ou cereais. Walker e Stewart (2016); Boulton e Quain (2001); Briggs e colaboradores (2004) destacam a presença de genes presentes em cepas de *Saccharomyces* que podem fermentar maltose, sendo eles: MAL1-4 e MAL6. Já a melibiose, é um dissacarídeo formado por glicose e galactose, presente em leguminosas como feijão, soja e lentilhas; para a quebra da molécula desse açúcar, leveduras usadas em fermentações do tipo Lager possuem a presença de atividade -D-galactose (Walker e Stewart, 2016; Briggs et al., 2004).

2.2.2.3 *Influência do Etanol*

As leveduras são precursoras para a formação de etanol durante uma fermentação, convertendo o ácido pirúvico em etanol via acetaldeído, utilizadas para a produção de bebidas alcoólicas e até para a produção de bioetanol, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais utilizada, por serem as mais tolerantes ao estresse gerado pela presença de etanol (Mavrommati et al., 2023). Durante a fermentação alcoólica, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ativam mecanismos de proteção para tolerar o etanol, incluindo alterações na membrana plasmática, acúmulo de solutos compatíveis, expressão de chaperonas moleculares e ativação de vias de sinalização de estresse, como a via HOG (Wolf et al., 2023). Esses processos mantêm a integridade celular, estabilizam proteínas e organelas, neutralizam espécies reativas de oxigênio e otimizam o metabolismo para garantir a viabilidade e eficiência fermentativa mesmo em condições adversas.

2.2.2.4 *Influência do Ácido Acético*

O ácido acético é um co-produto formado através do acúmulo de acetaldeído sendo precursores do Acetil-CoA, que é chave para vários caminhos metabólicos incluindo a formação de ésteres (Ribeiro-Filho et al., 2021). A produção de ácido acético pode influenciar na geração de sabores e aromas. O acúmulo de ácido acético está relacionado à baixa viabilidade celular das leveduras (Ribeiro-Filho et al., 2021). Existe um limite entre a tolerância e

toxicidade do ácido acético, um fator determinante para identificar se as leveduras conseguem se adaptar ou render-se ao estresse ambiental as quais são submetidas. A tolerância é regulada por vários genes, a interação entre eles é complexa, dentre eles o gene *Haa1p* atua como principal controlador de tolerância ao ácido acético nas leveduras (Guaragnella & Bettiga, 2021).

2.2.2.5 *Influência do Nitrogênio*

As necessidades metabólicas das leveduras dependem da oferta de nutrientes presentes no meio, assim como o nitrogênio, que desempenha um papel fundamental no processo fermentativo. O nitrogênio em meios fermentativos cumpre um papel anabólico, essencial para a biossíntese de proteínas estruturais e funcionais, como enzimas e ácidos nucleicos, contribuindo para a produção de compostos de sabor durante a fermentação, como álcoois superiores e ésteres (Walker e Stewart, 2016). Os estudos de Godillot et al. (2022); Rollero et al. (2015); e Gobert et al. (2019) mostram que a adição de nitrogênio no início da fermentação tem efeitos importantes no vinho, para a produção de aromas. O nitrogênio orgânico (incluindo amino ácidos, peptídeos, pequenos peptídeos e polipeptídeos) é essencial para a fermentação, a sua assimilação pela levedura dependerá da cepa utilizada (Gonzalez et al., 2024; Bisson, 1999; Vilanova et al., 2007). Diferentes fontes de nitrogênio podem ser atribuídas a um processo fermentativo.

Em fermentações de silagem de milho, a silagem fica exposta, as leveduras presentes que assimilam o lactato deterioram/oxidam o ácido láctico formado, aumentando o pH e contribuindo para a degradação da silagem; Da Silva (2018) ao utilizar uma combinação de benzoato de sódio, sorbato de potássio e nitrito de sódio, observou que leveduras do gênero *Pichia* foram inibidas. Indicando que o nitrito de sódio, mesmo combinado com outros componentes, pode ter o efeito tóxico para algumas espécies de leveduras. Portanto, os estudos sobre a influência do nitrito de sódio em fermentações alcoólicas é uma incógnita. O uso do nitrato de potássio como fonte única de nitrogênio é pouco abordado. A maioria dos estudos utilizam a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo base (Schnierda et al., 2014; Kemsawasd et al., 2015). A lisina é um aminoácido assimilável pelas leveduras, porém, quando usada como fonte única de nitrogênio, o tempo de fermentação é prolongado e, em alguns casos, o crescimento celular é inibido. A lisina é catabolizada por meio da L-lisina e-aminotransferase, uma enzima que é reprimida quando há a escassez de nitrogênio no meio. Ao combiná-la com

outras fontes de nitrogênio, a lisina tende a ser consumida pelo metabolismo da levedura (Thomas & Ingledew, 1994).

2.2.2.6 *Influência do Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)*

O aparecimento de sulfeto de hidrogênio em bebidas, como no vinho, por consequência do metabolismo da levedura é considerado um defeito na qualidade sensorial e final do produto (Linderholm et al., 2008). O sulfeto de hidrogênio tem como sua característica principal o odor forte e fétido. Durante uma fermentação alcoólica, a produção de H₂S ocorre quando as leveduras utilizam sulfatos (SO₄²⁻) do meio como fonte de enxofre, que são reduzidos a sulfetos (S²⁻) para a síntese de aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína (Linderholm et al., 2008; Walker e Stewart, 2016). Isso ocorre devido a condições de limitação nutricional, a falta de disponibilidade de nitrogênio sem compostos sulfatados.

A presença de compostos sulfatados no vinho fermentado é detectável, mas em baixas concentrações. De acordo com os estudos realizados por Linderholm et al. (2008), compostos como dióxido de enxofre, são importantes para a formação de sabor e aroma em produções de vinho; desde que em concentrações adequadas. O excesso tende a prejudicar a qualidade do produto final (Walker e Stewart, 2016). Táticas além da suplementação adequada de nutrientes; o uso de cepas de leveduras devidamente selecionadas é indispensável, com a ausência de mutações dos genes: MET17, CYS4, HOM2 e HOM6 (Linderholm et al., 2008). São genes encarregados de incorporar compostos contendo enxofre na via metabólica das leveduras. Destacando a importância da seleção de cepas que contribuem para a redução e/ou inibição da formação de sulfeto de hidrogênio.

2.3 A BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

2.3.1 **Otimização do Processo Fermentativo**

A Biotecnologia é uma aplicação que envolve Bioquímica, Biologia, Microbiologia e Engenharia Química inseridas em processos e produtos industriais e ao meio ambiente. As leveduras com auxílio de técnicas biotecnológicas são amplamente utilizadas em diversos processos, como tratamento de resíduos, produção de bioetanol, produção de químicos, farmacêuticos e são constantemente manipuladas em estudos genéticos, usadas como células

modelo, o microrganismo eucariótico mais estudado. O gênero *Saccharomyces*, se destaca, sendo o mais analisado e seu metabolismo o mais conhecido (Aquarone et al., 2001).

As leveduras estão espalhadas em diferentes pontos no mundo, habitando plantas (raízes, caules, folhas, flores, frutos e exsudados), insetos (drosófilas e abelhas), água e solos (Spencer e Spencer, 1997). Diversos estudos genéticos acometem as células de leveduras, envolvendo deleções e/ou melhorias de características, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, chamando a atenção do mercado da produção de produtos fermentados, entregando inúmeras possibilidades de exploração e inovação (Oliveira, 2006), visando o aperfeiçoamento desses fungos.

2.3.2 Leveduras Petit

O termo “Petite” é atribuído a leveduras defeituosas que possuem tamanhos reduzidos, que se desenvolvem sem a mitocôndria. Algumas condições como temperatura, açúcares e altas concentrações de etanol contribuem para o estresse celular, ocasionando o surgimento de leveduras “Petite”. A maioria das mutações que ocorrem nas leveduras cervejeiras resultam na perda da função respiratória (Laboratório da Cerveja, 2022). Leveduras com essa característica são comuns em muitos processos fermentativos, apesar de pouco abordado, esse fenômeno pode ocorrer em produções de cachaça.

Em um estudo feito por Lawrence et al. (2013), demonstrou que mutações que contribuem para o defeito do DNA mitocondrial acometem principalmente as células de leveduras mais velhas, atribuídas ao seu uso repetitivo em sucessivas fermentações, gerando um maior número de mutantes. O etanol, por exemplo, provou a sua potencialidade em poder alterar o DNA mitocondrial em leveduras *Saccharomyces*, em concentrações elevadas (Ibeas & Jimenez, 1997). Entretanto, outros fatores como enzimas que danificam a membrana celular, possuem o potencial indutor da mutação no DNA mitocondrial, indicando que o etanol não seja o causador direto (Jimenez et al., 1988). Alterações na integridade da membrana celular podem, – a longo prazo –, comprometer a estabilidade do DNA mitocondrial, favorecendo o acúmulo de mutações.

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAIS DE COLETA DO “PÉ DE CUBA” DOS ENGENHOS DO ESTADO DA PARAÍBA

Foram coletados, em 2021, amostras de 25 mL de “pé-de-cuba” (leveduras autóctones), em triplicata, de treze unidades produtoras de cachaça das cidades: Areia (8), Alagoa Grande (1), Alagoa nova (1), Guarabira (1), Belém (1) e Alhandra (1), todas localizadas no estado da Paraíba. O termo “pé-de-cuba” refere-se a uma etapa preparatória da fermentação alcoólica, onde uma pequena fração do caldo de cana é utilizada para multiplicar as leveduras, permitindo sua adaptação ao meio antes da fermentação principal. Essa prática contribui para o aumento da eficiência do processo e contribui para a manutenção de uma microbiota adaptada ao ambiente fermentativo (Embrapa, 2022).

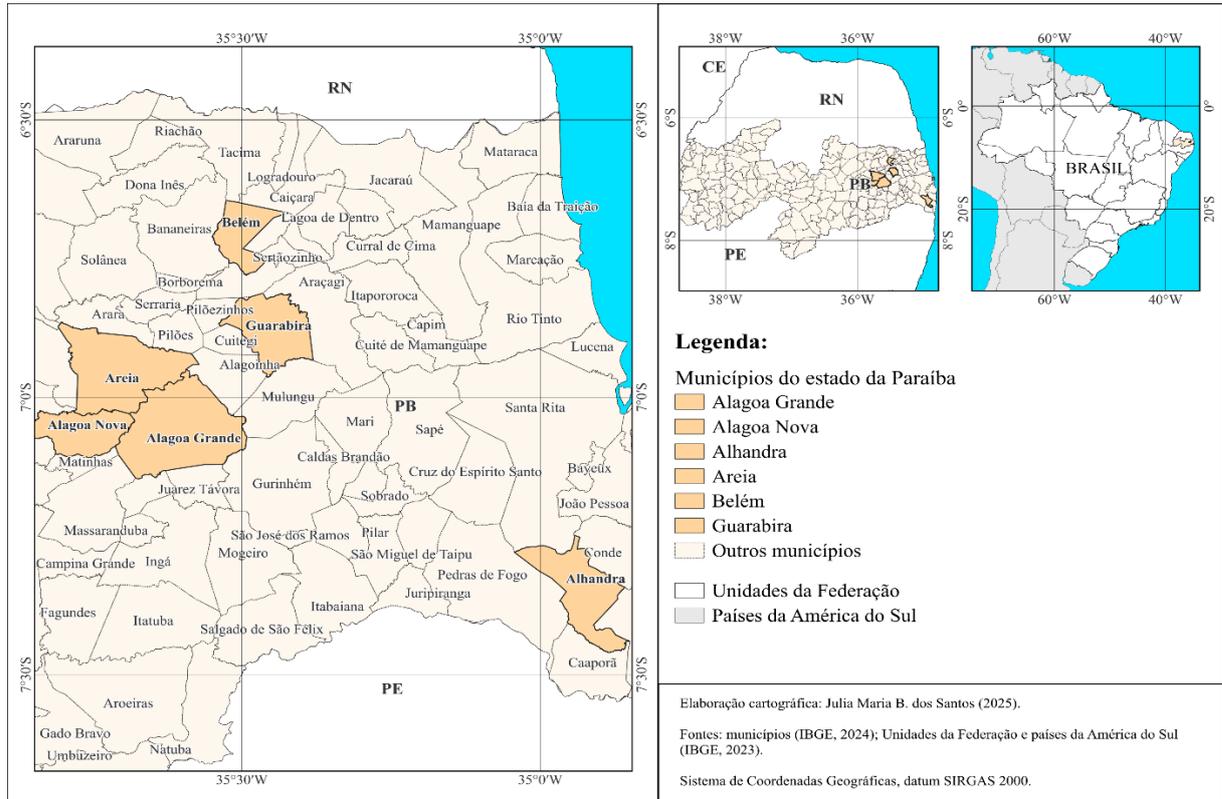
A distribuição geográfica das amostras pode ser visualizada no mapa (Figura 2), enquanto os dados detalhados de cada levedura e seu respectivo município estão descritos na Tabela 1. A elaboração cartográfica do mapa foi feita no software Quantum GIS®, com base em dados do IBGE (2023-2024), utilizando o sistema de coordenadas geográficas SIRGAS 2000.

Tabela 1: Relação das leveduras isoladas e cidades de coleta no estado da Paraíba.

| Cepas de Leveduras | Cidades do estado da Paraíba |
|--|-------------------------------------|
| Cepa 1, Cepa 2, Cepa 3, Cepa 4, Cepa 6, Cepa 10, Cepa 11, Cepa 12 | Areia |
| Cepa 5 | Alagoa Grande |
| Cepa 8 | Alagoa Nova |
| Cepa 7 | Guarabira |
| Cepa 13 | Belém |
| Cepa 9 | Alhandra |

Fonte: Autoral, 2025.

Figura 2: Localização dos municípios correspondentes aos Engenhos no estado da Paraíba, Brasil.



Fonte: Autoral, 2025.

3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO “PÉ DE CUBA” DOS ENGENHOS DO ESTADO DA PARAÍBA

As amostras foram armazenadas em Tubos Falcon de 50 mL estéreis com a adição de 25 mL de Glicerol e criopreservadas em um Freezer -80°C , preservando a integridade da amostra. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. A execução do estudo foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários (LTPA), Departamento de Solos e Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba/UFPB.

3.3 MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES

Para dar início ao processo de inoculação das leveduras, foi utilizado o meio de cultura Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD), utilizando 1% de Extrato de Leveduras, 2% de Peptona e 2% de D-glicose. Para o crescimento em placas de Petri, o meio de cultura usado foi o YPD

Ágar, adicionando 2% de Ágar Bacteriológico. Com a finalidade de avaliar o crescimento das leveduras em diferentes Fontes de Carbono, o meio de cultura usado foi o YP+FCE (fonte de carbono específica), preparado com a concentração de 2%, sendo elas: Glicose, Frutose, Galactose, Xilose, Manose, Ramnose, Sacarose, Maltose, Lactose e Melibiose. Para o teste que determina a Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S), usou-se o Meio LA, dissolvendo 0,5g de extrato de levedura, 0,3g de peptona, 4g de D-glicose, 0,02g de Sulfato de Amônio, 0,1g de Acetato de Chumbo neutro e 2g de Ágar Bacteriológico ajustado para 100 mL de água destilada. Para avaliar a capacidade de assimilação em diferentes fontes de nitrogênio, foram utilizadas três fontes específicas de nitrogênio (Lisina, Nitrato de Potássio ou Nitrito de Sódio), adaptando o meio de cultura base YPD Ágar, retirando o Extrato de Levedura e a Peptona; preparando duas soluções que confere todos os minerais necessários para o crescimento metabólico das leveduras. Para 1 litro de Meio de cultura: 20g de D-glicose; 2g da fonte de nitrogênio específica (Lisina, Nitrato de Potássio ou Nitrito de Sódio); 4mL da Solução 1; 200µL da Solução 2; 20g de Ágar Bacteriológico.

Reagente e soluções utilizadas:

- a) **Solução 1:** 2,5g de KCl (Potássio), 3,3g de Na₂PO₄.H₂O (Fósforo) e 0,75g MgCl₂ (Magnésio). Dissolvido e aferido a um balão volumétrico de 10 mL;
- b) **Solução 2:** 0,10g de FeSO₄.7H₂O (Ferro), 0,33g de ZnSO₄.7H₂O (Zinco), 0,10g de CuSO₄.5H₂O (Cobre) e 0,10g de MnSO₂.4H₂O (Manganês). Dissolvido e aferido a um balão volumétrico de 100 mL.

Com o objetivo de avaliar o desempenho fermentativo das leveduras isoladas de forma padronizada, foi utilizado um mosto sintético formulado para simular um caldo de cana-de-açúcar à 15 °Brix. A composição do mosto consistiu em: 90 g de sacarose, 18 g de glicose, 12 g de frutose, 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona (Maia et al., 2025). Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o volume final ajustado para 1 L em um balão volumétrico. A solução foi utilizada exclusivamente para os ensaios de fermentação com as 13 leveduras avaliadas individualmente. Todos os meios utilizados foram devidamente preparados e Autoclavados a 121°C a 15 psi durante 15 minutos imediatamente após a preparação.

3.4 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LEVEDURAS

Para o isolamento das leveduras presentes no “pé-de-cuba”, uma alíquota de 200 μL de cada amostra foram inoculados em tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio YPD líquido. As culturas foram mantidas em incubação em temperatura ambiente durante 24h, com o objetivo de promover a ativação e crescimento inicial das leveduras presentes no “pé-de-cuba”. Após esse período de pré-cultivo, com o auxílio de uma alça microbiológica estéril, foram semeadas em placas de Petri contendo YPD Ágar, por meio da técnica de estrias por esgotamento. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, pelo período de 96h. Esse processo foi repetido três vezes, selecionando uma colônia isolada de cada Engenho e inoculando em meio YPD e “estriando” em novas placas de Petri com YPD Ágar. Essa técnica permitiu o isolamento de colônias individuais, para no final, obter uma colônia de levedura mais pura possível.

3.4.1 Banco de Leveduras e Manutenção

As colônias de leveduras puras de cada Engenho foram armazenadas em Tubos Inclinados contendo 30 mL de YPD Ágar, semeadas sobre o meio, em triplicata, por 96 horas. Conservadas em geladeira à 4 °C, sendo renovadas a cada 4 meses. Além disso, uma alíquota de 1 mL do meio inoculado juntamente com 1 mL de Glicerol foi criopreservado em Tubos Eppendorf, em triplicata, em um Freezer à -80 °C.

3.4.2 Técnica de “Spot-plating”

Se trata de um método usado na Microbiologia para melhor aplicação e dispersão de uma e/ou mais pontos de uma mesma amostra em um meio de cultura sólido, permitindo o crescimento das colônias de leveduras. O processo consiste na aplicação de pequenas alíquotas de 10 μL do inóculo, dispersa em pontos sobre o meio de cultura YPD Ágar, uma triplicada por levedura. Comparada as técnicas padronizadas e utilizadas no âmbito microbiológico, a técnica de “spot plate” oferece um método igualmente preciso, mais rápido e econômico (Beargie et al., 1965). A técnica foi posteriormente utilizada para determinação do crescimento em diferentes temperaturas, carbonos específicos, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e nitrogênio.

3.4.3 Avaliação morfológica das leveduras

A caracterização morfológica das cepas selecionadas, oriundas das trezes unidades produtoras de cachaça, foi realizada a partir do inóculo submetido a uma diluição seriada para a obtenção de colônias isoladas (Kurtzman et al., 2011). A técnica de diluição foi baseada na metodologia de Tortora et al. (2012), utilizando a diluição 10⁻³ uma alíquota de 100µL foi transferida para a superfície do meio de cultura YPDA para o plaqueamento. As placas foram incubadas em uma BOD à temperatura de 28°C por 48h.

Após o crescimento das colônias, as leveduras foram analisadas macroscopicamente quanto ao seu diâmetro: Grande (5mm), Média (2 a 5mm) e Pequena (2mm); forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa), margem (lisas, laceradas, lobadas, filamentosas ou onduladas), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca) e cor (incolor, branca ou pigmentada) (Kurtzman et al., 2011). As imagens das colônias isoladas das treze cepas foram obtidas a partir do Estereomicroscópio Discovery V20 Zeiss.

As leveduras também foram observadas e analisadas microscopicamente quanto à sua morfologia celular, levando em consideração características como formato (esférico, ovalado, elipsoidal, alongado ou irregular), presença de brotamento (unipolar, bipolar ou multipolar) e presença de estruturas específicas, como pseudohifas ou micélios (Kurtzman et al., 2011). As análises foram realizadas a partir de lâminas preparadas com suspensões celulares frescas e examinadas sob Microscópio Óptico, utilizando a objetiva de 100x, juntamente com óleo de imersão. As imagens representativas das células das treze leveduras foram registradas digitalmente, com o auxílio de uma câmera digital e ajustadas no aplicativo ImageView.

3.5 TESTES DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE

3.5.1 Teste em diferentes Temperaturas

As treze cepas de leveduras foram submetidas ao crescimento em placas de petri, com meio de cultura YPD Ágar, para diferentes temperaturas, sendo elas: 4 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C e 40 °C por 96 horas (De-Barros et al., 2023). A técnica de dispersão utilizada foi “Spot plate”, inserindo 10µL para cada spot. Passado o período de crescimento, as placas foram fotografadas dentro de um fluxo laminar.

3.5.2 Teste de Assimilação de Fontes de Carbono específicas

O crescimento das treze leveduras selecionadas das unidades produtoras de Cachaça foi avaliado em placas de petri, com meio de cultura YP+FCE (fonte de carbono específica), preparado com a concentração de 2% (Glicose, Frutose, Galactose, Xilose, Manose, Ramnose, Sacarose, Maltose, Lactose e Melibiose) (De-Barros et al., 2023). O modo de dispersão das cepas de leveduras foi realizado através da técnica “Spot plate” (Beargie et al., 1965), inserindo 10µL para cada spot, sendo incubadas à temperatura ambiente (30 °C) por 96 horas. A avaliação foi determinada a partir do seu desenvolvimento nas placas com as fontes de carbono específicas, sendo fotografadas dentro de um fluxo laminar.

3.5.3 Teste de Resistência à Etanol (10%, 15% e 20%) e ao Ácido Acético (2%, 6% e 10%)

O crescimento das estirpes de leveduras dos treze Engenhos paraibanos fora medido em Tubos Falcon de 15mL, inoculadas em YPD líquido à temperatura ambiente, com suplementação de etanol com concentrações de 10%, 15%, 20%; e de ácido acético com concentrações de 2%, 6%, 10%, separadamente. As leituras foram realizadas através de um Espectrofotômetro Kasuaki modelo IL-226-NM, com comprimento de onda à 600nm, durante o período de 96 horas. As leituras foram efetuadas em dois momentos: a primeira, após o lançamento das leveduras ao meio YPD suplementado (10%, 15%, 20% de etanol/ 2%, 6%, 10% de ácido acético), e a segunda, ao final do período de incubação. Para medir o crescimento efetivo das células, foram realizadas leituras do meio YPD contendo etanol ou ácido acético, mas sem inoculação de leveduras, sendo este valor definido como “Branco”. Em seguida, seguiu-se para as leituras das amostras contendo as leveduras isoladas.

$$V_3 = V_2 - V_1 \quad (\text{Equação 1})$$

V₃ (Crescimento total da levedura durante o tempo de incubação); V₁ (Leitura Inicial – Branco); V₂ (Leitura Final – Branco).

O crescimento das leveduras foi calculado em três etapas: (i) diferença entre a leitura inicial da amostra e o valor do branco (V₁); (ii) diferença entre a leitura final da amostra e o valor do branco (V₂); (iii) diferença entre V₂ e V₁ (V₃), expressando o crescimento total da

levedura durante o período de incubação. A partir dos resultados, o crescimento efetivo foi estimado. Toda a análise foi realizada em triplicata.

$$\text{Cresc. Efetivo} = V3 - N(\text{cel/mL}) \quad (\text{Equação 2})$$

V3 (Crescimento total da levedura durante o tempo de incubação); N (Número de células/mL lançadas).

3.5.4 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

A determinação de Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) é um parâmetro importante a ser observado, tendo em vista que as leveduras utilizadas para produção de bebidas não podem produzir esse composto. As cepas de leveduras foram analisadas em placas de Petri contendo meio Ágar LA, em uma estufa a 30°C durante 10 dias, conforme descrito por Ono et al. (1991). Incubadas utilizando a técnica de “Spot plate”, obtendo uma triplicata por amostra de levedura, com o intuito de obter mais resultados em menos placas. Após o prazo, o desenvolvimento de colônias amareladas/amarronzadas foi o indicativo de que as cepas produziram H₂S.

3.5.5 Assimilação de Fontes de Nitrogênio

Para avaliar a capacidade de assimilação em diferentes fontes de nitrogênio pelas treze cepas de levedura selecionadas, foram utilizadas três fontes específicas de nitrogênio: Nitrito de Sódio (NaNO₂), Nitrato de Potássio (KNO₃) e Lisina (C₆H₁₄N₂O₂), a partir da adaptação de Sidrim e Moreira (1999). Avaliadas em placas de petri, a partir da técnica de “spot plates” à temperatura ambiente (30 °C) durante 96 h.

3.5.6 Desempenho Fermentativo em Cepas Isoladas

Todas as leveduras isoladas foram submetidas a uma avaliação de seu desempenho fermentativo. Individualmente, as cepas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura YPD líquido, incubados por 24 horas. Os inóculos foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio YPD, incubado em temperatura ambiente por mais 48 horas, garantindo maior número de células. Ao final da incubação, uma alíquota de 10 µL foi transferida para uma

câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em cinco quadrados menores, localizados dentro de um dos quadrantes grandes centrais da câmara.

$$\text{Leveduras} \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \left(\frac{\text{cels totais}}{5} \right) * 16 * 25 * 10^4 \quad (\text{Equação 3})$$

(Cels totais) – Média do número de células contadas; (5) – Número de campos contados; (16) – Número de quadrantes por campo na Câmara de Neubauer; (25) – Número de quadrantes maiores da Câmara de Neubauer; (104) – Fator de correção referente ao volume da Câmara de Neubauer, equivalente a 0,1 mm de altura).

A partir do valor da média de células/mL, foi calculado o volume necessário para determinar a quantidade de 30 milhões de células/mL, padrão utilizado para dar início ao processo fermentativo em algumas unidades produtoras de cachaça. O número de células foi mensurado com o uso de micropipetas calibradas Kasvi, depois centrifugadas para separar a biomassa do sobrenadante e posteriormente transferido para os mini fermentadores.

As fermentações foram conduzidas em 75 mL de um mosto sintético com teor de sólidos solúveis de 15°Brix, como determinado por Maia et al. (2025). As fermentações aconteceram em mini fermentadores de vidro estéreis de 250 mL com tampa acoplado um airlocker. e foram avaliadas por perda de massa (CO₂) em intervalos de 4 h durante um período de 12 dias, com pesagens realizadas em uma balança de precisão Tecnal Mark 2200 Classe II (Figura 3).

$$\text{Inóculo Inicial} = \left(\frac{3,0 * 10^7}{\text{Leveduras (cel/ml)}} \right) * \text{Mosto(ml)} \quad (\text{Equação 4})$$

(3,0 * 10⁷) – Média padronizada em 30 milhões de células de leveduras; (Leveduras (cel/ml)) – Concentração de células de levedura por mL; (Mosto(ml)) – Quantidade de mosto usado para a fermentação.

Figura 3: Monitoramento da fermentação por perda de massa (CO_2) em um mini fermentador com airlocker.



Fonte: Autoral, 2024.

3.5.7 Teste de Floculação

Ao final das fermentações, os mini reatores foram agitados usando agitador magnético a 30 °C por 1 min a 120 RPM. Ao fim da agitação, a floculação foi avaliada através da observação da formação de flocos suspensos no meio fermentado, conforme a metodologia adaptada de Guimarães (2005). Sendo considerado qualitativamente positivo para floculação quando observada a formação de flocos visíveis.

3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO FERMENTADO:

Ao final do processo fermentativo, os parâmetros analisados foram: Teor alcoólico, Acidez Total, Acidez Fixa, Acidez Volátil e Ésteres Totais. Permitindo uma análise comparativa entre as diferentes cepas durante as fermentações realizadas.

3.6.1 Teor Alcoólico

O teor alcoólico foi determinado pelo método baseado na avaliação da densidade relativa da solução, utilizando um Ebuliômetro, realizado por meio da leitura direta da densidade ou em graus de Gay Lussac (°GL). Esta ferramenta foi projetada para medir o teor de álcool ou a força real das misturas de água e álcool, mostrando apenas a concentração de álcool em volume.

3.6.2 Acidez Total, Volátil e Fixa

A acidez total (AT) do mosto fermentado foi determinada pelo método 221/IV, que se baseia na titulação dos ácidos com solução padrão de NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador até atingir o ponto de equivalência. Os resultados da AT foram expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de amostra (Lutz, 2008). A equação para determinar a quantidade de Acidez Total (AT) nas amostras, é expressa abaixo:

$$AC\left(\frac{\text{mg de Ácido Acético}}{100\text{mL}}\right) = \frac{n * M * f * PM}{10 * V} \quad (\text{Equação 5})$$

(n) – Volume gasto de NaOH/mL; (M) – Molaridade do NaOH; (PM = 60) – Peso Molecular do Ac. Acético; (V) – Volume da amostra; (f) – Fator de correção de NaOH.

Acidez Fixa (AF): A determinação da acidez fixa foi realizada seguindo o método 222/IV, que consiste na evaporação da amostra, seguida pela titulação dos ácidos residuais com solução de NaOH 0,1 M. A acidez fixa é expressa em mg de ácido acético por 100 mL de amostra (Lutz, 2008). A equação para determinar a quantidade de Acidez Fixa (AF) nas amostras, é expressa abaixo:

$$AC\left(\frac{\text{mg de Ácido Acético}}{100\text{mL}}\right) = \frac{n * M * f * PM}{10 * V} \quad (\text{Equação 6})$$

(n) – Volume gasto de NaOH/mL; (M) – Molaridade do NaOH; (PM = 60) – Peso Molecular do Ac. Acético; (V) – Volume da amostra; (f) – Fator de correção de NaOH.

Acidez Volátil (AV): A determinação da Acidez Volátil foi realizada com base no método 223/IV, descrito por Lutz (2008). A quantificação ocorre a partir da diferença entre a Acidez Total (AT) e a Acidez Fixa (AF) do mosto fermentado, sendo os resultados expressos em mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro. A equação utilizada para determinar a quantidade de Acidez Volátil (AV) nas amostras, é expressa abaixo:

$$AV\left(\frac{mg \text{ a. anidro}}{100mL}\right) = \frac{AT - AF}{G} \quad (\text{Equação 7})$$

(AT) – Ácidos Totais; (AF) – Ácidos Fixos; (G) – Graduação Alcoólica.

3.6.3 Ésteres Totais

A quantificação dos ésteres totais foi realizada através de uma adaptação do método proposto pelo Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres – MAPA. O procedimento envolveu a hidrólise alcalina dos ésteres, seguida pela titulação dos ácidos liberados utilizando uma solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M.

Inicialmente, foi pipetado 50mL do mosto sintético fermentado, oriundo a partir da fermentação de cada cepa de levedura, em um pote de vidro estéril com a capacidade de 200mL. A solução foi neutralizada com a solução de hidróxido de sódio à 0,1M (NaOH), até a coloração rósea, utilizando como indicador a fenolftaleína. Após a neutralização, os potes de vidro contendo as amostras foram vedados e deixados em repouso por 12 horas. Seguido o tempo proposto, caso a coloração rosada da amostra desapareça, o processo é interrompido e adicionado mais 10mL de NaOH 0,1M; deixando o sistema em repouso por mais 30 minutos, assegurando a completa reação dos ésteres. Dando continuidade ao procedimento, foram adicionados 1 a 2,5mL de ácido sulfúrico 0,1N (H₂SO₄) para neutralizar o excesso de NaOH presentes na amostra. Após a neutralização, as amostras foram tituladas com a mesma solução de hidróxido de sódio (0,1M), até a coloração rósea, indicando o ponto final da reação. Os resultados foram expressos em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro.

$$ET\left(\frac{mg \text{ a. etila}}{100 \text{ mL a. a.}}\right) = \left(\frac{Vg \text{ NaOH} * M * 88 * 100}{Va}\right) * \frac{100}{G} \quad (\text{Equação 8})$$

(Vg) – Volume gasto de NaOH; (M) – Molaridade da solução de NaOH; (88) – Massa molecular do acetato de etila; (Va) – Volume da Amostra, em mL; (G) – Graduação Alcoólica.

3.6.4 Viabilidade Celular

A viabilidade celular é um parâmetro determinado pela contagem de células de levedura viáveis (vivas) e não-viáveis (mortas). Para quantificar a concentração de células por mililitro de solução, utiliza-se a câmara de Neubauer, uma lâmina de microscopia projetada com quadrantes de tamanhos definidos. Fazendo uso do corante Azul de metileno, as células viáveis não absorvem o corante, permanecendo incolores, enquanto as células mortas são coradas de azul. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como percentual de células viáveis ao final do processo fermentativo.

O procedimento é realizado na proporção de 1:1, adicionando um 200µL da amostra e 200 µL do Azul de metileno em um eppendorf; retirando uma alíquota de 10 µL e dispersando em uma lamínula da câmara de Neubauer, sendo observada por meio de um Microscópio eletrônico utilizando a objetiva de 40X. Escolhendo um dos quadrantes que contém o maior número de leveduras, contabilizadas as leveduras presentes dentro dos quadrados médios, escolhendo 5 quadrados menores aleatórios. Esse método permite estimar a densidade de células de levedura na amostra, sendo amplamente utilizado em diversas aplicações, como no controle de qualidade das indústrias alimentícias e de bebidas.

$$VB (\%) = \left(\frac{Céls V}{Céls V + Céls M} \right) \quad (\text{Equação 9})$$

(Cél V) – Células vivas; (Cél M) – Células mortas.

3.6.5 Parâmetros cinéticos

A descrição da cinética de fermentação será realizada pela velocidade específica de crescimento microbiano (μ , h⁻¹), tempo de duplicação celular (td, h), velocidade específica de consumo de substrato (q_s , h⁻¹), velocidade específica de formação de etanol (q_p , h⁻¹), Y - rendimento ($Y_{p/s}$ (g de etanol/g de AT), $Y_{p/x}$ (g de etanol/g de células), $Y_{x/s}$ (g de células/g de AT), $Y_{CO_2/EtOH}$ (g de CO₂/g de etanol), $Y_{CO_2/s}$ (g de CO₂/g de substrato), $Y_{CO_2/x}$ (g de CO₂/g de células), produtividade celular (P_x , g/h), produtividade de etanol (P_p , g/h), produtividade de CO₂ (PCO_2 , g/h)).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), teste tukey e Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando o software STATISTICA 5.0®. Os resultados também foram submetidos a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), utilizando o software RStudio®. Toda a análise estatística foi baseada em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras foram coletadas de treze unidades produtoras de cachaça. As amostras foram coletadas em tubos falcon de 50 mL (25 mL amostras e 25 mL glicerol, 1:1) e acondicionados em um Freezer -80 °C. Ao início das atividades estas foram reativadas, purificadas e caracterizadas morfológicamente. As cepas foram selecionadas considerando o seu potencial de crescimento em diversas temperaturas (4, 15, 20, 25, 30, 37 e 40 °C), consumo de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, xilose, manose, ramnose, sacarose, maltose, lactose e melibiose), tolerância a etanol (10%, 15% e 20%), ao ácido acético (2%, 6% e 10%), produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), assimilação em diferentes fontes de nitrogênio (Nitrato de Potássio, Nitrito de Sódio e Lisina), avaliação do desempenho fermentativo, análises físico-químicas do mosto sintético fermentado e, viabilidade celular. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Para identificar padrões de similaridade dos dados obtidos, foi realizado uma Análise de Componentes Principais (PCA) e uma Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), utilizando o índice de Gower.

4.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

Ao purificar as leveduras provenientes das treze unidades produtoras de cachaça, foi possível observar a presença de colônias de microrganismos unidas e isoladas. A seleção e isolamento das cepas de leveduras garante a eficiência dos métodos avaliativos, como a assimilação de carbono, nitrogênio e o desempenho fermentativo; avaliando a influência de cada cepa, separadamente, visando o melhoramento e eficiência do processo e, conseqüentemente, a qualidade do produto final.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica de colônias é uma etapa fundamental para a identificação inicial das leveduras. Analisando os dados macro morfológicos das 13 leveduras isoladas (Tabela 2), todas possuem o formato circular; maioria das amostras apresentam a textura lisa, exceto a Cepa 1 que possui a textura rugosa (Tabela 2, Figura 4). Avaliando os tamanhos, todas tem o tamanho pequeno, variando de 0,39 mm a 1,49 mm, dentre as amostras, destacando-se a Cepa 7 com a menor e a Cepa 10 com a maior dimensão (Tabela 2, Figura 4). Com relação a coloração, sete leveduras são incolores e seis possuem a coloração branca. Já quanto a margem, maioria das amostras isoladas possuem as margens lisas, exceto a Cepa 1 com a margem lacerada (Tabela 2, Figura 4). Todas as leveduras apresentaram colônias com elevação convexa. Referente ao brilho característico das cepas, sete amostras são translúcidas, enquanto que seis delas são opacas (Tabela 2, Figura 4).

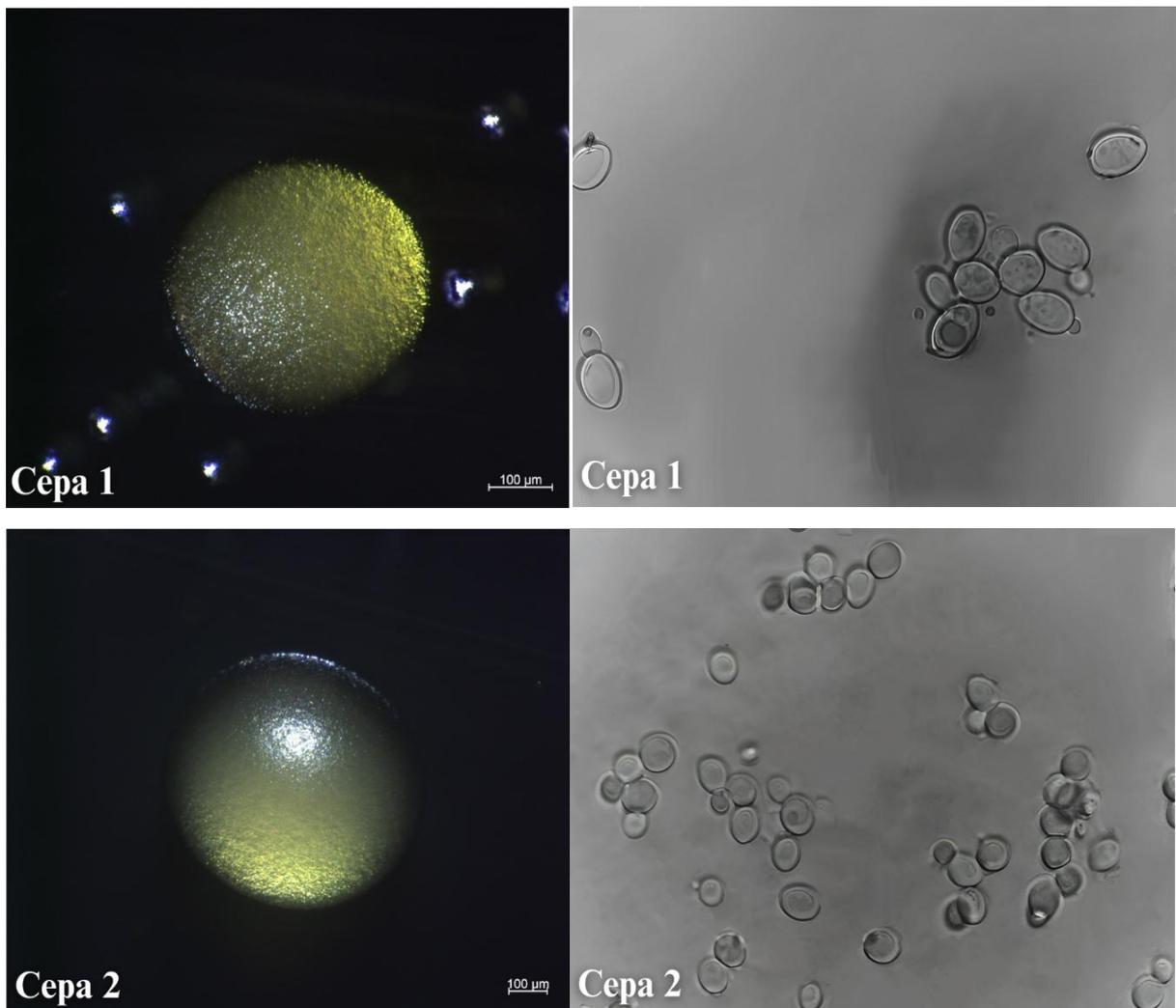
Tabela 2: Características macro morfológicas das colônias de leveduras isoladas de treze unidades produtoras de cachaça.

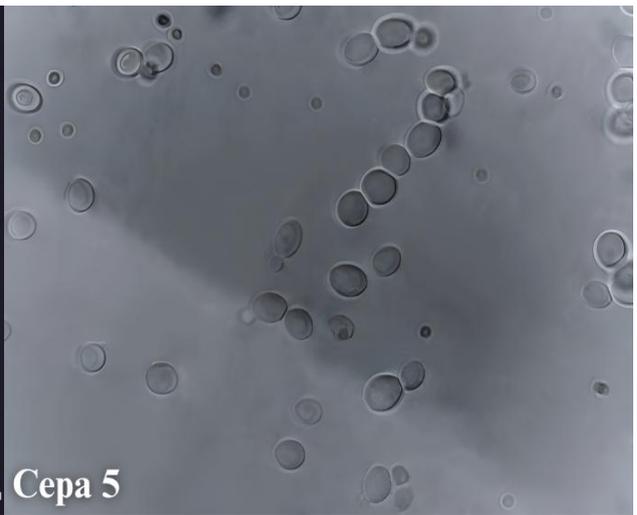
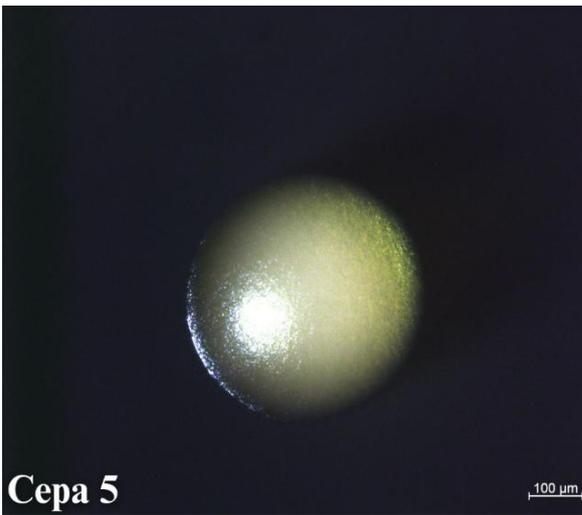
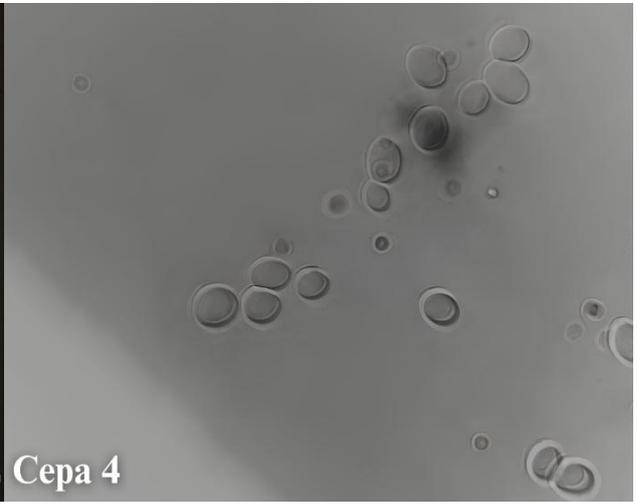
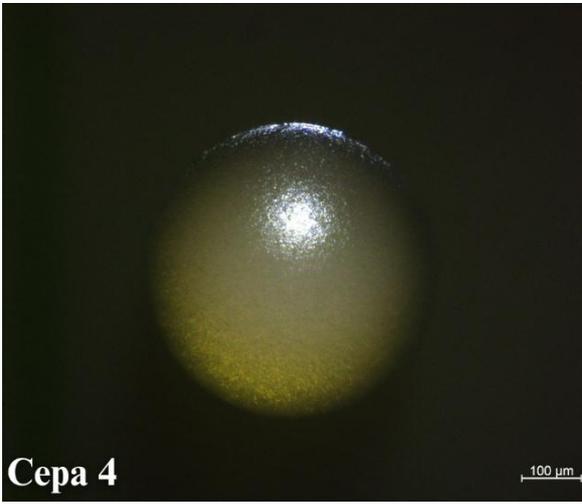
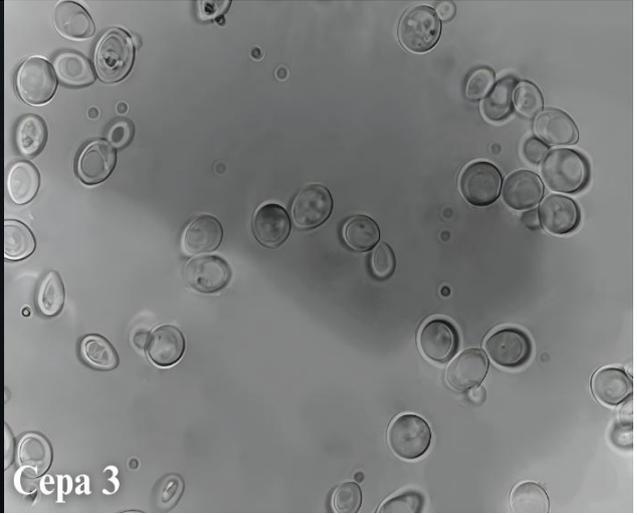
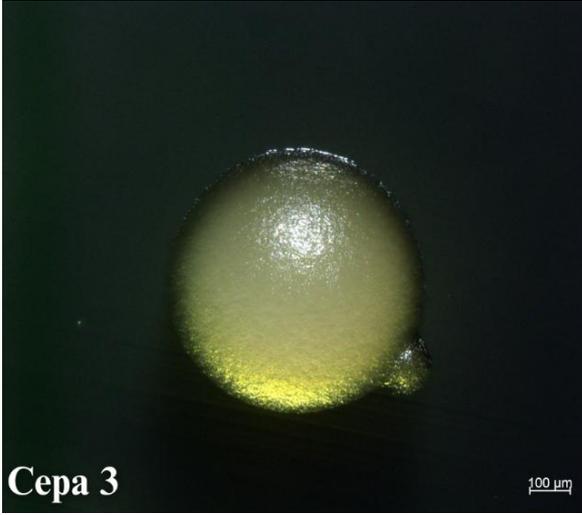
| Cepas de Leveduras | Tamanho (mm) | Formato | Textura | Cor | Margem | Elevação | Brilho |
|--------------------|-------------------|----------|-----------|---------|-----------|----------|-------------|
| 1 | Pequena (0,42 mm) | Circular | Granulosa | Incolor | Laceradas | Convexa | Translúcida |
| 2 | Pequena (0,60 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 3 | Pequena (0,48 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 4 | Pequena (0,41 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 5 | Pequena (0,48 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 6 | Pequena (0,64 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 7 | Pequena (0,39 mm) | Circular | Lisa | Incolor | Lisas | Convexa | Translúcida |
| 8 | Pequena (0,71 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |
| 9 | Pequena (0,62 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |
| 10 | Pequena (1,49 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |
| 11 | Pequena (1,17 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |
| 12 | Pequena (0,63 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |

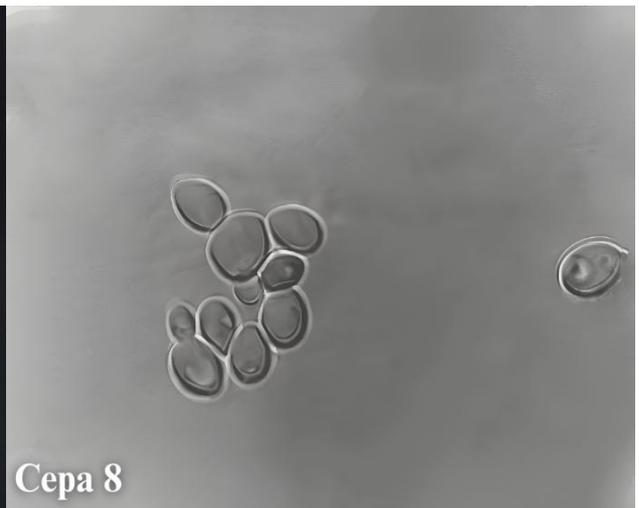
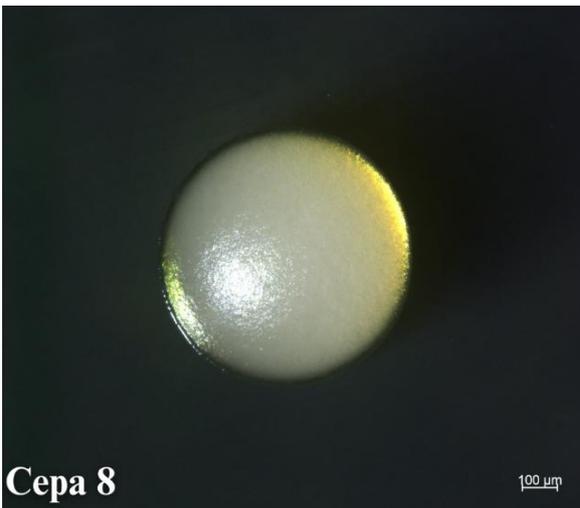
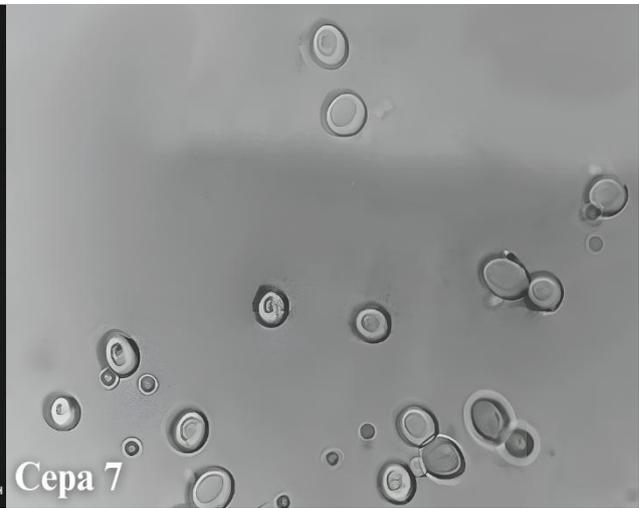
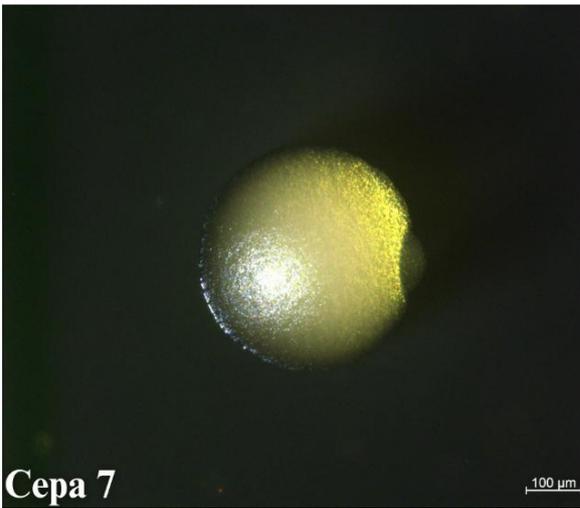
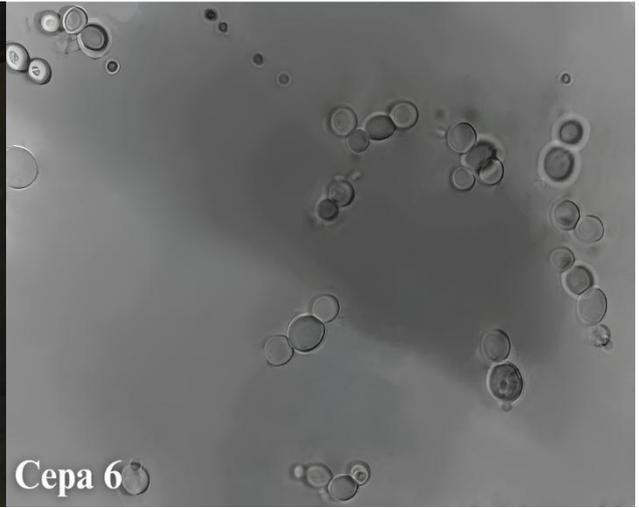
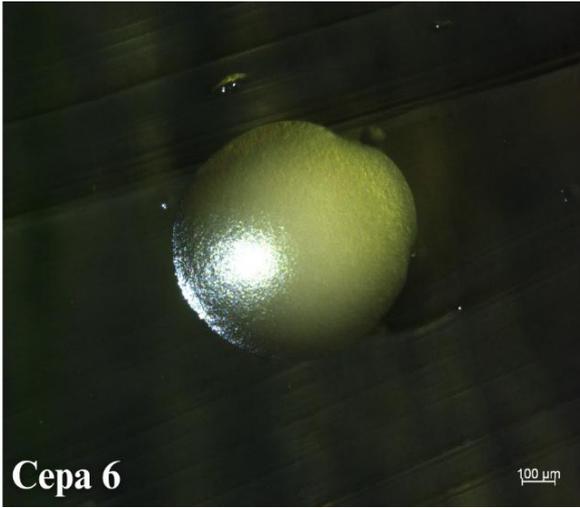
| | | | | | | | |
|----|----------------------|----------|------|--------|-------|---------|-------|
| 13 | Pequena (0,97 mm) | Circular | Lisa | Branca | Lisas | Convexa | Opaca |
|----|----------------------|----------|------|--------|-------|---------|-------|

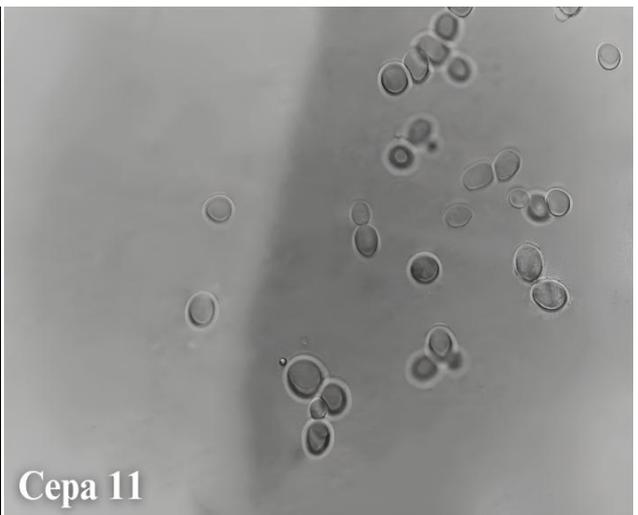
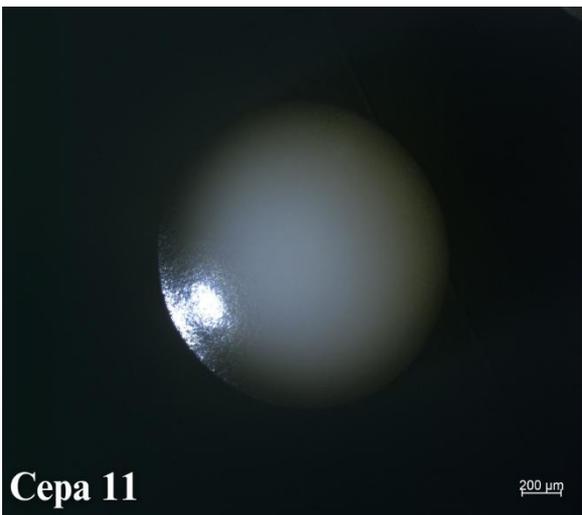
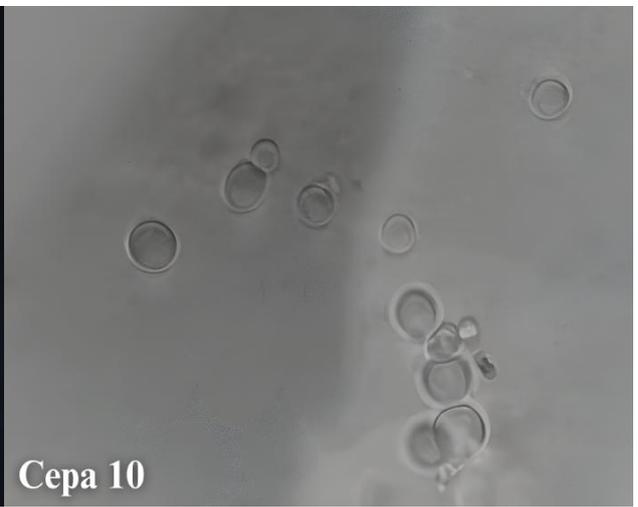
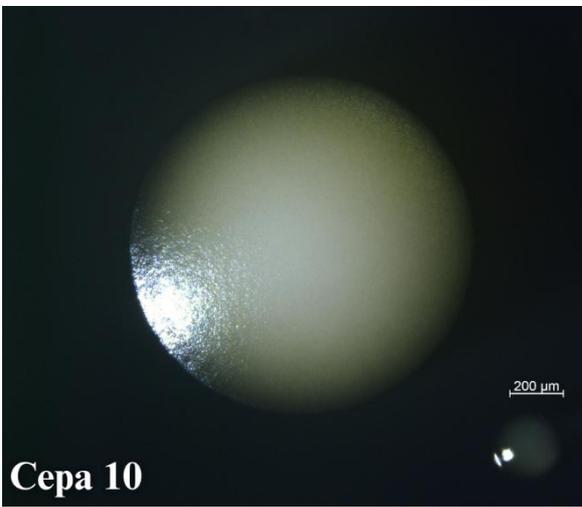
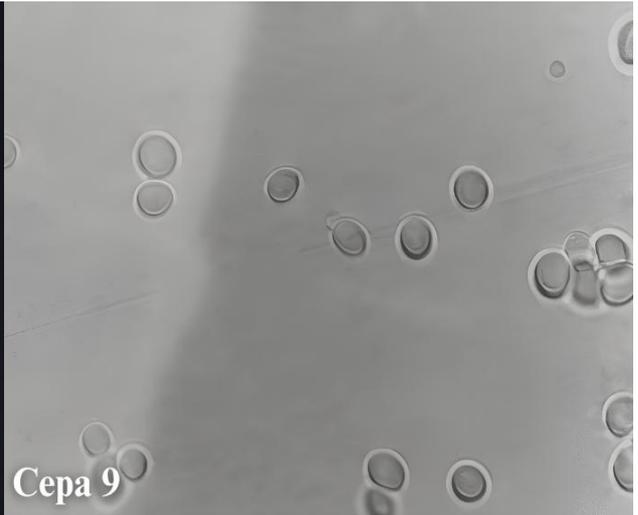
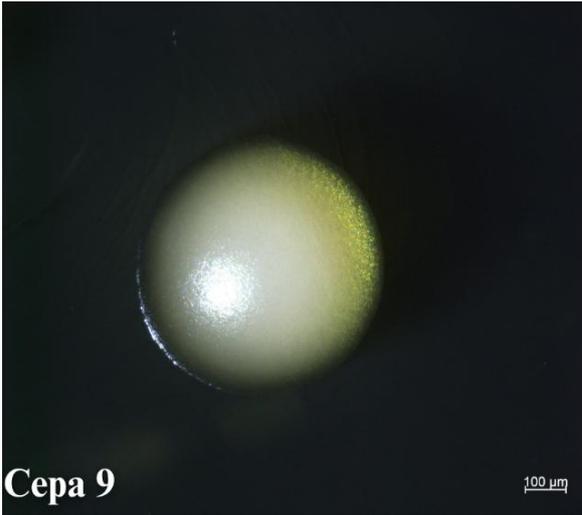
Legenda: Tamanho: Grande (5mm), Média (2 a 5mm) e Pequena (2mm); formato (circular, irregular, rizoide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa), margem (lisas, laceradas, lobadas, filamentosas ou onduladas), textura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca) e cor (incolor, branca ou pigmentada).

Quando a caracterização micro morfológica foi realizada, baseada nos métodos de Kirk et al. (2008), nenhuma levedura apresentou pseudo-hifas. Maioria das leveduras isoladas apresentam a forma circular, exceto as amostras 1, 3, 7, 12 e 13, respectivamente, que apresentam o formato ovoide/oval (Figura 4). Variações morfológicas durante o manuseio das amostras ao isolá-las podem estar diretamente ligadas à constituição do meio de cultura a qual foram submetidas ou estresse metabólico quando sujeitas a sucessivas repicagens (Casalone et al. 2005). Embora as características morfológicas não sejam suficientes para a identificação taxonômica mais precisa, elas fornecem *insights* valiosos sobre como de cada cepa se comporta.









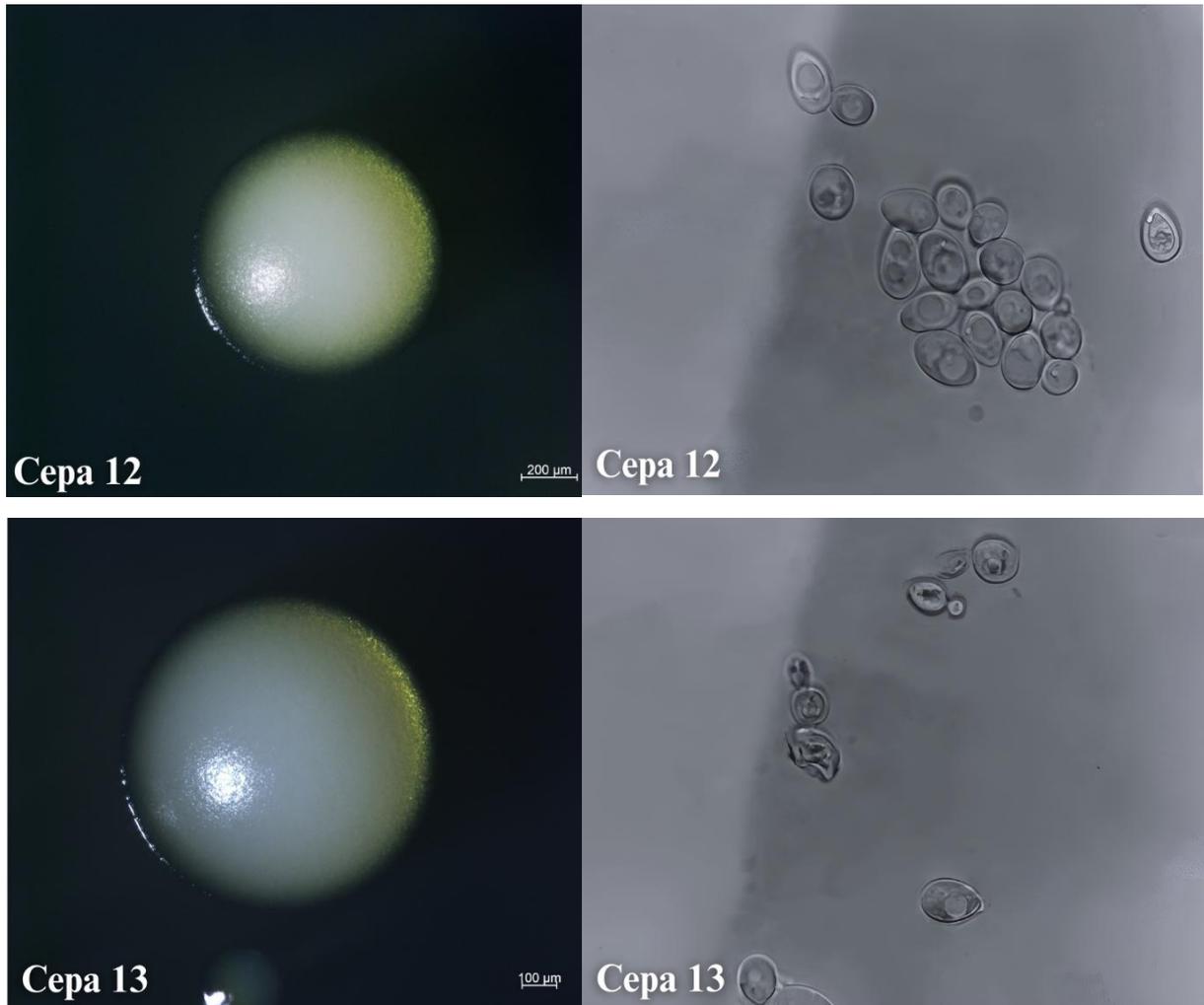


Figura 4: Características Macro e Micro morfológicas das cepas de leveduras isoladas das treze unidades produtoras de cachaça, incluindo: Cepa 1, Cepa 2, Cepa 3, Cepa 4, Cepa 5, Cepa 6, Cepa 7, Cepa 8, Cepa 9, Cepa 10, Cepa 11, Cepa 12 e Cepa 13.

4.3 TESTES DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE

4.3.1 Teste em Diferentes Temperaturas

Leveduras submetidas diferentes temperaturas apresentam respostas metabólicas divergentes. Embora todas as amostras tenham apresentado manchas esbranquiçadas após a incubação a 4 °C, esse resultado pode estar relacionado à presença residual de células leveduriformes na alíquota, o que é esperado nessas condições. A cepa 10 não apresentou indícios de crescimento visível (Tabela 3). Fermentações em baixas temperaturas, como <15 °C, leva a vinhos mais aromáticos e mais pálidos (Walker, 1998). Temperaturas amenas ocasionam a queda na taxa metabólica das leveduras, a fermentação e a respiração celular têm sua atividade reduzida.

Tabela 3: Capacidade das leveduras crescerem em diferentes Temperaturas por 96 h.

| Temperaturas /Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| 4 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 15 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 20 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 37 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |

Legenda: (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

A atividade metabólica das leveduras fica lenta ou inativa a baixas temperaturas. Todas as amostras exibiram crescimento ao serem submetidas a temperatura de 15 °C (Tabela 3). Leveduras adaptadas a baixas temperaturas, como a *Saccharomyces pastorianus*, são utilizadas na produção de cerveja Lager em temperaturas que variam de 6 a 12 °C (Kopecká et al., 2016). As condições de crescimento das leveduras se tornam favoráveis com o aumento da temperatura. Leveduras que toleram altas temperaturas são mais utilizadas em processos industriais. Todas as cepas apresentaram crescimento quando incubadas a 30 °C (Tabela 3). É importante destacar que, quanto maior a temperatura maior será a velocidade do processo fermentativo, sendo também maior a formação, transformação e degradação de compostos secundários (Massaguer, 2005). As leveduras possuem um limite de estresse térmico. Todas as leveduras apresentaram crescimento quando incubadas a 37 °C (Tabela 3). Isto pode explicar porque diferentes espécies como a *Saccharomyces cerevisiae* podem crescer sob condições de temperatura mais elevadas do que *Saccharomyces pastorianus* (De-Barros et al. 2023).

Cepas de leveduras que sobrevivem a altas temperaturas são importantes para as indústrias (De-Barros et al. 2023). Boa parte das cepas apresentaram crescimento a 40 °C, com exceção das amostras 1, 2, 3, 4, 10 que apresentaram passar por uma situação estressante quando submetidas a uma temperatura elevada; a amostra 9 não apresentou crescimento (Tabela 3). Cepas de leveduras que podem crescer a 40 °C fornecem uma informação importante para processos de fermentação conduzidos durante curtos períodos de tempo (De-Barros et al. 2023).

4.3.2 Teste de Assimilação de Fontes de Carbono específicas

Os resultados da assimilação de diferentes fontes de carbono pelas leveduras isoladas das treze unidades produtoras de cachaça mostram capacidades variadas de crescimento, indicando adaptações distintas à cada meio fermentativo, influenciando diretamente na eficiência em processos industriais. Todas as amostras (1 a 13) demonstraram crescimento em glicose e manose, indicando alta eficiência na metabolização desses monossacarídeos (hexoses), que estão, comumente, presentes em diversos vegetais e frutas (Tabela 4).

Tabela 4: Capacidade das leveduras crescerem em diferentes Fontes de Carbono por 96 h.

| Fontes de Carbono/Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| Glicose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Frutose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Xilose | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| Manose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ramnose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sacarose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Melibiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Legenda: (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

A cana-de-açúcar é conhecida por seu alto teor de glicose, frutose e sacarose como açúcares primários (Rosa et al. 2009; Martini et al. 2010). As cepas de *Saccharomyces* possuem um sistema avançado de transporte de hexose que regula o transporte de carboidratos e possui alta afinidade pela glicose. A *Saccharomyces cerevisiae* fermenta glicose, manose e frutose por meio da glicólise (Briggs et al., 2004; Galdieri et al, 2014; Van Maris et al., 2006). A frutose é um carboidrato semelhante à glicose, encontrado em frutas, mel e outros alimentos. Maioria das cepas assimilam esse carbono (Tabela 4), indicando crescimento, e a cepa 13 que não houve crescimento. A glicose e a frutose são chamadas de “açúcares de fermentação rápida” ou “açúcares reduzidos” (De-Barros et al. 2023).

A galactose é um monossacarídeo importante no processamento de produtos fermentados (De-Barros et al. 2023). Todas as amostras exibiram crescimento (Tabela 4).

Portanto, todas as cepas avaliadas apresentaram crescimento, indicando a existência de genes como: GAL1, GAL7, e GAL10, que são responsáveis por converter galactose em glicose-6-fosfato, permitindo que ela entre nas vias metabólicas usuais de fermentação (Kim et al. 2014). Vale salientar que, a galactose pode ser gerada a partir da quebra da lactose (glicose + galactose), por ação da enzima lactase (Klein et al. 1998). Já lactose é um carboidrato encontrado no leite e seus derivados, sendo importante no processo de fermentação para fabricação de produtos lácteos. Todas as leveduras avaliadas apresentaram crescimento, revelando potencial para diversas aplicações industriais, principalmente, produtos derivados do leite (Tabela 4). A quebra da lactose gera glicose e galactose; porém, ao gerar estas duas moléculas, as leveduras tendem a consumir a glicose presente, gerando uma repressão catabólica que influencia o consumo da galactose (Rubio-Teixeira, 2005; Klein et al. 1998).

A xilose faz parte de um grupo de pentoses (cinco carbonos) comumente encontrado em plantas lenhosas e em biomassas de origem vegetal (De-Barros et al. 2023). Diante as amostras avaliadas, as cepas 9 a 13 apresentaram crescimento em xilose; porém, as demais amostras não foram capazes de desempenhar crescimento utilizando xilose como única fonte de carbono (Tabela 4). Em leveduras, a assimilação da xilose ocorrer devido a presença do gene *XYL3*, responsável pela conversão da xilose em xilulose-5-fosfato que acessa, diretamente, o metabolismo central (glicólise e biossíntese) na forma de pentose fosfato (De-Barros et al. 2023, Cunha, 2019). A ramnose é um carbono encontrado em alimentos ricos em pectinas. Todas as amostras apresentaram crescimento em ramnose (Tabela 4). Portanto, todas as cepas avaliadas contêm enzimas que metabolizam a ramnose (De-Barros et al., 2023). Devido à falta de genes que codificam enzimas que metabolizam a ramnose em seu genoma, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não pode crescer na ramnose como única fonte de carbono (Boulton e Quain, 2001; Van Maris et al., 2006).

A sacarose é um dissacarídeo e o principal carboidrato presente na composição do caldo de cana-de-açúcar (Riberio-Filho, 2020). A quebra da sacarose gera dois monossacarídeos, que são glicose e frutose (De-Barros et al. 2023, Nascimento et al., 2019). Todas as cepas avaliadas apresentam crescimento em sacarose (Tabela 4). Isso indica que as leveduras selecionadas neste estudo contêm genes invertase, codificados como *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5* e *SUC7* (De-Barros et al. 2023). Portanto, estas cepas tendem a ser boas consumidoras de açúcares fermentescíveis presentes na cana de açúcar, portanto, podem ser de grande valia para produções de cachaça, rum, e etanol de cana-de-açúcar. A maltose e a melibiose são dissacarídeos. A maltose é composta por duas moléculas de glicose e a melibiose é um

dissacarídeo formado por glicose e galactose (Walker e Stewart, 2016; Boulton e Quain, 2001; Briggs et al., 2004). Todas as cepas selecionadas apresentaram crescimento em maltose e melibiose (Tabela 4). O crescimento em maltose revela a presença dos genes MAL1-4 e MAL6 devido a seu poder de consumo de maltose (Walker e Stewart, 2016; Boulton e Quain, 2001; Briggs et al., 2004). O crescimento em melibiose indica a existência de atividade da enzima α -Galactosidase (melibiase) e, conseqüentemente, a existência do gene MEL1 (De-Barros et al. 2023, Walker e Stewart, 2016; Briggs et al., 2004). Portanto, estas leveduras podem quebrar maltose em duas moléculas de glicose, assim como, podem quebrar melibiose em uma molécula de glicose mais uma molécula de galactose.

4.3.3 Teste de Resistência à Etanol (10%, 15% e 20%)

O etanol, produto final da fermentação dos açúcares através das leveduras, têm a capacidade de exercer um estresse significativo sobre as células, afetando seu crescimento e sobrevivência (Thomas et al., 1978; D'Amore; Stewart, 1987; D'Amore et al., 1990). Altas concentrações de etanol no meio faz com que as células percam a integridade da membrana, podendo levar até uma perda massiva de metabólitos intracelulares (Bücker, 2014). Todas as cepas selecionadas tenderam a diminuir os seus crescimentos conforme o aumento da concentração de etanol (Figura 5). Quando submetidas à concentração de 10%, as cepas analisadas apresentaram crescimento intenso, variando de $3,3 \times 10^8$ a $1,0 \times 10^9$ células/mL, destacando-se as cepas 1, 5, e 11 (Figura 5). Quando submetidas a concentração de 15%, todas as cepas sofreram uma diminuição significativa nos seus crescimentos, embora todas as cepas apresentaram número final de células maior do que o dobro do número de células inoculadas, inicialmente, exceto as cepas 10 e 11 que apresentaram menor crescimento durante a inoculação em meio contendo 15% de etanol (Figura 5). Por outro lado, a cepa 5 apresentou o maior crescimento (Figura 5). Quando submetidas a concentração de 20%, todas as cepas sofreram uma diminuição significativa nos seus crescimentos comparadas aos testes de 10 e 15%; porém, todas as cepas apresentaram número final de células maior do que o dobro do número de células, inicialmente, inoculadas (Figura 5). A cepa 5, apresentou o maior crescimento quando inoculada ao meio contendo 20% de etanol; porém, as cepas 1, 9, 10 e 11 apresentaram menor crescimento (Figura 5). A cepa 9 quadruplicou a concentração de células inoculadas, inicialmente, se mantendo estável com o decorrer do aumento da concentração de etanol; sendo a cepa que sofreu a menor redução proporcional entre as concentrações testadas, indicando uma maior tolerância relativa ao etanol, especialmente na concentração de 20% (Figura 5).

Todas as cepas apresentaram boa resistência as concentrações de etanol testadas, isso indica que as leveduras selecionadas neste estudo podem continuar fermentado com eficiência em ambientes de alta toxicidade devido as concentrações de etanol. O crescimento de leveduras em meios com alta toxicidade devido a presença de etanol indicam que todas as cepas selecionadas neste estudo contêm os genes URA7 e GAL6, responsável pela resistência e/ou tolerância ao etanol (Yazawa et al., 2007). Destacam-se as cepas 1, 2, 3, 5, 6, 11, 12 e 13 apresentaram maior resistência a etanol a 10% devido a seus crescimentos acima de 600 milhões de células de leveduras/mL (Figura 5). Adicionalmente, a cepa 5 apresentou maior resistência a etanol a 15 e 20% devido a seus crescimentos acima de 500 milhões de células de leveduras/mL, em ambos os testes (Figura 5).

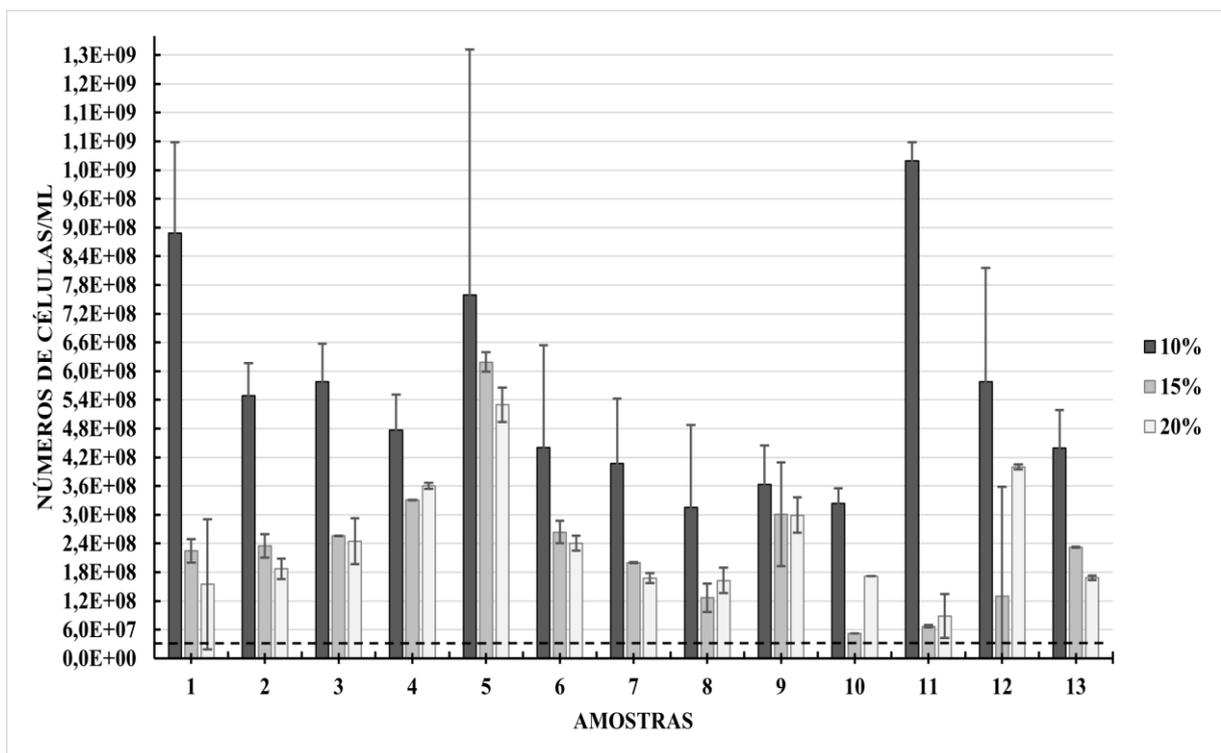


Figura 5: Crescimento das cepas selecionadas de 1 a 13 inoculadas em meio contendo 10, 15 e 20% de Etanol por 96 horas. Resultados expressos em número total de células/mL).

4.3.4 Teste de Resistência à Ácido Acético (2%, 6% e 10%)

Leveduras tolerantes a altas concentrações de ácido acético desempenham um papel essencial para a produção de biocombustíveis e bebidas alcoólicas (Guaragnella e Bettiga, 2021). O ácido acético é um subproduto da fermentação; porém, pode agir como inibidor de performance da levedura (Furlan, 2021). Todas as cepas avaliadas apresentaram crescimento quando inoculadas em um meio contendo 2% de ácido acético (Figura 6). Adicionalmente,

todas apresentaram diminuição do crescimento celular conforme o aumento da concentração do ácido acético (Figura 6). As cepas 1, 3, 5, 8 e 12 apresentaram os menores crescimento quando inoculadas em um meio contendo 2% de ácido acético (Figura 6). Em contraste, a cepa 6 apresentou a maior número total de células/mL quando, também, inoculadas em um meio contendo 2% de ácido acético (Figura 6). Quando inoculadas em um meio contendo 6% de ácido acético, todas as cepas apresentaram número total de células maiores do que o dobro da quantidade de células inoculadas inicialmente (Figura 6). A maioria das cepas submetidas a um meio contendo 6% de ácido acético apresentaram melhor tolerância a concentração de ácido acético de 6% do que a 2%; embora as cepas 6, 10 e 11 tenham apresentado menor crescimento quando inoculadas a um meio contendo 6% de ácido acético do que quando inoculadas a um meio contendo 2% ácido acético (Figura 6).

Vale salientar que embora as cepas 6, 10 e 11 tenham apresentado menor desempenho quando inoculadas a um meio contendo 6% do que 2% ácido acético, elas triplicaram a seu número inicial de leveduras inoculadas que indica uma excelente resistência ao ácido (Figura 6). Quando submetidas à concentração de 10% de ácido acético, todas as cepas selecionadas neste estudo apresentaram baixo crescimento, exceto as cepas 9 e 13 que dobraram a suas concentrações iniciais de células (Figura 6). Todas as cepas apresentaram excelente tolerância a ácido acético até concentrações de 6%, isso indica que esta é a concentração máxima que o citoplasma das cepas testadas pode tolerar, mantendo assim sua integridade (Serra et al., 2017).

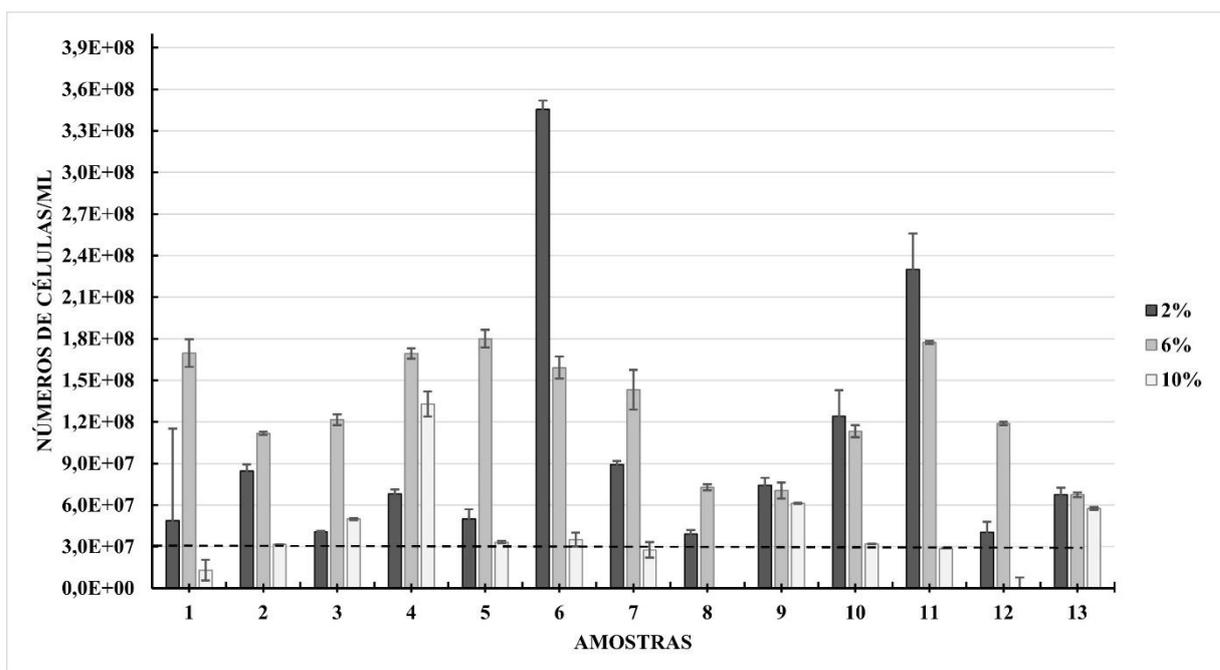


Figura 6: Crescimento das cepas selecionadas de 1 a 13 inoculadas em meio contendo 2, 6 e 10% de ácido acético por 96 horas. Resultados expressos em número total de células/mL).

4.3.5 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) tem um odor muito forte de ovo podre, sendo um componente indesejável em bebidas (Wang et al., 2018). Leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* podem gerar H₂S pela degradação de aminoácidos, principalmente, metionina ou cisteína (Linderholm et al., 2008). As cepas 1, 3, 8, 12 e 13 ao serem observadas, apresentaram colônias pouco pigmentadas, sugerindo que produzem menores quantidades de H₂S (Tabela 5). A cepa 6 apresentou a colônia mais pigmentada, indicando que esta cepa produza uma maior quantidade de H₂S (Tabela 5). Todas as demais cepas incluindo 2, 4, 5, 7, 9, 10 e 11, não produzem sulfeto (Tabela 5).

Tabela 5: Capacidade das leveduras produzirem Sulfeto de Hidrogênio (H₂S), por 10 dias.

| Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S) | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + |

Legenda: (+) produzem sulfeto; (-) não produzem sulfeto.

4.3.6 Assimilação de Fontes de Nitrogênio Específica

O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento e metabolismo das leveduras, as mesmas são capazes de usar uma grande variedade de compostos como fontes de nitrogênio (Barnett et al., 1990). Vale salientar que mostos contém nitrogênio orgânico e nitrogênio inorgânico (Ribeiro-Filho et al., 2021). Geralmente, nitrogênio inorgânico tais como ureia, são utilizados por leveduras em processo de produção de etanol, enquanto são proibidos em produções de bebidas alcoólicas (Ribeiro-Filho, 2020). Fontes de nitrogênio como nitrito e nitrato são utilizados em seleções de leveduras, pois indicam aspectos essencial de sua bioquímica e fisiologia, afetando sua ecologia, metabolismo, e potencial uso em aplicações biotecnológicas (Barnett et al., 1990, Heard e Fleet, 1986). O nitrito de sódio é uma fonte inorgânica de nitrogênio que pode ser assimilada pelas leveduras através da redução do nitrito a amônio, que é catalisado pela enzima nitrito redutase usando a molécula de NADPH como doadora de elétrons (Siegel and Wilkerson, 1989). Todas as cepas testadas cresceram utilizando nitrito de sódio como única fonte de nitrogênio, exceto as cepas 4 (Tabela 6). As leveduras são capazes de assimilar o nitrato pela conversão (intracelular) em amônio por duas reduções sucessivas catalisadas por nitrato redutase e nitrito redutase, uma vez que o nitrato é reduzido a amônio (Siverio, 2002). O amônio é transportado através da membrana plasmática em *Saccharomyces cerevisiae* (Cruz et al. 2001). Todas as amostras foram capazes de crescer em

meio com nitrato de potássio, exceto as amostras 4, 7 e 11, que demonstraram passar por uma situação estressante ao metabolizar o nitrato como fonte única de nitrogênio, evidenciando uma capacidade de assimilação relativamente alta dessa fonte entre as cepas estudadas (Tabela 6). A compreensão da capacidade de utilização de nitritos e nitratos ajuda a esclarecer o papel das leveduras no ciclo do nitrogênio e em ambientes variáveis.

Tabela 6: Capacidade das leveduras crescerem em nitrogênio: Nitrito de Sódio (NaNO₂), Nitrato de Potássio (KNO₃), Lisina (C₆H₁₄N₂O₂), por 10 dias.

| Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| Nitrito de Sódio | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Nitrato de Potássio | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | - | + | + |
| Lisina | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Legenda: (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

Nitrogênio orgânico incluindo aminoácidos, peptídeos, e polipeptídeos são as principais fontes de nitrogênio. A lisina, um aminoácido essencial, é uma fonte orgânica de nitrogênio que requer vias metabólicas específicas (Thomas e Ingledew, 1994). As leveduras do gênero *Saccharomyces* não consegue utilizar a lisina como fonte de nitrogênio, enquanto muitas leveduras *não-Saccharomyces* podem utilizá-la (Heard e Fleet, 1986). Os resultados revelam que todas as cepas isoladas crescerem em meio contendo lisina, exceto a amostra 4 (Tabela 6). Isso sugere que a cepa 4 é uma levedura do gênero *Saccharomyces*, enquanto todas as demais são *não-Saccharomyces*. Portanto, todas as cepas avaliadas, exceto a cepa 4, contém os genes (Aat1, Lys1, Lys2, Lys3 e Lys4) o que influencia a capacidade das leveduras de utilizar a lisina como fonte de nitrogênio (Beckerich et al., 1994, Heard e Fleet, 1986). Vale salientar que esses genes podem variar em diferentes espécies de leveduras e em sua expressão dependendo das condições ambientais e do tipo de meio de cultivo.

4.4 TESTE DE FLOCULAÇÃO

Os principais fatores que contribuem para a floculação de leveduras incluem fatores genéticos (FLO1, FLO2, FLO3, FLO4, FLO5, FLO6 e FLO7, FLO8 e FLO11), ambientais (temperatura, pH, e concentração do mosto - etanol, carboidratos, aminoácidos, minerais e vitaminas) e fisiológico das células (Panteloglou et al., 2012). Estes interagem de maneira complexa, influenciando a eficiência e o momento da floculação durante o processo de

fermentação. Nossos resultados indicam que as cepas 1, 2, 3, 6, 8, 10 e 12 apresentam características de leveduras flocculante devido a formação de grumos ao final da fermentação, característicos da flocculação (Tabela 7, Figura 7). Por outro lado, as cepas 4, 5, 7, 9, 11 e 13 não apresentaram formação de grumos ao final da fermentação, indicando que não são leveduras flocculantes (Tabela 7, Figura 7). Estes resultados indicam que a flocculação se deu por fatores ambientais (temperatura, pH, e concentração do mosto - etanol e carboidratos) que podem ter influenciado nos demais fatores incluindo fisiológico das células e genéticos. Adicionalmente, genes como CYB5 e SFL1 contribuem para a biossíntese de lipídeos e esteróis, e para a flocculação; portanto, a flocculação é controlada por um conjunto de inter-relações, além dos fatores genéticos, sua formação também é condicionada a diferentes condições ambientais (Yoshikawa et al., 2009). A identificação de leveduras flocculantes tem grande importância industrial, pois podem facilitar a clarificação e estabilização microbiológica de bebidas (como as cidras de maçã) sem precisar utilizar equipamentos de filtração (Angioletto, 2013). Adicionalmente, leveduras flocculantes tem sido utilizada em processos de fermentação contínua para produção de etanol, que exclui a necessidade de processos de centrifugação e filtração baixando o custo do processo.

Tabela 7: Capacidade das leveduras formarem floculos após o processo fermentativo.

| Cepas de Leveduras | Floculação |
|--------------------|------------|
| 1 | + |
| 2 | + |
| 3 | + |
| 4 | - |
| 5 | - |
| 6 | + |
| 7 | - |
| 8 | + |
| 9 | - |
| 10 | + |
| 11 | - |
| 12 | + |
| 13 | - |

Legenda: (+) houve flocculação; (-) não houve flocculação.

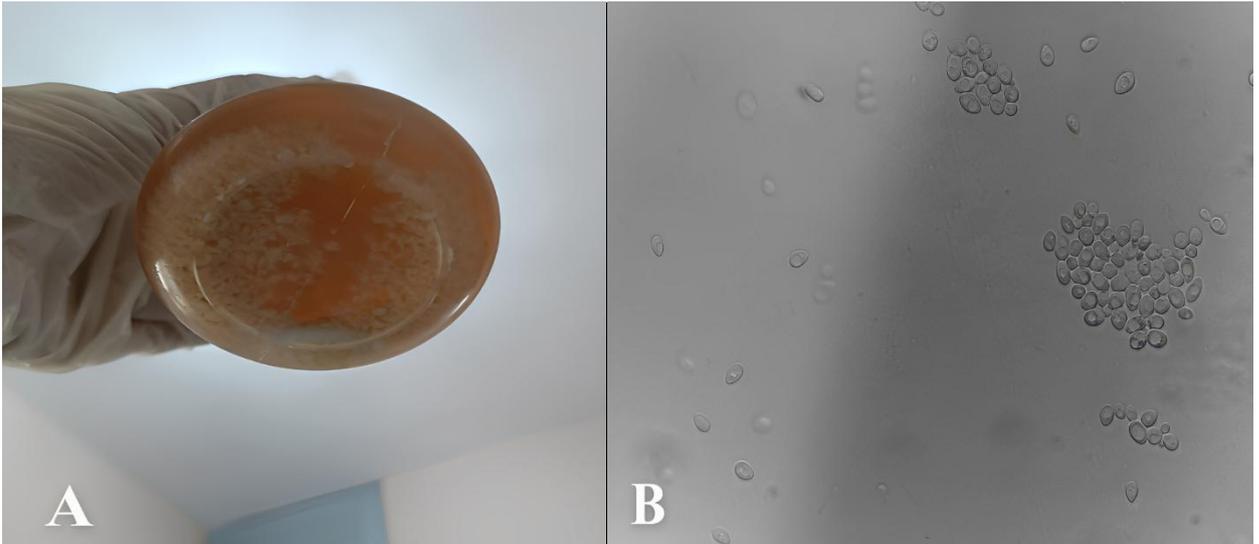


Figura 7: (A) Leveduras com aspecto floculante ao final do processo fermentativo; (B) Leveduras com aspecto floculante visualizada no microscópio (1000x). **Fonte:** Autoral, 2024.

4.4.1 Desempenho Fermentativo das Cepas Isoladas

Treze cepas de leveduras isoladas das unidades produtoras de cachaça foram submetidas a uma avaliação do desempenho fermentativo, revelando variações significativas na capacidade de liberação de CO₂ ao longo de 12 dias, demonstrando a diversidade metabólica entre os isolados (Tabela 8, Figura 8). As diferenças metabólicas entre os vários microrganismos são, via de regra, utilizadas como critérios de classificação (Alves, 1994). A liberação de CO₂ durante a fermentação, é essencial para avaliar a atividade fermentativa, diretamente relacionada à conversão de carboidratos em etanol e outros subprodutos, sendo crucial para determinar a aplicabilidade industrial de cada cepa.

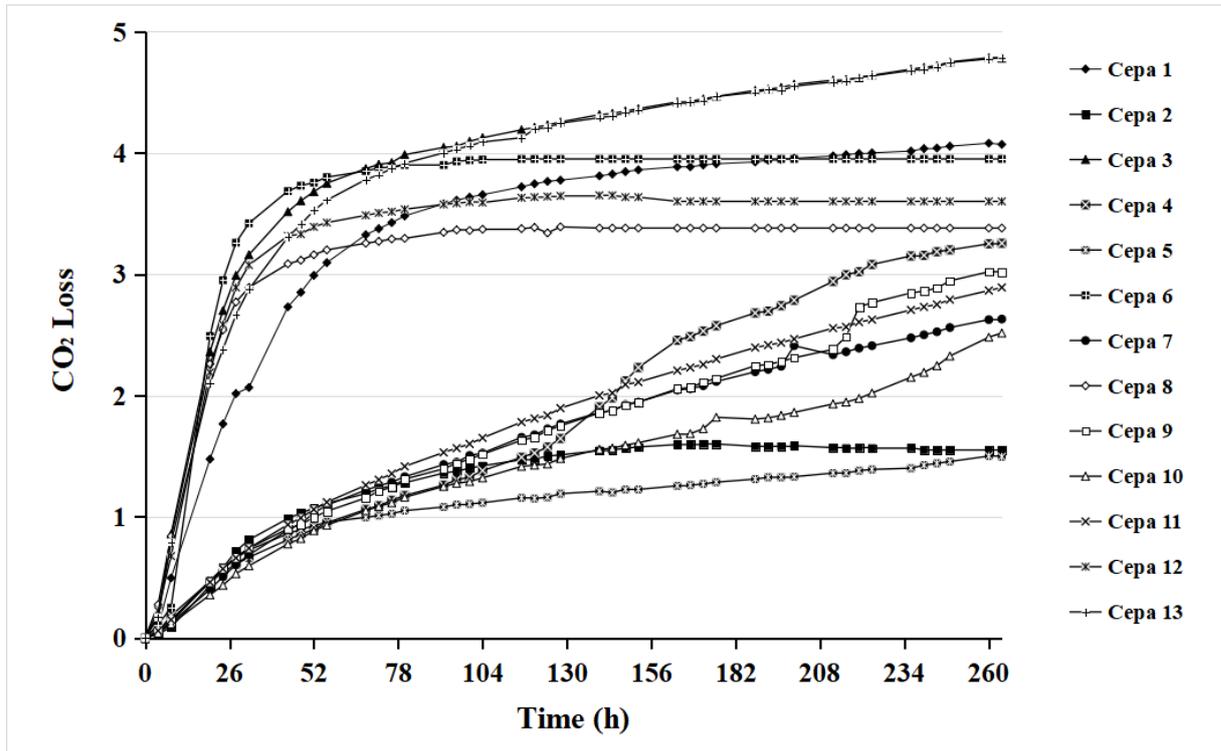


Figura 8: Gráfico comparativo do Desempenho fermentativo de 13 cepas de levedura ao longo de 260 horas, incluindo: Cepa 1, Cepa 2, Cepa 3, Cepa 4, Cepa 5, Cepa 6, Cepa 7, Cepa 8, Cepa 9, Cepa 10, Cepa 11, Cepa 12 e Cepa 13; Tempo (h) e perda de CO₂.

A perda de dióxido de carbono (CO₂ loss) é uma forma eficaz de avaliar a performance de fermentação de leveduras (Maia et al., 2025). Durante os testes de fermentação, as cepas 1, 3, 8, 9, 12 e 13 destacam-se pela rápida perda de dióxido de carbono nas primeiras 24 h, variando de 1,77 g a 2,49 g (Figura 8). As cepas 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11 apresentaram perda de dióxido de carbono menor do que 1 g durante as primeiras 24 h, (Figura 8). A diferença nos comportamentos sugere que algumas cepas possuem sistemas metabólicos mais eficientes ao meio de fermentação, tornando-as promissoras para processos de fermentação rápidos e de alto rendimento. Já as fermentações com o desempenho inicial lento, sugere que as leveduras precisem de um tempo a mais para adaptação. As fermentações utilizando as cepas 1, 3, 6, 8, 12, e 13 encerraram-se a 60 h, enquanto as fermentações utilizando as demais cepas (cepas 2, 4, 5, 7, 9, 10 e 11) se estenderam até 264 h, não chegando à perda total de CO₂ esperada (Figura 8). À medida que a fermentação avança, a perda de dióxido de carbono tende a diminuir; um indicativo de que os nutrientes presentes no mosto estão se esgotando. Vale salientar que fermentações conduzidas utilizando as cepas 2, 4, 7, 9, 10 e 11 apresentaram um aumento da viscosidade do mosto durante a fermentação (Figura 9). Estes resultados podem estar

relacionados a um aumento da formação de glicerol, que funciona como uma camada protetora para as células (Zhang et al., 2011).

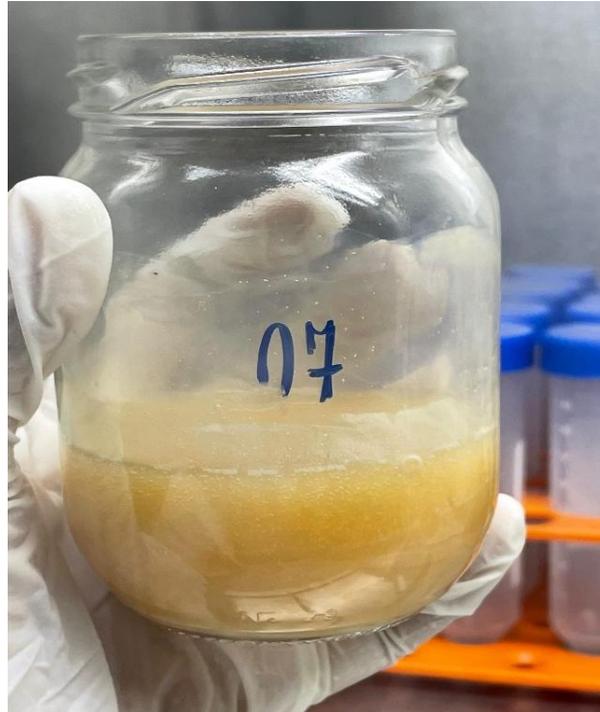


Figura 9: Vinho fermentado com características viscosas.

Fonte: Autoral (2024).

4.5 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular é um parâmetro fundamental para avaliar a capacidade de sobrevivência das células, refletindo diretamente na qualidade e eficiência dos processos fermentativos (Ribeiro-Filho et al., 2021). Entre as leveduras analisadas, as cepas apresentaram viabilidade variando de 40% a 95% (Figura 10). As cepas 1 (91,9%), 2 (82,3%), 9 (85,8%), 10 (83,4%), 11 (82,2%), 12 (86,2%) e 13 (83,4%) destacaram-se com viabilidades superiores a 80%, indicando bom desempenho. As cepas 5, 6 e 8 apresentaram viabilidades entre 60% e 80%, consideradas moderadas. Em contraste, as cepas 3, 4 e 7 apresentaram viabilidades inferiores a 60%, sugerindo baixa qualidade celular e potencial comprometimento da eficiência fermentativa (Figura 10). Apenas a cepa 1 apresentou viabilidade acima de 90% que são valores desejáveis, uma vez que indicam maior resistência celular, performance, qualidade e eficiência do processo e, conseqüentemente, possibilidade de reutilização dos microrganismos em fermentações subsequentes (Lima et al., 2001; Montijo et al., 2014).

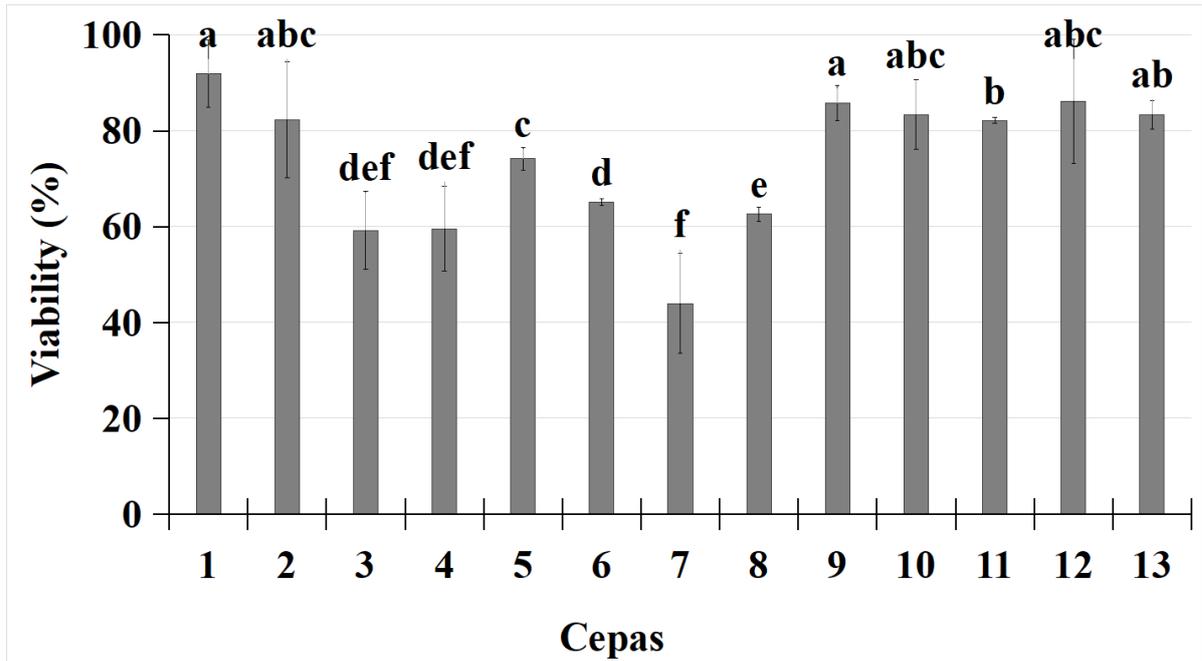


Figura 10: Número de células de leveduras (células/mL) identificadas por cepa isolada. Foi realizada a contagem total de células totais/mL usando uma câmera de Neubauer. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, o teste post hoc e Tukey foi usado para identificar diferenças significativas e é apresentado como letras minúsculas. Letras diferentes indicam diferenças significativas na viabilidade dentro de uma espécie ($p < 0,05$).

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO SINTÉTICO FERMENTADO

A fermentação é um processo biológico fundamental para a produção de diversas bebidas e produtos alimentícios. As leveduras são utilizadas em processos fermentativos por serem responsáveis pela conversão dos carboidratos em etanol e dióxido de carbono (CO₂). As análises físico-químicas do mosto fermentado ajudam a entender a eficiência da fermentação sob influência das treze cepas de leveduras isoladamente, possibilitando otimizações para a produção de bebidas de maior qualidade.

Tabela 8: Resultados das Análises Físico-químicas do Mosto sintético fermentado.

| Cepas de Leveduras | AT | TA | ET | CO ₂ |
|--------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 7,7±0,6 ^b | 6±2 ^a | 4,6±0,9 ^c | 4,1±0,0 ^b |
| 2 | 38±16 ^a | 1,2±0,9 ^{cd} | 137±116 ^a | 1,6±0,2 ^e |
| 3 | 6±0 ^c | 4±1 ^a | 21±8 ^a | 4,8±0,6 ^a |
| 4 | 2,9±0,6 ^a | 4,3±0,5 ^a | 21±3 ^a | 3,3±0,5 ^d |
| 5 | 1±0 ^f | 1,1±0,1 ^d | 104±22 ^a | 1,5±0,2 ^e |
| 6 | 5,4±0,4 ^c | 3,8±0,2 ^{ab} | 28±3 ^a | 4,0±0,2 ^{ab} |
| 7 | 3,7±0,8 ^d | 2,1±0,1 ^c | 112±16 ^a | 2,6±0,3 ^{de} |
| 8 | 4±1 ^{cd} | 4±1 ^{ab} | 24±9 ^a | 3,4±0,0 ^d |
| 9 | 2,7±0,6 ^d | 3,1±0,4 ^b | 22±1 ^a | 3,0±0,6 ^d |
| 10 | 3,2±0,2 ^d | 3,9±0,8 ^{ab} | 32±4 ^a | 2,5±0,6 ^d |
| 11 | 2,8±0,4 ^d | 3,8±0,3 ^{ab} | 26±1 ^a | 2,9±0,4 ^d |
| 12 | 6±1 ^c | 3,3±0,4 ^{ab} | 30±6 ^a | 3,6±0,0 ^c |
| 13 | 2±0 ^e | 4,7±0,4 ^a | 19,7±0,4 ^b | 4,8±0,5 ^a |

Legenda: AT – Acidez Total (mg/100mL Ac. Acético), AF - Acidez Fixa (mg/100mL Ac. Acético), AV – Acidez Volátil (mg/100mL Ác. Anidro), TA – Teor Alcoólico (°GL), ET – Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mL Ác. Anidro); perca de CO₂ função do tempo (h).

A acidez total (AT) desempenha um papel fundamental na fermentação, atuando como um importante parâmetro para a qualidade e a estabilidade do processo; sendo composta por acidez volátil (AV) e acidez fixa (AF). AV é composta majoritariamente por ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como o ácido acético, que são formados durante a fermentação alcoólica. AF corresponde à soma dos ácidos orgânicos não voláteis presentes no meio fermentativo, como o ácido málico, ácido cítrico e ácido succínico. Os resultados revelam que as amostras obtiveram uma variação de AT de 1,3 a 38,3 ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). A cepa 2 gerou as maiores concentrações de AT (38,3 mg ác. Acético/100mL); enquanto, a cepa 5 (1,3 mg ác. acético/100mL) gerou as menores concentração de AT ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). A manutenção de níveis adequados de acidez auxilia no controle microbiológico do meio, inibindo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis e favorecendo o crescimento das leveduras desejadas (Maia et al., 2025). Além disso, a acidez influencia diretamente o metabolismo fermentativo, impactando a produção de etanol, ácidos orgânicos e compostos voláteis responsáveis pelas características sensoriais do produto final (Ribeiro-Filho et al., 2021). Níveis apropriados de acidez também contribuem para a estabilidade microbiológica e sensorial dos produtos fermentados durante o armazenamento (Felizardo et al, 2023).

Alterações nos valores de acidez total podem indicar estresse celular ou contaminações, sendo, portanto, um indicador relevante da performance e da eficiência do processo fermentativo (Ribeiro-Filho et al., 2022, Ribeiro-Filho et al., 2021, Rosa et al., 2009).

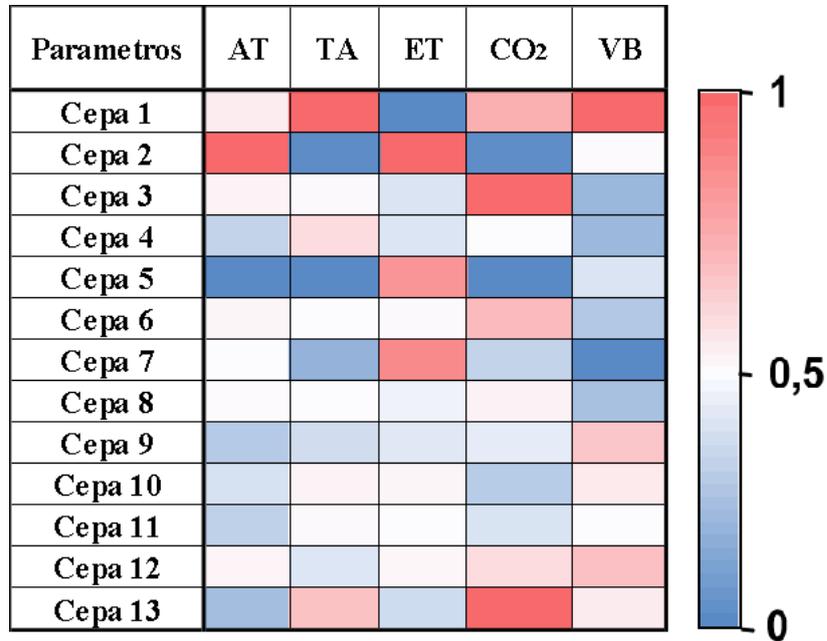


Figura 11: Mapa de calor (heatmap) das Análises físico-químicas do mosto sintético fermentado (Acidez total - AT (mg/100mL ác. acético), TA – Teor Alcoólico (°GL - 20°C), ET - Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mLA. Anidro), CO2 - Perda de dióxido de carbono (g CO2 loss/L)).

O teor alcoólico é um parâmetro que ajuda a definir as possíveis aplicações industriais das cepas de leveduras. A concentração alcoólica presente no vinho sintético, após a fermentação, reflete a eficácia do processo (Silva, 2024). As leveduras analisadas apresentaram Teor Alcoólico (TA) variando de 1,1 a 6 (Tabela 8). As cepas 1 (6°GL), 13 (4,4°GL), 4 (4,3°GL), 3 (4°GL) geraram os maiores TA; enquanto as cepas 5 (1,1 °GL) e 2 (1,2 °GL) geraram os menores TA ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). Todas as cepas geraram etanol, biomassa e CO2 indicando que são leveduras efeito Crabtree positivo que está relacionada a produzem etanol na presença de altas concentrações de glicose alta, mesmo com oxigênio (Pfeiffer e Morley 2014). A alta geração de álcool está relacionada ao consumo de eficiente de carboidratos atribuída a uma fermentação eficiente (Malina et al., 2021). Por outro lado, as baixas formações alcoólicas indicam uma baixa eficiência no consumo de carboidratos indicando que estas leveduras sejam efeito ‘Crabtree de longo prazo’ (Long-term Crabtree effect), que se caracterizam pela adaptação genética e metabólica que persiste até a célula reprogramam seu metabolismo geneticamente para favorecer fermentação mesmo em condições de oxigenação (Pfeiffer e Morley 2014). O efeito Crabtree descreve a preferência de

leveduras por fermentação alcoólica mesmo na presença de oxigênio e alta glicose, sendo classificado de acordo com a geração ou não de etanol (Efeito Crabtree Positivo ou egativo) e pela velocidade de adaptação as concentrações de carboidratos efeito (Crabtree de longo prazo ou Crabtree de curto prazo) (Malina et al., 2021, Pfeiffer e Morley 2014). No efeito positivo, ocorre inibição da respiração; no negativo, prevalece a respiração. O efeito de curto prazo é o início da fermentação imediato, enquanto o de longo prazo envolve adaptações metabólicas contínuas que geram um prolongamento da fase lag (período de adaptação das leveduras).

Durante a fermentação alcoólica, além da geração de etanol, biomassa e dióxido de carbono que indicam ser as leveduras efeito Crabtree positivas, compostos secundários tais como ésteres, cetonas, aldeídos, alcoóis superiores e ácidos orgânicos, são gerados (Boulton e Quain, 2001). Durante a fermentação, leveduras geram ésteres que conferem aromas frutados e florais, sendo importantes para equilibrar o perfil sensorial, agregando complexidade e valor comercial aos alimentos e bebidas (He Yang et al., 2023). As leveduras selecionadas dos engenhos de cachaça apresentaram variação na sua geração de ésteres totais (ET) de 4,6 e 136,5 mg de acetato de etila/100mL ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). As cepas 2 (136,50 mg ac. etila/100mL), 7 (111,89 mg ac. etila/100mL) e 5 (103,84 mg ac. etila/100mL) geraram as maiores concentrações de ET; por outro lado, a cepa 1 (4,6 mg ac. etila/100mL) gerou a menor concentração de ET ($p < 0,05$) (Tabela 7/Figura 36). Durante a fermentação, a formação de ésteres está relacionada a reação do Acetil-CoA com alcoóis ou ácidos graxos (Ribeiro-Filho et al., 2021). As distintas concentrações de ésteres observadas neste estudo é um indicativo que as leveduras selecionadas são geneticamente diferentes.

A perda de CO₂ é um parâmetro importante para avaliar a atividade fermentativa das cepas de leveduras, indicando a conversão dos açúcares em etanol. Os resultados revelam que as amostras obtiveram uma variação de perda de dióxido de carbono (CO₂) de 1,5 a 4,8 g de CO₂/100 mL ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). As cepas 1 (4,1 g de CO₂/100 mL), 3 (4,8 g de CO₂/100 mL) e 13 (4,8 g de CO₂/100 mL) geraram as maiores formações de CO₂; por outro lado, as cepas 2 (1,6 g de CO₂/100 mL) e 5 (1,5 g de CO₂/100 mL) geraram as menores formações de CO₂ ($p < 0,05$) (Tabela 8, Figura 11). A alta geração de CO₂ é um indicativo do consumo eficiente de carboidratos atribuída a uma fermentação eficiente, sendo um indicativo que as leveduras testadas são ‘efeito crabtree de curto prazo’ (Malina et al. 2021; Pfeiffer e Morley, 2014). Por outro lado, as baixas formações de CO₂ indicam uma baixa eficiência no consumo de carboidratos que, assim como, a formação de etanol, é um indicativo

de que as leveduras testadas sejam ‘efeito Crabtree de longo prazo’ (Long-term Crabtree effect) (Pfeiffer e Morley, 2014).

4.6.1 Avaliação cinética das leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça

Os parâmetros cinéticos de fermentação são essenciais para a compreensão dos processos fermentativos. As cepas 1 ($\mu=0,06 \text{ h}^{-1}$), 3 ($\mu=0,07 \text{ h}^{-1}$), 5 ($\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$), 12 ($\mu=0,06 \text{ h}^{-1}$) e 13 ($\mu=0,07 \text{ h}^{-1}$) apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento microbiano, que resultaram nas maiores velocidades específicas de consumo de substrato (q_s) $0,56 \text{ h}^{-1}$, $0,48 \text{ h}^{-1}$, $0,40 \text{ h}^{-1}$, $0,38 \text{ h}^{-1}$, e $0,52 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Tabela 9). Por outro lado, a cepa 5 apresentou a menor velocidade específica de crescimento microbiano ($\mu=0,01 \text{ h}^{-1}$) que resultou em maior tempo de duplicação ($t_d=46,7 \text{ h}$) e baixa velocidade específica de consumo de substrato ($q_s= 0,03 \text{ h}^{-1}$) (Tabela 9). Quando observada a formação de etanol, a cepa 1 ($0,33 \text{ h}^{-1}$) apresentou a maior velocidade específica de formação de etanol, enquanto as cepas 2 ($0,01 \text{ h}^{-1}$) e 5 ($0,01 \text{ h}^{-1}$) apresentaram as menores velocidades de formação de etanol (Tabela 9). Quando observada a geração de CO_2 , as cepas 3 ($0,27 \text{ h}^{-1}$) e 13 ($0,27 \text{ h}^{-1}$) apresentaram as maiores velocidades de geração de dióxido de carbono; enquanto as cepas 2 ($0,02 \text{ h}^{-1}$) e 5 ($0,02 \text{ h}^{-1}$) apresentaram as menores velocidades de geração de dióxido de carbono (Tabela 9).

Industrialmente, rendimentos de fermentação são parâmetros importantes para tomada de decisão do processo. Y_p/s revela a quantidade de produto gerado por grama de substrato consumido e Y_{CO_2}/s revela a quantidade de CO_2 gerado por grama de substrato consumido. As cepas 1 ($0,60 \text{ g de etanol/g de açúcares totais}$) e 10 ($0,61 \text{ g de etanol/g de açúcares totais}$) convertem as maiores quantidade de substrato em etanol e, conseqüentemente, estas cepas apresentaram menores conversões do substrato em CO_2 ($0,40 \text{ g de CO}_2/\text{g de açúcares totais}$) (Tabela 9). Por outro lado, as cepas 2 ($0,43 \text{ g de etanol/g de açúcares totais}$) e 5 ($0,42 \text{ g de etanol/g de açúcares totais}$) apresentaram as menores conversões de substrato em etanol e, conseqüentemente, estas cepas apresentaram as maiores conversões do substrato em CO_2 ($0,57$ e $0,58 \text{ g de CO}_2/\text{g de açúcares totais}$, respectivamente) (Tabela 9). $Y_{\text{CO}_2}/\text{EtOH}$ indica a relação de formação de gramas de dióxido de carbono por gramas de etanol gerado. As cepas as cepas 2 ($1,35 \text{ g de CO}_2/\text{g de etanol}$) e 5 ($1,36 \text{ g de CO}_2/\text{g de etanol}$) apresentaram as maiores relação de CO_2 gerado por etanol produzido, confirmando que estas cepas tem potencial de produzir mais dióxido de carbono do que etanol (Tabela 9). Em contraste, as cepas 1 ($0,68 \text{ g de CO}_2/\text{g}$

de etanol) e 10 (0,65 g de CO₂/g de etanol) apresentaram as menores relação de CO₂ gerado por etanol produzido, confirmando que estas cepas tem potencial de utilizar os carbonos disponíveis no substrato para gerar altas concentrações de etanol reduzindo a geração de CO₂ (Tabela 9).

Tabela 9: Parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça.

| Cepas | μ | td | q_s | q_p | q_{CO_2} | $Y_{p/s}$ | $Y_{p/x}$ | $Y_{x/s}$ | $Y_{CO_2/EtOH}$ | $Y_{CO_2/s}$ | $Y_{CO_2/x}$ |
|-------|-------|------|-------|-------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|--------------|--------------|
| 1 | 0,06 | 11,3 | 0,56 | 0,33 | 0,23 | 0,60 | 5,4 | 0,11 | 0,68 | 0,40 | 3,7 |
| 2 | 0,02 | 44,6 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,43 | 0,9 | 0,46 | 1,35 | 0,57 | 1,3 |
| 3 | 0,07 | 10,5 | 0,48 | 0,21 | 0,27 | 0,44 | 3,2 | 0,14 | 1,26 | 0,56 | 4,0 |
| 4 | 0,02 | 42,5 | 0,09 | 0,05 | 0,04 | 0,57 | 3,3 | 0,17 | 0,77 | 0,43 | 2,5 |
| 5 | 0,01 | 46,7 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,42 | 0,9 | 0,45 | 1,36 | 0,58 | 1,3 |
| 6 | 0,06 | 11,3 | 0,43 | 0,21 | 0,22 | 0,49 | 3,4 | 0,14 | 1,05 | 0,51 | 3,6 |
| 7 | 0,02 | 36,7 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,44 | 1,4 | 0,32 | 1,28 | 0,56 | 1,8 |
| 8 | 0,08 | 9,2 | 0,40 | 0,21 | 0,19 | 0,53 | 2,8 | 0,19 | 0,90 | 0,47 | 2,5 |
| 9 | 0,02 | 39,3 | 0,08 | 0,04 | 0,04 | 0,50 | 2,2 | 0,23 | 0,99 | 0,50 | 2,2 |
| 10 | 0,02 | 46,1 | 0,08 | 0,05 | 0,03 | 0,61 | 3,3 | 0,19 | 0,65 | 0,40 | 2,1 |
| 11 | 0,02 | 29,5 | 0,08 | 0,05 | 0,04 | 0,57 | 2,0 | 0,28 | 0,76 | 0,43 | 1,5 |
| 12 | 0,06 | 11,2 | 0,38 | 0,18 | 0,20 | 0,47 | 2,9 | 0,16 | 1,11 | 0,53 | 3,2 |
| 13 | 0,07 | 10 | 0,52 | 0,26 | 0,27 | 0,49 | 3,7 | 0,13 | 1,03 | 0,51 | 3,8 |

Legenda: μ - velocidade específica de crescimento microbiano (h^{-1}), td - tempo de duplicação celular (h), q_s - velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1}), q_p - velocidade específica de formação de etanol (h^{-1}), Y - rendimento ($Y_{p/s}$ (g de etanol/g de açúcares totais), $Y_{p/x}$ (g de etanol/g de células), $Y_{x/s}$ (g de células/g de açúcares totais), $Y_{CO_2/EtOH}$ (g de CO₂/g de etanol), $Y_{CO_2/s}$ (g de CO₂/g de substrato), $Y_{CO_2/x}$ (g de CO₂/g de células)).

Os parâmetros de rendimento relacionado a geração de leveduras tais como $Y_{p/x}$ (rendimento de geração de etanol pela quantidade de leveduras geradas) e $Y_{CO_2/x}$ (rendimento de geração de CO₂ pela quantidade de leveduras geradas), são importantes para compreender a relação geração de leveduras com a formação de etanol e dióxido de carbono, respectivamente. A cepa 1 (5,4 g de etanol/g de células) apresentou a maior geração de etanol por grama de célula de levedura, em contraste, as cepas 2 e 5 apresentaram as menores concentrações de etanol por grama de célula de levedura gerada (0,9 g de etanol/g de células) (Tabela 9). Quando observado o rendimento de geração de CO₂ pela quantidade de leveduras geradas, as cepas 1 (3,7 g de CO₂/g de células) e 3 (4 g de CO₂/g de células) apresentaram os maiores valores, enquanto as cepas 1 e 5 apresentaram os menores rendimento de geração de CO₂ pela quantidade de

leveduras geradas ($Y_{CO_2/x} = 1,3$ g de CO_2 /g de células). Todos os resultados cinéticos indicam que as leveduras selecionadas das produções de cachaça são leveduras ‘efeito Crabtree positivo’, pois geram etanol, dióxido de carbono e biomassa (leveduras); embora todas apresentem quantidades diferentes dos materiais citados.

As produtividades celular, de etanol e de CO_2 variaram conforme a cepa de levedura utilizada. A cepa 8 exibiu maior produtividade celular (0,23 g/L·h), enquanto a cepa 5 foi a menos eficiente (0,04 g/L·h) (Tabela 10). A maior produtividade de etanol foi observada na cepa 1 (1,0 g/L·h) e as menores nas cepas 2 e 5 (0,04 g/L·h) (Tabela 10). Para CO_2 , as cepas 3 e 13 apresentaram maiores produtividades (0,8 g/L·h), destacando diferenças metabólicas entre as cepas (Tabela 10). Esses resultados destacam a importância da seleção de cepas com alta produtividade para otimizar o desempenho fermentativo, melhorar a eficiência industrial e garantir a consistência na produção de etanol e outros metabólitos de interesse.

Tabela 10: Produtividade resultante das fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça.

| Cepas | P_x | P_p | P_{CO_2} |
|-------|-------|-------|------------|
| 1 | 0,18 | 1,00 | 0,68 |
| 2 | 0,05 | 0,04 | 0,06 |
| 3 | 0,20 | 0,63 | 0,80 |
| 4 | 0,05 | 0,16 | 0,12 |
| 5 | 0,04 | 0,04 | 0,06 |
| 6 | 0,18 | 0,63 | 0,66 |
| 7 | 0,06 | 0,08 | 0,10 |
| 8 | 0,23 | 0,63 | 0,56 |
| 9 | 0,05 | 0,12 | 0,11 |
| 10 | 0,05 | 0,15 | 0,10 |
| 11 | 0,07 | 0,14 | 0,11 |
| 12 | 0,19 | 0,54 | 0,60 |
| 13 | 0,21 | 0,78 | 0,80 |

Legenda: P_x - produtividade celular (g/h), P_p - produtividade de etanol (g/h), P_{CO_2} - produtividade de CO_2 (g/h)

4.6.2 Análise dos Componentes Principais (PCA) do Vinho Fermentado

A Análise de Componentes Principais (PCA) se trata de uma técnica multivariada, utilizada para resumir todas as distinções e similaridades entre as análises realizadas no mosto sintético fermentado, entre as treze cepas de leveduras isoladas provenientes das unidades produtoras de cachaça (Figura 12). A PC1 e PC2 respondem a 48% e 20% da variância total, respectivamente, resultando em uma variância combinada de 68% (Figura 12). A PC1 separou as cepas 1, 3, 4, 6, 8, 12 e 13 das cepas 2, 5, 7, 9, 10 e 11 (Figura 12). A PC2 separou as cepas 1, 4, 9, 10 e 11 das cepas 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12 e 13 (Figura 12). As cepas 3, 6, 8, 12 e 13 tem potencial de maior geração de CO₂ com alta velocidade de geração de CO₂ e consumo de substrato (Figura 12). A cepa 1 gerou tem potencial de maior geração de etanol, resultando em alta produtividade em etanol; e alto rendimento em conversão de açúcares em etanol (Yp/s) e alto rendimento em geração de etanol por leveduras geradas devido à alta velocidade específica de geração de etanol (Figura 12). As cepas 2, 5 e 7 tem potencial de gerar maiores concentrações de acidez e ésteres, além de apresentarem os maiores rendimento de CO₂ por substrato consumido e por etanol produzido (Figura 12). As cepas 4, 9, 10 e 11 maiores valores de viabilidade celular, produtividade celular e tempo de duplicação (Figura 12).

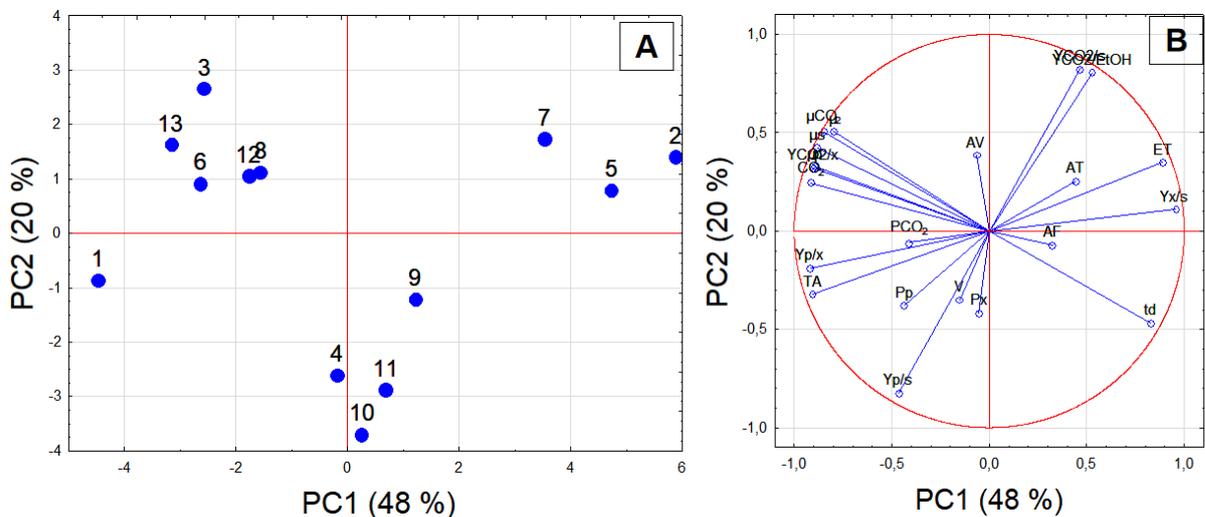


Figura 12: (A) PCA score plot demonstrando variação no parâmetros físico-químicos e cinéticos fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça; (B) PCA loading plot demonstrando variação no parâmetros físico-químicos e cinéticos fermentações conduzidas em mosto a 15°Brix usando, individualmente, as treze leveduras selecionadas dos engenhos produtores de cachaça. As cepas estão enumeradas de 1 a 13. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram Acidez total – AT (mg/100mL ác. acético), Acidez Volátil – AV (mg/100mL A.A), Acidez Fixa - AF (mg/100mL ác. Acético), TA – Teor Alcoólico (°GL), ET - Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mLA. Anidro), Viabilidade Celular (%), CO₂; e os parâmetros cinéticos foram μ - velocidade específica de crescimento microbiano (h⁻¹), td - tempo de duplicação celular (h), qs - velocidade específica de consumo de substrato (h⁻¹), qp - velocidade específica de formação de etanol (h⁻¹), Y - rendimento (Yp/s (g de etanol/g de açúcares totais), Yp/x (g de etanol/g de células), Yx/s (g de células/g de açúcares totais), YCO₂/EtOH (g de CO₂/g de etanol), YCO₂/s (g de CO₂/g de substrato), YCO₂/x (g de CO₂/g de células)).

Tabela 11: Tabela de Person para parâmetros físico-químicos e cinéticos.

| Variáveis | AT | AF | AV | TA | ET | CO ₂ | V | μ | td | qs | qp | qCO ₂ | Yp/s | Yp/x | Yx/s | YCO ₂ /EtOH | YCO ₂ /s | YCO ₂ /x | P _x | P _p | PCO ₂ | |
|------------------------|-------------|-------|-------|--------------|--------------|-----------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|---------------------|---------------------|----------------|----------------|------------------|--|
| AT | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AF | 0,81 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AV | -0,21 | 0,00 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TA | -0,41 | -0,25 | -0,21 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ET | 0,58 | 0,31 | 0,10 | -0,89 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CO ₂ | -0,38 | -0,35 | 0,04 | 0,77 | -0,76 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V | 0,19 | 0,23 | -0,40 | 0,24 | -0,25 | -0,03 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| μ | -0,13 | -0,16 | 0,27 | 0,56 | -0,54 | 0,81 | -0,01 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| td | 0,20 | 0,22 | -0,33 | -0,59 | 0,58 | -0,84 | -0,02 | -0,96 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| qs | -0,18 | -0,26 | 0,14 | 0,68 | -0,60 | 0,87 | 0,11 | 0,94 | -0,95 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| qp | -0,18 | -0,25 | 0,10 | 0,75 | -0,63 | 0,84 | 0,17 | 0,91 | -0,92 | 0,99 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| qCO ₂ | -0,17 | -0,27 | 0,17 | 0,60 | -0,57 | 0,89 | 0,06 | 0,95 | -0,95 | 0,99 | 0,95 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| Yp/s | -0,31 | 0,01 | -0,31 | 0,74 | -0,65 | 0,19 | 0,33 | 0,01 | -0,03 | 0,10 | 0,21 | -0,02 | 1,00 | | | | | | | | | |
| Yp/x | -0,32 | -0,22 | -0,13 | 0,95 | -0,81 | 0,77 | 0,25 | 0,62 | -0,62 | 0,77 | 0,82 | 0,69 | 0,63 | 1,00 | | | | | | | | |
| Yx/s | 0,49 | 0,27 | -0,09 | -0,89 | 0,90 | -0,89 | -0,06 | -0,69 | 0,70 | -0,75 | -0,76 | -0,73 | -0,52 | -0,90 | 1,00 | | | | | | | |
| YCO ₂ /EtOH | 0,37 | 0,03 | 0,27 | -0,78 | 0,72 | -0,26 | -0,34 | -0,07 | 0,09 | -0,15 | -0,25 | -0,04 | -0,99 | -0,66 | 0,58 | 1,00 | | | | | | |
| YCO ₂ /s | 0,31 | -0,01 | 0,31 | -0,74 | 0,65 | -0,19 | -0,33 | -0,01 | 0,03 | -0,10 | -0,21 | 0,02 | -1,00 | -0,63 | 0,52 | 0,99 | 1,00 | | | | | |
| YCO ₂ /x | -0,27 | -0,29 | 0,09 | 0,72 | -0,68 | 0,94 | 0,03 | 0,83 | -0,83 | 0,92 | 0,89 | 0,93 | 0,11 | 0,82 | -0,86 | -0,17 | -0,11 | 1,00 | | | | |
| P _x | -0,35 | -0,10 | 0,27 | -0,02 | -0,27 | -0,05 | 0,10 | -0,23 | 0,09 | -0,21 | -0,25 | -0,16 | 0,15 | -0,08 | -0,10 | -0,18 | -0,15 | -0,07 | 1,00 | | | |
| P _p | -0,34 | -0,02 | 0,29 | 0,34 | -0,54 | 0,31 | 0,07 | 0,10 | -0,20 | 0,15 | 0,12 | 0,17 | 0,34 | 0,35 | -0,52 | -0,38 | -0,34 | 0,34 | 0,86 | 1,00 | | |
| PCO ₂ | -0,28 | -0,07 | 0,45 | 0,19 | -0,43 | 0,36 | -0,01 | 0,23 | -0,33 | 0,25 | 0,18 | 0,31 | 0,03 | 0,24 | -0,46 | -0,08 | -0,03 | 0,43 | 0,82 | 0,94 | 1,00 | |

Legenda: Os parâmetros físico-químicos avaliados foram Acidez total – AT (mg/100mL ác. acético), Acidez Volátil – AV (mg/100mL A.A), Acidez Fixa - AF (mg/100mL ác. Acético), TA – Teor Alcoólico (°GL), ET – Ésteres Totais (mg Ac. Etila/100mL a.a), Viabilidade Celular (%), CO₂.; e os parâmetros cinéticos foram μ - velocidade específica de crescimento microbiano (h⁻¹), td - tempo de duplicação celular (h), qs - velocidade específica de consumo de substrato (h⁻¹), qp - velocidade específica de formação de etanol (h⁻¹), Y - rendimento (Yp/s (g de etanol/g de AT), Yp/x (g de etanol/g de células), Yx/s (g de células/g de açúcares totais), YCO₂/EtOH (g de CO₂/g de etanol), YCO₂/s (g de CO₂/g de açúcares totais), YCO₂/x (g de CO₂/g de células), P_x - produtividade celular (g/h), P_p - produtividade de etanol (g/h), P_{CO₂} - produtividade de CO₂ (g/h)).

O teor alcoólico (TA) apresentou correlações positivas com a produção de CO₂, velocidade específica de consumo de substrato (q_s), velocidade específica de produção de etanol (q_p), rendimento em produto por substrato (Y_{p/s}), rendimento em produto por biomassa (Y_{p/x}) e rendimento de CO₂ por biomassa (YCO_{2/x}) (Figura 13). Esses resultados indicam que o aumento na produção de etanol está diretamente associado a uma maior atividade metabólica e eficiência fermentativa das leveduras. Em contrapartida, o TA apresentou correlações negativas com a produção de ésteres totais (ET), rendimento de biomassa por substrato (Y_{x/s}), rendimento de CO₂ por etanol (YCO₂/EtOH) e rendimento de CO₂ por substrato (YCO_{2/s}), sugerindo que, sob condições de alta produção alcoólica, a alocação metabólica favorece a produção de etanol em detrimento da biomassa e de metabólitos secundários. A geração de CO₂ apresentou correlações positivas com a taxa específica de crescimento (μ), q_s, q_p, velocidade específica de produção de CO₂ (qCO₂) e YCO_{2/x}, reforçando a ligação entre alta atividade metabólica e a liberação de CO₂ durante a fermentação. Em contraste, foram observadas correlações negativas entre a geração de CO₂ e o tempo de duplicação celular (t_d) e Y_{x/s}, indicando que, quanto maior a atividade fermentativa, menor a formação de biomassa relativa e mais rápido o crescimento celular.

Os ésteres totais (ET) mostraram correlação positiva com Y_{x/s}, YCO₂/EtOH e YCO_{2/s}, indicando que maior formação de biomassa e maior fluxo de carbono para CO₂ estão associados ao metabolismo secundário e à síntese de compostos aromáticos. Por outro lado, os ésteres apresentaram correlação negativa com CO₂, Y_{p/s}, Y_{p/x} e YCO_{2/x}, sugerindo que o desvio do metabolismo primário para a produção de ésteres reduz a eficiência da produção de etanol e a conversão de substrato em produto (Figura 13). Essas correlações refletem os complexos balanços metabólicos em sistemas fermentativos, evidenciando como a distribuição do carbono entre crescimento celular, produção alcoólica e síntese de metabólitos secundários influencia a eficiência e o perfil aromático do processo.

4.7 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO (HCA)

A Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foi utilizada para avaliar treze cepas de leveduras isoladas de unidades produtoras de cachaça, com base em parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Aplicando o índice de Gower, que permite a comparação de dados mistos (quantitativos e qualitativos), foi possível identificar padrões de similaridade entre as amostras e formar quatro grupos distintos (Gower, 1971). A proximidade entre as cepas

indica maior similaridade metabólica e fenotípica. O primeiro grupo, composto pelas cepas 4, 7 e 11, demonstrou boa capacidade de metabolização de carbono e crescimento em etanol, mas apresentou variações no crescimento em ácido acético e viabilidade celular (Figura 40). O segundo grupo, formado pelas cepas 2 e 5, revelou contrastes acentuados: a cepa 2 mostrou elevada acidez total, enquanto a cepa 5 teve acidez reduzida e baixo crescimento em condições de estresse por ácido acético (Figura 14). No terceiro grupo, as cepas 1, 3, 6, 8 e 12 compartilharam características como capacidade moderada de crescimento em ácido acético e variações na produção de CO₂, acidez volátil e viabilidade celular (Figura 14). Finalmente, o quarto grupo reuniu as cepas 9, 10 e 13, que metabolizam amplamente fontes de carbono e nitrogênio, mas diferem quanto à tolerância térmica, capacidade de crescimento em etanol e teor alcoólico (Figura 14).

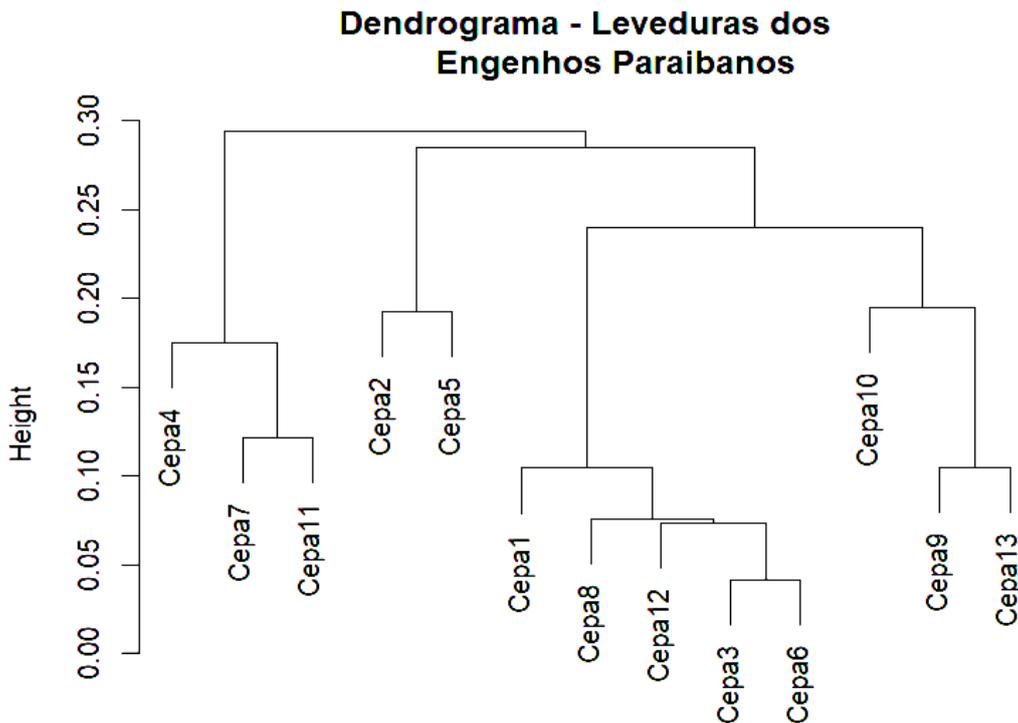


Figura 13: Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) baseado no índice de dissimilaridade de Gower, mostrando a semelhança entre as cepas de leveduras isoladas das treze unidades produtoras de cachaça.

As diferenças observadas entre cepas dentro do mesmo grupo são esperadas devido à influência de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Bisson, 2012). A diversidade genômica reflete a variabilidade na localização de genes responsáveis pelo metabolismo fermentativo e resistência a estresses, mesmo entre linhagens da mesma espécie. Assim, o uso

do índice de Gower foi fundamental para capturar essas nuances, proporcionando uma análise multivariada robusta (Gower, 1966; Gower, 1970). Além disso, a capacidade ou incapacidade de metabolizar certos compostos, como lisina, nitrato ou nitrito pode indicar se a levedura pertence ao gênero *Saccharomyces* ou a gêneros *não-Saccharomyces*, ampliando o entendimento da diversidade funcional observada (Beuchat, 1993). Esses resultados são relevantes para a seleção de leveduras com características desejáveis para processos fermentativos específicos, destacando o potencial de aplicação industrial de isolados nativos em condições de estresse e otimização de características organolépticas em produtos fermentados, como a cachaça.

Apesar dos avanços alcançados neste estudo, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas, especialmente a ausência de análises complementares para a caracterização molecular das leveduras avaliadas. A identificação baseada em métodos clássicos, sem o suporte de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou o sequenciamento de DNA, restringe a precisão na determinação do gênero e da espécie das cepas. Essa limitação impede uma compreensão mais refinada das bases genéticas que sustentam os comportamentos metabólicos observados, dificultando a correlação direta entre características fenotípicas e perfis genotípicos. A caracterização molecular permitiria não apenas validar as diferenças metabólicas identificadas, mas também identificar possíveis linhagens novas ou variantes regionais, ampliando o entendimento da biodiversidade associada às unidades produtoras de cachaça. Assim, embora os resultados obtidos ofereçam informações relevantes sobre o desempenho fermentativo das cepas, a ausência de dados genéticos limita a abrangência das conclusões. Nesse sentido, os achados apresentados constituem uma base valiosa para a continuidade das investigações. Estudos futuros devem priorizar a caracterização genotípica dos isolados, a fim de confirmar e aprofundar as interpretações metabólicas propostas neste trabalho. A integração de abordagens moleculares permitirá validar os potenciais biotecnológicos das linhagens mais promissoras, além de contribuir para a seleção de leveduras regionais com características desejáveis para a produção de cachaça. Essa estratégia não apenas fortalecerá o conhecimento sobre a diversidade microbiana nativa, mas também promoverá a valorização de recursos locais, incentivando práticas fermentativas mais sustentáveis e adaptadas às condições específicas das regiões produtoras. Portanto, a associação entre dados fenotípicos e genotípicos se mostra essencial para o aprimoramento técnico e científico no desenvolvimento de processos fermentativos inovadores e de maior valor agregado.

5 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a caracterização fenotípica de treze cepas de leveduras isoladas de unidades produtoras de cachaça, revelando ampla diversidade funcional com potencial biotecnológico relevante. As cepas apresentaram comportamentos fisiológicos distintos sob diferentes condições ambientais, fontes de carbono e nitrogênio, além de tolerância variável a fatores de estresse como etanol e ácido acético, evidenciando suas capacidades metabólicas diversas. A maioria das cepas tolerou temperaturas de até 37 °C, com algumas crescendo a 40 °C, o que é vantajoso para fermentações em climas tropicais. Todas metabolizaram várias fontes de carbono, embora com diferenças — por exemplo, a cepa 13 não utilizou frutose, e apenas as cepas 9, 11, 12 e 13 cresceram em xilose. A tolerância ao etanol variou; a cepa 5 destacou-se por manter crescimento mesmo em 20% de etanol. A tolerância ao ácido acético foi notável até 6%, com as cepas 9 e 13 mantendo crescimento inclusive em 10%. O desempenho fermentativo também variou. As cepas 1, 3, 6, 8, 12 e 13 concluíram a fermentação em até 60 horas, com maiores taxas de crescimento microbiano. Outras cepas exigiram até 264 horas, apresentando sinais de maior produção de glicerol. A viabilidade celular pós-fermentação superou 80% na maioria dos casos, confirmando a aptidão tecnológica das cepas. As análises físico-químicas revelaram diferenças significativas na produção de etanol, ácidos, ésteres e CO₂. As cepas 1 e 10 apresentaram maiores rendimentos alcoólicos e melhor conversão de carbono. Em contraste, as cepas 2 e 5 produziram mais CO₂ e menos etanol. Destacam-se os perfis aromáticos: maçã verde (cepa 5) e abacaxi (cepa 7). A Análise de Agrupamento Hierárquico organizou as cepas em quatro grupos funcionais distintos. Os resultados reforçam o valor das leveduras autóctones como fonte de inovação na produção de cachaça e em processos fermentativos.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Fermentação** - portal embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/processamento-da-cana-de-acucar/tratamento-do-caldo/fermentacao>>. Acesso em: 16 maio. 2025.
- ALVES, Denise Maria Gandara. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-20210917-161601/>. Acesso em: 15 Dez. 2024.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool - controle e monitoramento**. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.
- ANGIOLETTO, Everton et al. **Isolamento e caracterização de leveduras para produção de sidra**. 2013.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2001.
- BARNETT, James Arthur; PAYNE, Roger William; YARROW, David. **Yeasts: characteristics and identification**. 1990.
- BECKERICH, Jean-Marie; LAMBERT, Micheline; GAILLARDIN, Claude. **LYC1 is the structural gene for lysine N-6-acetyl transferase in yeast**. *Current Genetics*, v. 25, p. 24-29, 1994.
- BEUCHAT, Larry R. **Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1-14, 1993.
- BISSON, L. F. **Geographic origin and diversity of wine strains of Saccharomyces**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 63, n. 2, p. 165-176, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.5344/ajev.2012.11083>.
- BISSON, Linda F. **Stuck and sluggish fermentations**. *American Journal of Enology and Viticulture*. v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Oxford: Blackwell Science, 2001.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and practice**. Cambridge: Woodhead, 2004.
- BÜCKER, Augusto. **Engenharia genômica de linhagem industrial de Saccharomyces cerevisiae visando melhorar a tolerância ao etanol**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- CASALONE, E.; BARBERIO, C.; CAPPELLINI, L.; POLSINELLI, M. **Characterization of Saccharomyces cerevisiae natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology**. *Research in Microbiology*, v. 156, p. 191-200, 2005.

CHEN, L.; LI, K.; CHEN, H.; LI, Z. **Reviewing the source, physiological characteristics, and aroma production mechanisms of aroma-producing yeasts.** *Foods*, v. 12, n. 18, p. 3501, 2023.

CORDERO-BUESO, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; OLIVEIRA, J.; GIL-DÍAZ, M.; ARROYO, T. **Potencial biotecnológico de leveduras não-Saccharomyces isoladas durante fermentações espontâneas de Malvar** (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, v. 236, p. 193-207, 2013.

CRUZ, Sandra Helena da et al. **O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em Saccharomyces cerevisiae.** *Eclética Química*, v. 26, p. 157-173, 2001.

CUNHA, J. T.; SOARES, P. O.; ROMANÍ, A. et al. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>.

DA SILVA, Érica Benjamim. **The effects of a combination of sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the composition of the microbial community, fermentation, and aerobic stability of whole-plant corn silage and high moisture corn.** 2018. Tese (Doutorado) – University of Delaware.

DA SILVA, Vanessa Pedro et al. **Cachaça Production: from sugar cane to spirit.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 129, n. 4, 2023.

D'AMORE, T. A study of ethanol tolerance in yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, p. 287-304, 1990.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. **Ethanol tolerance of yeast.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, p. 322-330, 1987.

DE-BARROS, Maria Clara et al. **Industrial Yeast Characterisation for Single Cell Protein Application.** *Food Science and Engineering*, p. 116-129, 2023.

FELIZARDO, L.; BIZERRA-SANTOS, J.; SANTOS-JÚNIOR, W.; DE-BARROS, M. C.; MAIA, L.; RIBEIRO-FILHO, N. **The influence of sugarcane cultivars on Sugarcane spirit (Cachaça) production.** 8th Worldwide Distilled Spirits Conference: Edinburgh, 2023.

GALDIERI, L.; ZHANG, T.; ROGERSON, D.; LLESHI, R.; VANCURA, A. **Protein acetylation and acetyl coenzyme A metabolism in Budding Yeast.** *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 12, p. 1472-1483, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00189-14>.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SPARROW, C.; MORGE, C.; ALEXANDRE, H. Influência do estado de azoto na fermentação alcoólica vínica. **Microbiologia Alimentar**, v. 83, p. 71-85, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2019.04.008.

GODILLOT, Joséphine et al. The timing of nitrogen addition impacts yeast genes expression and the production of aroma compounds during wine fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 829786, 2022.

GONZALEZ-RAMIREZ, Marina et al. **Commercial wine yeast nitrogen requirement influences the production of secondary metabolites (aroma, hydroxytyrosol, melatonin**

and other bioactives) during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, p. 110788, 2024.

GOWER, J. C. **A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties.** *Biometrics*, v. 27, n. 4, p. 857-871, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2528823>.

GOWER, J. C. **A note on Burnaby's character-weighted similarity coefficient.** *Journal of the International Association for Mathematical Geology*, v. 2, n. 1, p. 39-45, 1970.

GOWER, J. C. **Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis.** *Biometrika*, v. 53, n. 3/4, p. 325-338, 1966. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2333639>.

GRANATO, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. **Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers.** *Food Research International*, v. 60, p. 212-217, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.09.044.

GUARAGNELLA, N.; BETTIGA, M. **Estresse do ácido acético em leveduras em brotamento: dos mecanismos moleculares às aplicações.** *Levedura*, v. 38, n. 7, p. 391-400, jul. 2021. DOI: 10.1002/yea.3651. Epub 2021, 27 maio. PMID: 34000094; PMCID: PMC8361955.

GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. C. A.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. **Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal "caçaça".** *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 106-111, 2001.

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

HE, Yang et al. **Research progress of wine aroma components: A critical review.** *Food Chemistry*, v. 402, p. 134491, 2023.

HEARD, G.M.; FLEET, G.H. **The growth of yeasts during wine fermentation.** In: SAMSON, R.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; KING, A.D., eds. *Modern Methods in Food Mycology*. Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 365-368.

IBEAS, José Ignacio; JIMENEZ, Juan. **Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 7-12, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4. ed. (1ª Edição digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JIMÉNEZ MARTÍNEZ, Juan; LONGO, Elisa; BENÍTEZ, Tahía. **Induction of petite yeast mutants by membrane-active agents.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 3126-3132, 1988.

KACZMARSKA, Adrianna et al. Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. ***Carbohydrate Polymers***, v. 278, p. 118909, 2022.

KEMSAWASD, V.; VIANA, T.; ARDÖ, Y. et al. **Influência de fontes de nitrogênio no crescimento e desempenho fermentativo de diferentes espécies de leveduras de vinho durante a fermentação alcoólica.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, p. 10191–10207, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>.

KIM, J.H.; RYU, J.; HUH, I.Y. et al. **Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, p. 1871–1878, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1161-1>.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W. et al. **The Yeasts: A Taxonomic Study.** 10. ed. Wallingford: CABI, 2008. 1134 p.

KLEIN, C.J.L.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. **Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions.** Microbiology (Reading), v. 144, p. 13-24, 1998. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-13>.

KOPECKÁ, J.; NĚMEC, M.; MATOULKOVÁ, D. **Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast.** Journal of Applied Microbiology, v. 120, n. 6, p. 1561–1573, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13116>.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts: A Taxonomic Study.** 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. et al. **Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts.** In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T., eds. The Yeasts: A Taxonomic Study. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 87-110.

LABORATÓRIO DA CERVEJA. **As leveduras cervejeiras e as mutações "Petit".** Disponível em: <https://www.laboratoriodacerveja.com.br/post/as-leveduras-cervejeiras-e-as-muta%C3%A7%C3%B5es-petit#:~:text=Petit%20mutants%20s%C3%A3o%20c%C3%A9lulas%20de%20levedura%20de%20efeituosas%20e,modifica%C3%A7%C3%B5es%20na%20morfologia%20da%20membrana%20e%20parede%20celular>. Acesso em: 27 out. 2024.

LAWRENCE, Stephen J. et al. **The relationship between yeast cell age, fermenter cone environment, and petite mutant formation in lager fermentations.** Journal of the American Society of Brewing Chemists, v. 71, n. 2, p. 90-96, 2013.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Produção de etanol.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., eds. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3, Capítulo 1. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. p. 1-27.

LIMA, Urgel de Almeida et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 593 p.

LINDERHOLM, A.L.; FINDLETON, C.L.; KUMAR, G.; HONG, Y.; BISSON, L.F. **Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, p. 1787-1794, 2008. <https://doi.org/10.1128/AEM.01758-07>.

MAIA, L.; FELIZARDO, L.; BIZERRA-SANTOS, J.; RIBEIRO-FILHO, N. **Capítulo 06: A influência da concentração de leveduras na formação de etanol e ésteres durante fermentação usando mostos de média densidade.** In: SOUSA, A.G.; PIMENTEL, T.C.; ROCHA, R.S.; SILVA, V.M.A.; GOMES, A.S.G., orgs. Inovação na Produção de Alimentos do Nordeste: II Congresso Paraibano de Processamento e Tecnologia de Alimentos. Campina Grande - Paraíba: Agronfy, 2025. DOI: 10.53934/agronfy-2025-04-06.

MAICAS, S. **The role of yeasts in fermentation processes.** *Microorganisms*, v. 8, n. 8, p. 1142, 2020.

MALINA, C.; YU, R.; BJÖRKEROTH, J.; KERKHOVEN, E. J.; NIELSEN, J. **Adaptações no metabolismo e na tradução de proteínas dão origem ao efeito Crabtree em leveduras.** *Anais da Academia Nacional de Ciências*, v. 118, n. 51, p. e2112836118, 2021.

Martini, C.; Margarido, L.A.; Ceccato-Antonini, S.R. **Microbiological and physicochemical evaluations of juice extracted from different parts of sugar cane stalks from three varieties cultivated under organic management.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 808-813, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000300037>.

MATOS, Thelma Tirone Silvério et al. **Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho.** 2021.

MAVROMMATI, Maria; PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. **Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive laboratory evolution using high ethanol concentrations as a selective pressure.** *Process Biochemistry*, v. 124, p. 280-289, 2023.

MONTIJO, N. A. **Yeast CA-11 fermentation in musts treated with brown and green propolis.** *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 39, p. 3515-3522, 24 set. 2014.

Morais, P. B.; Rosa, C. A.; Linardi, V. R.; Pataro, C.; Maia, A. B. R. A. **Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of sugarcane aguardente.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 241-243, 1999.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais.** 1. ed. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, 2010.

NASCIMENTO, V. M.; FONSECA, G. G. **Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.** *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 50, n. 4, p. 349-356, 2019.

NOGUEIRA, A.; SWIECH, B. P.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. **Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado.** *Publicatio - UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, v. 12, n. 3, p. 15-23, 2006.

OLIVEIRA, L. P. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para a elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada.** Manaus: UFAM, 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas/PPGCIFA, 2006.

Ono B, Naito K, Shirahige Y, Yamamoto M (1991) **Regulation of cystathionine γ -lyase in *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast* 7: 843–848

Panteloglou, A. G.; Smart, K. A.; Cook, D. J. **Malt-induced premature yeast flocculation: current perspectives**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 39, n. 6, p. 813-822, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1086-0>.

Pataro, C.; Guerra, J. B.; Petrillo-Peixoto, M. L.; Mendonça-Hagler, L. C.; Linardi, V. R.; Rosa, C. A. **Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 1-9, 2000.

Pataro, C.; Santos, A.; Correa, S. R.; Morais, P. B.; Linardi, V. R.; Rosa, C. A. **Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery**. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 104-108, 1999.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. **An evolutionary perspective on the Crabtree effect**. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 1, p. 17, 2014.

PIRES, Joana Manuela Capela. **Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio**. 2017. Tese de Doutorado, Universidade de Evora, Portugal.

Ribeiro Filho, M. N. **Capítulo 13: Processamento de Cana-de-Açúcar para Produção de Cachaça e de Etanol**. In: Mielezrski, F.; Lopes, G. N., orgs. *Cultivo de Cana-de-açúcar na Paraíba*. João Pessoa, PB: Editora UFPB, 2020. p. 168-180.

RIBEIRO-FILHO, Normando et al. **Influence of essential inorganic elements on flavour formation during yeast fermentation**. *Food Chemistry*, v. 361, p. 130025, 2021.

RIBEIRO-FILHO, Normando et al. **The role of inorganic-phosphate, potassium and magnesium in yeast-flavour formation**. *Food Research International*, v. 162, p. 112044, 2022.

ROLERO, S. et al. **Análise quantitativa baseada na rotulagem de isótopos ^{13}C para elucidar a influência de parâmetros ambientais na produção de aromas fermentativos durante a fermentação do vinho**. *Microbial Biotechnology*, v. 10, p. 1649–1662, 2017. DOI: 10.1111/1751-7915.12749.

ROSA, C.; AM, S.; FARIA, J. **Cachaca production**. In: INGLEDEW, W.M.; KERSALL, D.R.; AUSTIN, G.; KLUHSIPIES, C. (Ed.). *The alcohol textbook*. 5. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 481-490.

RUBIO-TEXEIRA, M. **A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis***. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 12, p. 1115-1128, 2005. DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.05.003.

RUBIO-TEXEIRA, M. **Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes**. *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 2, p. 212-225, 2006. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.10.001.

SANTOS, Paulo J.F. Cameira dos et al. **A ENOLOGIA DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES**. 2021. 7 f. Tese (Doutorado) - Escola de Ciências, Centro de Biologia

Molecular e Ambiental (CBMA), Universidade do Minho, Braga, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Paulo-Dos-Santos-7/publication/357713804_A_Enologia_de_Leveduras_nao-Saccharomyces/links/61dc47665c0a257a6fdbf579/A-Enologia-de-Leveduras-nao-Saccharomyces.pdf. Acesso em: 19 out. 2024.

SCHNIERDA, T. et al. **Otimização de componentes de carbono e meio de nitrogênio para produção de biomassa usando leveduras de vinho não-Saccharomyces**. Letters in Applied Microbiology, v. 58, p. 478-485, 2014. DOI: 10.1111/lam.12217.

SERRA, L. A. et al. **Seleção de linhagens industriais de Saccharomyces cerevisiae para produção de ácidos orgânicos**. 2017.

SIDRIM, José Júlio Costa; MOREIRA, José Luciano Bezerra. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. In: Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. 1999. p. xiii, 287-xiii, 287.

SIEGEL, L.; WILKERSON, J. **Estrutura e função da ferredoxina-nitrito redutase do espinafre**. In: WRAY, J.; KINGHORN, J. (Eds.). Aspectos moleculares e genéticos da assimilação de nitrato. Oxford: Oxford Science Publications, 1989. p. 263-283.

SILVA, Antonio Levi Felizardo da. **A influência das variedades de cana-de-açúcar na qualidade da cachaça**. 2024.

SIVARIO, José M. **Assimilation of nitrate by yeasts**. FEMS Microbiology Reviews, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002.

SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. **Ecology: where yeasts live?** In: SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. (Eds.). Yeasts in natural and artificial habitats. New York: Springer, 1997. p. 33-58.

THOMAS, D.; SURDIN-KERJAN, Y. **Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 61, n. 4, p. 503-532, 1997.

THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. **Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae**. Archives of Microbiology, v. 117, p. 239-245, 1978.

THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. **Lysine inhibition of Saccharomyces cerevisiae: role of repressible L-lysine ϵ -aminotransferase**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 10, p. 572-575, 1994.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VAN MARIS, A. et al. **Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: Current status**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VILANOVA, M. et al. **Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 77, p. 145-157, 2007.

WALKER, G.; STEWART, G. **Saccharomyces cerevisiae in the production of fermented beverages**. Beverages, v. 2, n. 4, p. 30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>.

WALKER, Graeme M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

WANG, Hao et al. **Highly selective and rapidly responsive fluorescent probe for hydrogen sulfide detection in wine**. Food Chemistry, v. 257, p. 150-154, 2018.

WOLF, Ivan Rodrigo et al. **Integrative analysis of the ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae**. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 6, p. 5646, 2023.

YAZAWA, H.; IWAHASHI, H.; UEMURA, H. **Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of Saccharomyces cerevisiae**. Yeast, v. 24, p. 551-560, 2007.

YOSHIKAWA, Katsunori et al. **Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae**. FEMS Yeast Research, v. 9, n. 1, p. 32-44, 2009.

ZHANG, Liang et al. **Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in Saccharomyces cerevisiae**. Biotechnology Letters, v. 33, p. 1375-1380, 2011.