



**João Fernando Silva de Resende Chaves**

**DIVERSIDADE MICROBIANA E COMPARAÇÃO DA  
PERFORMANCE DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA E  
INOCULADA DE CACHAÇA**

**LAVRAS – MG**

**2023**

**JOÃO FERNANDO SILVA DE RESENDE CHAVES**

**DIVERSIDADE MICROBIANA E COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE DA  
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA E INOCULADA DE CACHAÇA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dra. Ana Paula Pereira Bressani  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2023**

**JOÃO FERNANDO SILVA DE RESENDE CHAVES**

**DIVERSIDADE MICROBIANA E COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE DA  
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA E INOCULADA DE CACHAÇA**

**MICROBIAL DIVERSITY AND COMPARISON OF THE PERFORMANCE OF  
SPONTANEOUS AND INOCULATED CACHAÇA FERMENTATION**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

**Banca:**

Professor Dr. Diego Alvarenga Botrel

Professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Dra. Ana Paula Pereira Bressani

Dra. Nádia Nara Batista

**LAVRAS – MG**

**2023**

*Aos meus pais,*

*Ao meu irmão,*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Meu maior e mais especial agradecimento vai ao meu pai, Luís Fernando, a minha mãe, Maria Zélia, e ao meu irmão, Francisco José, que me proporcionam a indescritível sensação do amor, me fornecendo tudo que precisei para chegar até aqui.

Estendo o agradecimento também a toda minha grande família que sempre se mostrou presente e forneceu suporte em todas as dificuldades.

À todos meus amigos que me apoiam nessa jornada durante cinco anos e tornaram a experiência da faculdade única e marcante.

À todos os professores e colaboradores da universidade. Dentre eles, gostaria de agradecer principalmente a Professora Rosane, que foi minha orientadora e abriu as portas para a realização deste trabalho. Agradeço também a todos os membros do NEFER pelos conhecimentos compartilhados e ajuda diária no laboratório.

À minha coorientadora Ana Paula, que esteve solícita em todos os momentos em que precisei e foi imprescindível para a execução deste trabalho.

A todos os membros do PET Engenharia de Alimentos e da CONSEA Jr., entidades que participei durante a graduação e que me proporcionaram experiências profissionais e acadêmicas essenciais para que eu me torne um bom profissional.

Por fim, à grandiosa Universidade Federal de Lavras, pelo enorme aprendizado proporcionado durante esses anos que contribuíram imensamente na minha construção pessoal e profissional.

Obrigado a todos.

## RESUMO

A cachaça é uma bebida genuína do Brasil e tem se destacado cada vez mais no mercado nacional e internacional. A partir disso, a compreensão de processos de fermentação espontâneos, juntamente com a inovação e o desenvolvimento de microrganismos selecionados possibilitam um futuro promissor para a qualidade da bebida. A fermentação espontânea traz consigo sabores característicos e únicos de cada *terroir*. Porém, é mais sujeita a contaminação microbiológica, fermentações não-uniformes e menor capacidade de produção. Em contrapartida, a fermentação com leveduras selecionadas de cachaça proporciona a solução para esses desafios. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e identificar a microbiota presente na fermentação com levedura espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* CA11, além de avaliar a performance de cada uma delas. Para isso, foi realizado a fermentação do mosto com posterior plaqueamento de leveduras e bactérias totais em meio YEPG e Ágar Nutriente. Após a caracterização morfológica das colônias e isolamento, foi realizada identificação em MALDI-ToF. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada para detectar carboidratos, etanol e ácidos orgânicos. O mosto fermentado com levedura inoculada apresentou população de leveduras maior que o mosto fermentado com levedura espontânea do início ao final da fermentação. Foram identificadas as leveduras *S. cerevisiae*, *Candida valida* e *Schizosaccharomyces pombe* no mosto fermentado com levedura espontânea e *S. cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* e *Zygosaccharomyces* sp. no mosto fermentado com levedura inoculada. Houve presença de bactérias em ambos os tratamentos, que foi diminuindo ao decorrer do tempo. *Pseudomonas stutzeri* permaneceu ao longo de toda fermentação em ambos os tratamentos. A frutose foi o açúcar mais consumido, o fermento espontâneo consumiu mais glicose que o inoculado, já a sacarose foi mais consumida no mosto com a levedura selecionada. A produção de etanol, em quantidade, foi maior no tratamento com fermentação espontânea. Somente os ácidos succínico e acético foram detectados nos mostos. Portanto, é possível concluir que a fermentação com inóculo apresentou uma diversidade microbiana mais restrita e produtividade de 2,66 g/L/h. Entretanto, a fermentação espontânea apresentou maior teor de ácido succínico, que é desejável para a cachaça, e uma produtividade de 3,8 g/L/h.

**Palavras-chave:** Cachaça; Fermentação espontânea; CA11; MALDI-ToF; CLAE.

## ABSTRACT

Cachaça is a genuine beverage from Brazil and has become increasingly prominent in the national and international market. From this, the understanding of spontaneous fermentation processes, together with the innovation and development of selected microorganisms enable a promising future for the quality of the beverage. Spontaneous fermentation brings characteristic and unique flavors of each terroir. However, it is more subject to microbiological contamination, non-uniform fermentations, and lower production capacity. On the other hand, fermentation with selected cachaça yeasts provides the solution to these challenges. Therefore, the aim of this work was to characterize and identify the microbiota present in fermentation with spontaneous yeast and inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* CA11, in addition to evaluating the performance of each of them. For this, the fermentation was performed with subsequent plating of yeast and total bacteria on YEPG and Nutrient Agar medium. After morphological characterization of the colonies and isolation, identification was performed using MALDI-ToF. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed to detect carbohydrates, ethanol, and organic acids. The must fermented with inoculated yeast had a higher yeast population than the must fermented with spontaneous yeast from the beginning to the end of fermentation. The yeasts *S. cerevisiae*, *Candida valida* and *Schizosaccharomyces pombe* were identified in the must fermented with spontaneous yeast and *S. cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* and *Zygosaccharomyces* sp. in must fermented with inoculated yeast. There was a presence of bacteria in both treatments, which decreased over time. *Pseudomonas stutzeri* remained throughout the entire fermentation in both treatments. Fructose was the most consumed sugar, the spontaneous yeast consumed more glucose than the inoculated yeast, while sucrose was consumed more in the must with the selected yeast. Ethanol production, in quantity, was higher in the treatment with spontaneous fermentation. Only succinic and acetic acids were detected in the musts. Therefore, it is possible to conclude that fermentation with inoculum presented a more restricted microbial diversity and productivity of 2.66 g/L/h. However, spontaneous fermentation showed a higher content of succinic acid, which is desirable for cachaça, and a productivity of 3.80 g/L/h.

**Keywords:** Cachaça; Spontaneous fermentation; CA11; MALDI-ToF; HPLC.

## SUMÁRIO

8	
1.	INTRODUÇÃO ..... 9
2.	REFERENCIAL TEÓRICO ..... 10
2.1	CACHAÇA ..... 10
2.2	PROCESSAMENTO DA CACHAÇA ..... 11
2.3	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA ..... 13
2.3.1	Fermentação do caldo de cana ..... 15
2.3.1.1	<i>Fermentação espontânea</i> ..... 15
2.3.1.2	<i>Fermentação utilizando culturas iniciadoras</i> ..... 16
3.	MATERIAIS E MÉTODOS ..... 16
3.1	MATÉRIA-PRIMA E PROCESSAMENTO DA CACHAÇA ..... 16
3.2	MÉTODO DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ..... 17
3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR MALDI-ToF ..... 18
3.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) ..... 18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 19
5.	CONCLUSÃO ..... 27



## 1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma das bebidas mais representativas do Brasil e possui uma longa história desde a época da colonização portuguesa. Ao longo dos séculos, a bebida se tornou não apenas tradição cultural, como também um produto de importância econômica significativa para o país (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; KAMIMURA, 2023).

De acordo com a legislação vigente (PORTARIA MAPA Nº539, DE 26 DE DEZEMBRO DE 2022), o termo “Cachaça” é a designação única e característica para a aguardente de cana produzida no Brasil, com teor alcoólico entre trinta e oito e quarenta e oito por cento em volume, na temperatura de vinte graus Celsius. A bebida é obtida através da destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar e possui características sensoriais distintas. Portanto, fica estabelecida a cachaça como bebida produzida exclusivamente no Brasil, deixando ainda mais claro sua importância ao povo brasileiro.

A produção de cachaça envolve diferentes etapas, dentre elas o plantio da cana, a moagem, fermentação, destilação e armazenamento. Na fermentação, o mosto da cana-de-açúcar desempenha papel crucial na formação de aromas e sabores únicos da cachaça (MUTTON *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; KAMIMURA, 2023).

A fermentação espontânea ocorre com os microrganismos presentes naturalmente no caldo de cana e no ambiente. Esse tipo de fermentação é conhecido por conferir à cachaça a riqueza de sabores e aromas característicos, muitas vezes associados ao *terroir* de cada região produtora. No entanto, essa abordagem também traz desafios, como a suscetibilidade a contaminações e variações na qualidade do produto final, em relação a variações nos teores de ácidos orgânico e compostos secundários presentes. (RATKOVICH *et al.*, 2023). Em contraste, a fermentação inoculada com leveduras selecionadas oferece maior controle, previsibilidade de fermentação, mais eficiência (MUTTON *et al.*, 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA11 é robusta, mais adaptada ao processo de fermentação da cachaça, permanece no processo produtivo, possui fácil separação do mosto e compete tanto com leveduras não selecionadas quanto bactérias contaminantes (MUTTON *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; KAMIMURA, 2023). Além disso, De Almeida *et al.* (2019) e Mutton *et al.* (2020) relacionaram a cachaça fermentada com CA11 com um produto de maior qualidade e melhores características químicas (MUTTON, 2020; DE ALMEIDA. 2019).

Como cada região apresenta características ambientais e microbiota próprias, é

possível que as leveduras autóctones possam atribuir características sensoriais diferenciadas da localidade (BARBOSA *et al.*, 2018). E mesmo com as dificuldades de padronização, alguns produtores ainda realizam a fermentação espontânea do caldo de cana para fabricação de cachaça sem conhecimento da microbiota presente.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e identificar a microbiota presente na fermentação espontânea e inoculada com *S. cerevisiae* CA11, além de avaliar a performance de cada fermentação.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 CACHAÇA**

A cachaça é uma aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil com teor alcoólico de 38,0 a 48,0% (v/v) a 20 °C, como descrito na Portaria MAPA nº 539, de 26 de dezembro de 2022. A bebida pode ser produzida exclusivamente e em sua totalidade em alambiques de cobre, podendo utilizar o termo “Cachaça de Alambique”, ou industrialmente com produção em larga escala, através de colunas de destilação (BRASIL, 2022).

Segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC), a origem da cachaça foi no Brasil por volta dos anos de 1516 a 1532, a caracterizando como o primeiro destilado conhecido da América Latina. Desde seu início, a cachaça se tornou importante para a sociedade brasileira sendo durante o fim do século XVI e início do século XVII, o segundo produto industrial mais produzido, atrás somente do açúcar. Ela já teve poder de moeda para a compra de escravos vindos da África e já contribuiu com a reconstrução de Lisboa após o terremoto de 1756 através do dinheiro recolhido por impostos (SEBRAE, 2019).

O número estabelecimentos produtores de cachaça registrados em 2021 foi de 936, e estão localizados em sua maior parte nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. Existe pelo menos uma cachaçaria registrada em 10,97% dos municípios brasileiros ou um estabelecimento registrado para cada 226.452 habitantes, demonstrando como a bebida é enraizada na sociedade. São quase 5.000 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), um aumento de 67% de 2019 a 2021, exemplificando o crescimento do segmento no mercado (MAPA, 2021).

A cachaça é exportada para 67 países em um volume total de 7.221.219 litros, o que gera uma renda de US\$13.178.050, ou seja, um valor médio de US\$1,83 US\$/L. Os maiores importadores em volume são Paraguai, Alemanha e Estados Unidos. Porém, a

Arábia Saudita representa a melhor relação entre Valor/Volume de cachaça, que chega a US\$18,33 por litro (MAPA, 2021). Estes números ilustram concretamente o potencial de exportação desse destilado e como ele é importante para a economia brasileira. A exportação gera renda, receita significativa e promove a cultura brasileira no exterior, tornando a cachaça cada vez mais viável economicamente.

## 2.2 PROCESSAMENTO DA CACHAÇA

A produção da cachaça se inicia na etapa de moagem da cana-de-açúcar, onde se obtém o caldo da cana (popularmente conhecido como “garapa”). Esse caldo passa por um processo de filtração, normalmente utilizado a operação unitária de decantação, para retirar o excesso de matéria em suspensão, principalmente os bagacilhos, que podem gerar compostos indesejáveis durante a destilação (Figura 1) (GONÇALVES *et al.*, 2019).

Em seguida, o caldo segue para os fermentadores para iniciar o processo de fermentação. A fermentação alcoólica é realizada por leveduras, principalmente *S. cerevisiae*, mas outros gêneros também podem ser encontrados, como *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloekera*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (DA SILVA, 2009).

A fermentação é vista como um ponto crítico na produção da cachaça porque está diretamente relacionada a produção de componentes formadores do aroma e sabor característicos a bebida (RATKOVICH *et al.*, 2023). As leveduras utilizadas podem ter origem espontânea, comumente iniciadas com fubá, mandioca, entre outros, ou com o uso de culturas iniciadoras, como a *S. cerevisiae* CA11, até a formação do pé-de-cuba (SOUZA *et al.*, 2013).

Continuando o processo, o mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, é levado até o alambique, onde ocorrerá a destilação. Esse processo separa o destilado em três partes, comumente chamado de “Cabeça, Coração e Cauda”. Esse processo é de extrema importância, pois a separação correta influencia diretamente na qualidade físico-química da cachaça, onde somente a parte denominada “Coração” deve estar presente (RATKOVICH *et al.*, 2023).

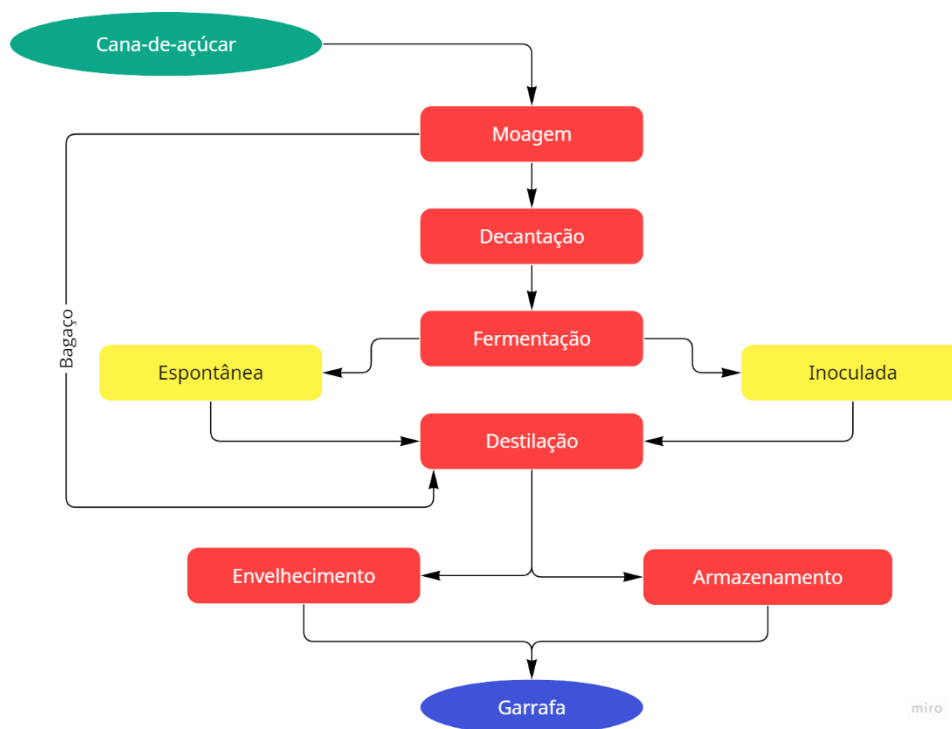
A destilação é essencial na cadeia de produção da cachaça que, se realizado da maneira incorreta, pode gerar componentes indesejados na cachaça. O mosto deve ter toda a matéria orgânica em suspensão retirada antes de seguir para o alambique, caso contrário, esses resíduos podem se depositar no fundo da panela de cobre, onde os carboidratos sofrerão decomposições dando origem ao furfural, um aldeído que,

preferencialmente, não deve estar presente na cachaça (PEREIRA *et al.*, 2003).

Por fim, depois de destilada, a cachaça segue para armazenamento ou envelhecimento. O armazenamento em materiais inertes, como o aço inoxidável é realizado por produtores que não desejam ter as características sensoriais da cachaça alteradas, como cor, sabor e compostos voláteis (Figura 1) (DE OLIVEIRA, 2022).

Outra maneira de se armazenar cachaça é através do envelhecimento, onde a bebida é colocada em tonéis de madeira e vai adquirir aspectos sensoriais desses recipientes, como cor, aroma e sabor. A cachaça pode ser colocada em barris de diferentes tipos de madeira, sendo o carvalho o mais utilizado, e deixado em tempo indeterminado, somente cuidando para que os padrões de identidade e qualidade permaneçam dentro do exigido pela legislação (ROSA; JÚNIOR; FARIA, 2016).

Figura 1: Fluxograma de processamento da cachaça.



Fonte: Próprio autor.

A cachaça, ao final de todo o processo, deve estar dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) estabelecidos pela Portaria MAPA n° 539, de 26 de dezembro de 2022. Esses padrões garantem que a bebida está própria para o consumo humano e não irá causar danos à saúde do consumidor, desde que não consumida em excesso. A Tabela 1 mostra os parâmetros em que a cachaça deve se adequar para que

possa ser comercializada e exportada (BRASIL, 2022).

Tabela 1: Parâmetros que estabelecem o PIQ da cachaça.

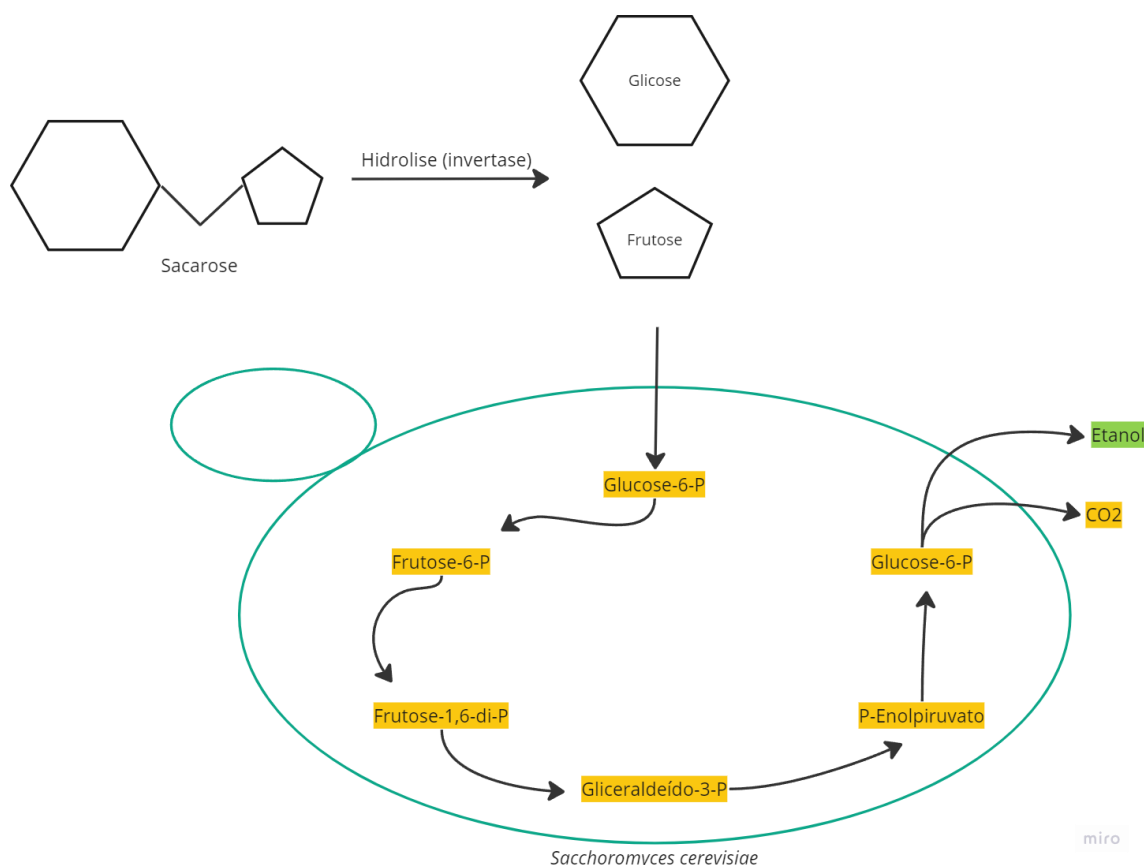
Parâmetro	Min	Max
Gradação alcoólica, expressa em %, em v/v, a 20,0 °C	38	48
Acidez volátil, expressa em acetato de etila, em mg/100 mL de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, expresso em acetato de etila, em mg/100 mL de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100 mL de álcool anidro	-	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100 mL de álcool anidro	-	5
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3 metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg/100 mL de álcool anidro	-	360
Coeficiente de congêneres, em mg/100 mL de álcool anidro	200	650
Compostos fenólicos totais (para cachaça envelhecida)	presente	
Açúcares totais (para cachaça), em g/L (expressos em glicose)	-	≤ 6,0
Açúcares totais (para cachaça adoçada), em g/L (expressos em glicose)	> 6,0	< 30

Fonte: adaptado de Portaria MAPA n° 539/2022.

### 2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O processo de fermentação é realizado por leveduras (e algumas bactérias) para a obtenção de energia. Durante este processo, o microrganismo pode converter um carboidrato, em álcool e gás carbônico (Figura 2). Para a fermentação alcoólica, que ocorre na produção de bebidas como a cachaça, o vinho e a cerveja, a levedura mais utilizada ainda é a *S. cerevisiae* (MAICAS, 2020).

Figura 2: Esquema da fermentação alcoólica.



Fonte: Adaptado de DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; KAMIMURA, 2023.

As leveduras são microrganismos facultativos, ou seja, podem realizar a respiração ou fermentação. Em meio aeróbio elas realizam a respiração e transformam o açúcar em água e gás carbônico. Este processo é favorável para a multiplicação celular e normalmente utilizado no início da safra ou em momentos em que esse objetivo é almejado. Já em meio anaeróbio, acontece a fermentação onde, os açúcares irão ser convertidos em etanol e gás carbônico, além de alguns outros subprodutos em menor quantidade como glicerol e ácidos orgânicos (ROSA; JÚNIOR; FARIA, 2016).

A fermentação alcoólica acontece em três principais etapas: (a) Fase preliminar - onde o consumo de açúcares é voltado predominantemente para a multiplicação celular. Ainda não acontece a produção de etanol, ocorre liberação de CO<sub>2</sub> e uma alteração baixa na temperatura. Essa etapa deve ser um período de duração curto, somente para que as leveduras se adaptem ao meio. (b) Fase é a tumultuosa - nela ocorre a fermentação principal, com um grande aumento na produção de CO<sub>2</sub> e elevada produção de álcool. A temperatura também aumenta significativamente, já que as reações são exotérmicas,

também ocorre o aumento dos teores de ácidos. Também acontece a formação de espuma e, conseqüentemente, a diminuição da densidade do meio. (c) Pós-fermentação - também conhecida como fermentação complementar, nesta etapa os açúcares que ainda estão presentes no meio são consumidos, ocorre uma diminuição na produção de etanol e na temperatura do mosto, e menores quantidades de CO<sub>2</sub> são produzidas. Em contrapartida, a acidez do meio se eleva (ROSA; JÚNIOR; FARIA, 2016).

Além de etanol e gás carbônico, alguns componentes conhecidos como compostos secundários são gerados em menor quantidade durante a fermentação. Eles se originam a partir de vias metabólicas diferentes. Os aromas e sabores dos destilados em geral são provenientes destes compostos, em especial os ésteres e aldeídos (PEREIRA *et al.*, 2003)

### **2.3.1 Fermentação do caldo de cana**

#### *2.3.1.1 Fermentação espontânea*

A fermentação espontânea do caldo de cana-de-açúcar é uma prática adotada, majoritariamente, por pequenos produtores. Os microrganismos utilizados na fermentação estão naturalmente presentes na planta, água e ambiente. É comum utilizar o “pé de cuba” para sua elaboração, e normalmente é utilizado uma fonte de amido, como milho, arroz, mandioca, entre outros, adicionado ao caldo de cana diluído. Esse processo recebe o nome de “fermento caipira” e é uma prática mais suscetível a contaminação, por não haver um controle da microbiota presente.

A microbiota presente nesse tipo de fermentação é muito diversa, normalmente encontrando-se em grande volume a *S. cerevisiae*, mas também outros microrganismos como *Rhodotorula glutinis*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii* e *Zygosaccharomyces fermentati*. Um dos benefícios da utilização de leveduras selvagens é uma performance enzimática maximizada, já que a *S. cerevisiae* sozinha normalmente não produz quantidades significantes de proteases extracelulares, lipases e enzimas proteolíticas (PORTUGAL *et al.*, 2016).

O uso de leveduras com linhagem selvagem pode ser interessante para maximizar a qualidade da bebida, a presença de leveduras não-*Saccharomyces* no meio pode aumentar as concentrações dos componentes secundários da bebida. Uma variedade maior de leveduras (*Pichia silvícola*, *Pichia anomala* e *Dekkera bruxellensis*) pode trazer características sensoriais únicas que melhoram o aroma e sabor da bebida, fazendo com que exista uma aceitação maior dos consumidores (DIAS, 2010).

Por fim, o fermento espontâneo é, na sua mais simples definição, o

aproveitamento das leveduras presentes no caldo de cana-de-açúcar. Leveduras essas que são levadas a condições propícias para que ocorra sua multiplicação, formando o “pé-de-cuba”, e a partir disso realizar a fermentação também conhecida como natural (DIAS, 2010).

#### 2.3.1.2 Fermentação utilizando culturas iniciadoras

O uso de leveduras selecionadas como iniciadoras do processo de fermentação para a produção de cachaça é um dos pilares da pesquisa para aumento da qualidade. Com a seleção de leveduras é possível melhorar a produtividade da fermentação, a diminuição dos casos de contaminação e uma melhor homogeneidade do produto (SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

Em uma fermentação com leveduras selecionadas realizada da maneira correta, com a diluição do caldo de cana e pasteurização do meio, a diversidade microbiana é muito pequena, fazendo com que haja maior disponibilidade de micronutrientes para as leveduras, conseqüentemente, a eficiência e a produtividade do processo fermentativo serão maiores. A cachaça produzida terá teores menores de acidez e de formação de componentes indesejáveis para a bebida, além de maior teor de etanol (GONÇALVES *et al.*, 2019).

A utilização de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica para produção de cachaça tem a capacidade de maximizar a produtividade e melhorar a qualidade da bebida, especialmente em relação aos teores de acidez presentes na bebida. Cepas selecionadas são mais competitivas, dominam o ambiente, dificultam a proliferação de bactérias e otimizam o tempo de processo ao eliminar o período necessário para formação do “pé de cuba” (PATARO *et al.*, 2002).

A principal levedura comercializada para a produção de cachaça é a CA11 por ser selecionada a partir de leveduras selvagens de cachaça e pela sua eficiência. Porém existem outras marcas e leveduras disponíveis no mercado e que possuem origens distintas, e em alguns casos, produtores utilizam até mesmo fermento de panificação (GONÇALVES *et al.*, 2021).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA E PROCESSAMENTO DA CACHAÇA

O caldo de cana foi obtido a partir da cana saudável (variedade CO-421) e moída no mesmo dia que a fermentação foi realizada. Para a produção da cachaça a partir da



fermentação espontânea, foi utilizado o processamento padrão do alambique (Fazenda Boa Vista, Coronel Xavier Chaves, Minas Gerais, Brasil).

O “pé de cuba” foi elaborado a partir de 20 Kg de farelo de milho (fubá) no fundo do cocho de fermentação. Em seguida, foram adicionados 20 L de água potável, fornecida pela COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais, aquecidos a 35 °C. Esperou-se cerca de 10 dias, e foi adicionado 10 litros de caldo a 5 °Brix e 35 °C, seguindo assim por mais três dias, abaixando a diluição do caldo, aumentando o volume colocado no cocho e mantendo o aquecimento da mistura. Até que se estabeleça o “pé de cuba” e o fermento espontâneo esteja pronto para uso. Quando a quantidade mínima de biomassa é alcançada (em volume de 150 L), o caldo não passa mais por diluição sendo colocado direto no cocho, neste experimento foi de 20 °Brix, em temperatura ambiente, com volume final de 600 L.

Para a fermentação utilizando levedura inoculada (*S. cerevisiae* CA11), também foram utilizados 600 L, porém com diluição do teor de açúcar até 14 °Brix. O processamento seguiu o protocolo do fabricante em quatro etapas: as leveduras foram hidratadas com 1:10 em água; ativadas com adição de caldo diluído a 8 °Brix e aeração do sistema; propagação das leveduras com adição de um volume maior de caldo diluído a 10 °Brix e aquecido; fermentação com caldo diluído a 16 °Brix.

Durante o processo fermentativo foram retiradas amostras no início (tempo 0 h- T0), meio de fermentação (12 horas- T12) e ao final da fermentação (24 h- T24), quando o °Brix estava zerado. As amostras foram retiradas na terceira batelada de fermentação, em tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL em triplicata.

### **3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS**

As amostras coletadas foram imediatamente congeladas e levadas para o laboratório das Fermentações, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Para crescimento e isolamento de leveduras foi utilizado o meio de cultura YEPG com pH 3,5 [(g/L: extrato de levedura 10 (HiMedia), glicose 20 (Dinamica), peptona 20 (HiMedia) e ágar 20 (HiMedia)]. Para crescimento e isolamento de bactérias foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente com 0,4% de nistatina [Prati Donaduzzi], sendo utilizado 28 gramas para cada litro de água destilada.

A técnica de diluição seriada foi realizada com diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  UFC/mL e plaqueadas em triplicata. As placas de petri foram incubadas a 28 °C para leveduras e 37

°C para bactérias por 48 h. Após o crescimento dos microrganismos, foi realizada a contagem e identificação dos morfotipos crescidos nas placas. As características morfológicas avaliadas foram: forma, tamanho, superfície, borda, perfil e cor (Material Suplementar – Tabela 1). Por fim, os morfotipos diferentes foram isolados por estria composta para posterior identificação.

### **3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR MALDI-ToF**

Para a identificação dos microrganismos, os isolados foram cultivados durante 18 h em placas de YEPG (para leveduras) e Ágar Nutriente (para bactérias). A extração de proteínas foi de acordo com o protocolo estabelecido pela Bruker, utilizando ácido fórmico e acetonitrila (Bruker Daltonics: Bremen, Germany). Um microlitro de extração foi colocado em cada spot da placa (triplicata), após a secagem foi coberto com um microlitro da solução matriz alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) previamente preparada em uma concentração final de 10 miligramas de CHCA/mL de solução orgânica [etanol:acetonitrila:ácido trifluoracético (10%) 1:1:1]. As placas foram secas em temperatura ambiente e analisadas por MALDI-TOF MS (UltrafleXtreme MALDI-ToF MS—Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

Os isolados identificados com score acima de 2,0, foram crescidos em 500 µL de seus respectivos meios de cultura líquido (YEPG e Ágar Nutriente) por 48 h a 28 °C e 37 °C, respectivamente. Após o crescimento, foram adicionados 500 µL de glicerol 40% para preservação e congelamento.

### **3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Carboidratos, etanol e ácidos orgânicos foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no início, meio e tempo final de fermentação (0, 12 e 24 h). Três mililitros de cada amostra foram centrifugados a 12745 RCF a 4 °C por 10 min. Para análise de ácidos orgânicos, o pH do sobrenadante será ajustado para 2,11 usando uma solução de ácido perclórico (16 mM) e centrifugado novamente nas mesmas condições. O segundo sobrenadante será filtrado através de uma membrana de acetato de celulose de 0,22 µm e armazenado a -18 °C até análise.

Análises de carboidratos e etanol foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu (Shimadzu Corp., Japão) equipado com um sistema de detecção dupla que consiste em um detector UV-vis (SPD 10Ai) e um detector de índice de refração (RID-10Ai). Uma coluna de exclusão iônica Shimadzu Shim-pack SCR-101H

(7,9 mm × 30 cm) foi ajustada para uma temperatura operacional de 30 °C. Ácido perclórico (100 mM) foi usado como eluente a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. As curvas de calibração foram construídas com diferentes concentrações de compostos padrão.

Para ácidos orgânicos, a solução resultante foi injetada na coluna cromatográfica (Shimpack SCR-101H - 7,9 mm × 30 cm). A análise foi realizada a 50 °C, usando uma fase móvel com ultrapura água e ácido perclórico (pH 2,1) a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Os ácidos (cítrico, succínico, málico, láctico, acético) foram detectados por absorção de UV (210 nm). Curvas de calibração foram construídas com padrões para quantificar os compostos químicos (0,25 – 8 g/L). Os ácidos málico, cítrico e acético foram adquiridos da Merck (Alemanha), o ácido láctico foi adquirido da Acros Organic (Bélgica) e succínico da Sigma Aldrich (Alemanha).

### 3.5 Cálculo de produtividade

A produtividade da fermentação é calculada em relação ao etanol produzido e tempo de fermentação, segundo a equação abaixo:

$$Q = (Pf - Pi) / t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Pf = concentração final de etanol [g/L]

Pi = concentração inicial de etanol [g/L]

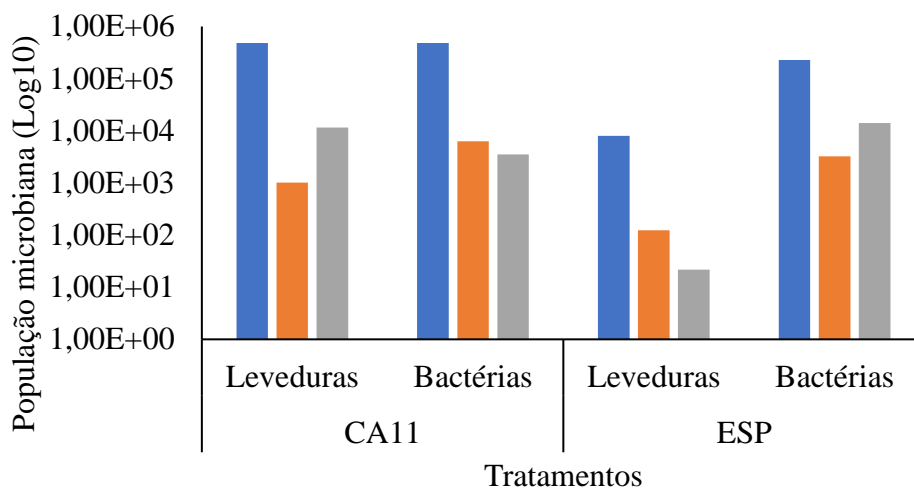
t = tempo total de fermentação [h]

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos pelo plaqueamento e contagem dos microrganismos (Figura 3), é possível perceber diferenças na população da microbiota dos tratamentos utilizando cultura iniciadora (TC) e espontânea (TE).

No início da fermentação foi possível perceber que para TC ( $4,85 \times 10^5$  UFC/mL) a população de levedura foi maior se comparado ao tratamento TE ( $7,95 \times 10^3$  UFC/mL). No fim da fermentação, é possível observar que a população de leveduras diminuiu em ambos os tratamentos. Entretanto, a levedura inoculada CA11 demonstra ser mais robusta que a levedura espontânea, pois a contagem de levedura permanece alta, diferentemente da outra que está em declínio (TC:  $1,15 \times 10^4$  e TE:  $2,17 \times 10^1$  UFC/mL).

Figura 3: População total de leveduras e bactérias encontradas durante a fermentação dos mostos com CA11 e espontâneo.



■ Início de fermentação (T0); ■ 12 h de fermentação (T12); ■ Fim de fermentação (T24). CA11: Mosto fermentado com *S. cerevisiae* CA11; ESP: Mosto com fermentação espontânea.

Fonte: próprio autor.

A diminuição na viabilidade de leveduras durante a fermentação pode acontecer devido a elevação do teor de etanol presente no mosto, que inibe a atividade do fermento até a morte celular (BARCELOS, 2021). As leveduras selecionadas, como a CA11, possuem maior performance durante toda a fermentação, maior resistência a maiores concentrações de etanol e tendem a dominar o processo fermentativo. Devido a esses parâmetros, essa cepa é destacada como uma das melhores para a produção de cachaça, pois a população de leveduras permanece estabilizada durante todo o processo, independente das variações de componentes no meio (DUARTE; AMORIM; SCHWAN; 2013).

Foi possível notar diferença entre a população de leveduras ao final da fermentação. TC ( $1,15 \times 10^4$  UFC/mL) apresentou uma população final de leveduras maior que TE ( $2,17 \times 10^1$  UFC/mL). Segundo Dias (2010), a quantidade de leveduras selvagens tende a diminuir à medida que os ciclos fermentativos progridem. Isso acontece devido ao fato de o fermento espontâneo possuir participação significativamente maior de leveduras não-*Saccharomyces* no meio, sugerindo que no fermento inoculado há uma participação maior de *S. cerevisiae*. Portanto, a quantidade de leveduras não-*Saccharomyces* tendem a diminuir ao decorrer do processo, de forma a acontecer uma adaptação e seleção natural de leveduras, permanecendo as mais resistentes, na maior

parte do caso, a *S. cerevisiae* (DIAS, 2010).

Outro resultado importante obtido a partir da análise de população microbiológica foi a elevada presença de bactérias em ambos os mostos, principalmente no início da fermentação (em torno de  $10^5$  UFC/mL). Esse fato pode ser explicado pela utilização do caldo de cana-de-açúcar *in natura*, ou seja, o a cana é moída no engenho e o caldo extraído segue para a filtragem e logo em seguida é despejado nos cochos de fermentação, sem passar por nenhum tipo de tratamento térmico para inibição ou inativação dos microrganismos naturalmente presentes.

A presença de alta população de bactérias pode indicar atenção as Boas Práticas de Fabricação, além de se tornar um problema para a fermentação de cachaça, uma vez que prejudicam o processo, competindo por nutrientes e formando outros compostos diferentes do etanol (DA SILVA; LOPES, 2022).

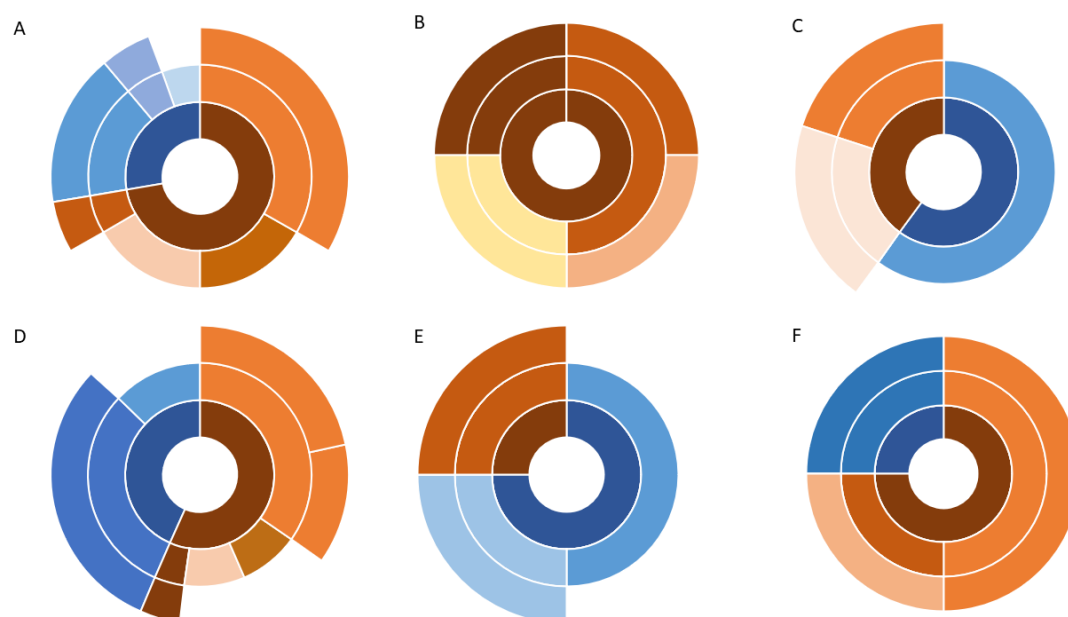
No caso do fermento espontâneo, a prática de não-esterilização do meio é importante porque grande parte das leveduras que surgem no meio estão presentes na cana-de-açúcar e chegam até o cocho de fermentação junto com o caldo, porém, como demonstrado neste trabalho, junto com as leveduras vem uma quantidade considerável de bactérias. Desta forma, o fermento deve ser robusto e competitivo o bastante para se sobressair e dominar o ambiente (GONÇALVES *et al.*, 2021).

Ao decorrer do tempo, a quantidade de bactérias presentes no mosto é reduzida, o que pode ser explicado por vários fatores, como o domínio do processo pelas leveduras, aumento no teor de etanol presente no mosto, já que as bactérias são ainda mais suscetíveis que as leveduras, e diminuição do pH do mosto (COSTA, 2017). Em ambos os tratamentos houve uma diminuição da população bacteriana, com maior decréscimo em TC ( $3,50 \times 10^3$  UFC/mL) do que em TE ( $1,40 \times 10^4$  UFC/mL). Esse resultado pode ter sido influenciado pela melhor dominância da CA11 no cocho de fermentação e população inicial mais alta.

Após a etapa de plaqueamento e contagem foi realizado a caracterização dos morfotipos crescidos nas placas. Foram isolados 164 microrganismos, sendo 88 bactérias e 76 leveduras (Material suplementar – Tabela 1), demonstrando uma ampla diversidade microbiológica no mosto, possivelmente devido a prática não-pasteurização do caldo de cana-de-açúcar mencionada anteriormente.

Os gráficos presentes na Figura 4 apresentam leveduras e bactérias identificadas (com score acima de 2 para identificação de espécie e acima de 1,7 para identificação de gênero) em cada período da fermentação.

Figura 4: Identificação dos microrganismos isolados durante a fermentação do mosto.



Fermentação com CA11: A= início de fermentação, B= 12 horas de fermentação, C= 24 h de fermentação; Fermentação Espontânea: D= início de fermentação, E= 12 horas de fermentação, F= 24 h de fermentação. ■ Leveduras: ■ *Saccharomyces/ S. cerevisiae*, ■ *Candida valida*, ■ *Saccharomycodes ludwigii*, ■ *Zygosaccharomyces*, ■ *Schizosaccharomyces pombe*.

■ Bactérias: ■ *S. aureus*, ■ *Pseudomonas/ P. stutzeri*, ■ *Microbacterium*, ■ *Bacillus/B. megaterium*, ■ *B. cereus*, ■ *Pseudoxanthomonas*, ■ *Arthrobacter gandavensis*, ■ *Acinetobacter radioresistens*.

Para nível de espécie foi considerado apenas identificações com score igual ou maior que 2,0, e nível de gênero, score igual ou acima de 1,7. Demais identificações estão no Material complementar (Tabela 2).

Fonte: próprio autor.

A microbiota identificada foi diferente durante a fermentação em ambos os tratamentos (Figura 4). Em TC, foi identificado no início da fermentação as leveduras *S. cerevisiae* (predominantemente), *Saccharomycodes ludwigii* e o gênero *Zygosaccharomyces*. *Pseudomonas stutzeri*, *Microbacterium* e *Pseudoxanthomonas* foram as bactérias identificadas. Com 12 horas de fermentação, apenas bactérias foram identificadas pelo equipamento, se destacando *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* e *Arthrobacter gandavensis*. No final da fermentação, o gênero *Saccharomyces* foi o único identificado para leveduras e *Acinetobacter radioresistens* e *Pseudomonas* para bactéria (Figura 4).

A presença de *S. ludwigii* pode estar relacionada com a contaminação do caldo de

cana, já que foi identificada no início da fermentação. Essa levedura é muito utilizada na produção de cerveja sem ou com baixos teores de álcool devido a sua incapacidade de fermentar a maltose. Para a cachaça, ela pode ser interessante devido a sua capacidade de produzir compostos aromáticos que agregam sabor a bebida (PUERARI *et al.*, 2016). Esteves *et al.* (2019) estudaram uma cepa de *S. ludwigii* para fermentação de vinho. Os autores concluíram que vinhos cuja fermentação foi governada por *S. ludwigii* UTAD17 apresentaram baixos níveis de compostos aromáticos secundários e eram quimicamente distintos daqueles fermentados por *S. cerevisiae* (ESTEVES *et al.*, 2019).

A diversidade de bactéria identificada foi diminuindo ao longo da fermentação, restando apenas uma espécie identificada. Entretanto, é possível lembrar que alguns isolados não foram identificados.

No fermento espontâneo as seguintes leveduras foram identificadas no início da fermentação predominantemente *Candida valida* e em menor quantidade, o gênero *Saccharomyces*. *P. stutzeri*, *S. aureus*, *Microbacterium* e *Pseudoxanthomonas* foram as bactérias identificadas. As mesmas espécies e gêneros identificados em TC, exceto para *S. aureus*. Esse resultado pode indicar que essas bactérias são contaminantes do solo, cana, água ou ambiente de produção. De acordo com Nova (2009), leveduras do gênero *Candida* são frequentemente encontradas em fermento espontâneo e tem a capacidade de se multiplicar no meio dependendo das condições do processo e da reinserção de microrganismos através do caldo de cana.

As espécies de *Candida* podem ter dois nomes que se correlacionam com o estado de crescimento do fungo: um nome anamorfo associado ao crescimento e replicação assexuada (apenas mitose) do fungo e um nome teleomorfo associado ao crescimento e replicação sexual (PEREIRA, 2022). A *C. valida* também é conhecida como *Pichia membranifaciens* em teleomorfo, ela pode se desenvolver em alimentos de pH baixo por ser resistente a concentrações maiores de ácido acético (FIRAT, 2020), explicando sua resistência no mosto da cachaça.

O gênero *Saccharomyces* e espécie *Schizosaccharomyces pombe* foram identificadas com 12 horas de fermentação. Oliveira *et al.* (2005), obtiveram resultados ruins com a fermentação utilizando *S. pombe* isolada, já que ela produziu baixos teores de álcoois superiores e de compostos voláteis, de forma que o aroma final da bebida foi afetado. Porém, ela demonstra ter uma eficiência muito grande na produção de etanol, o que aumenta o rendimento da fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2005) em relação a produção de álcool. Nesse tempo de fermentação, apenas *B. megaterium* foi identificada

para TE.

Ao final da fermentação, apenas *C. valida*, *B. cereus* e *Pseudomonas* foram identificados em TE. Um dos pontos principais que podem ser analisados na Figura 4 foi a persistência de bactérias ao longo da fermentação, o que demonstra que algumas delas tem mais tolerância ao aumento da concentração de etanol e diminuição do pH no mosto. A bactéria que mais persistiu em ambos os tratamentos (TC e TE) foi a *Pseudomonas stutzeri* que normalmente, tem sua origem a partir da água ou do solo.

Uma hipótese para explicar a sua presença em ambos os mostos pode ser a má higienização da cana-de-açúcar antes de ser moída no engenho, que pode conter resquícios de solo, explicando assim o aparecimento desta espécie de bactéria. Outra hipótese para a contaminação é através da água que, apesar de ser fornecida pela COPASA e passar por análise de qualidade periodicamente, pode ter a presença de bactérias resistentes como a *Pseudomonas*. Essa bactéria tem uma grande diversidade fisiológica e bioquímica, de modo que a permite crescer em locais extremos, como a água do mar, ela também consegue crescer anaerobicamente (LALUCAT *et al.*, 2006).

Através da análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível avaliar a concentração de carboidratos, etanol e ácidos orgânicos durante a fermentação do mosto. Dessa maneira, observando a Tabela 2 foi possível comparar a performance de fermentação dos fermentos utilizados e analisar quais componentes foram mais produzidos/consumidos por cada tratamento ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 2: Consumo de carboidratos durante a fermentação espontânea e utilizando CA11.

Tratamento	Carboidrato	Concentração (g/L)			% de consumo
		T0	T24		
TC	Sacarose	64,57 ± 1,70	15,35 ± 1,86	76,23	
	Glicose	26,88 ± 1,68	6,94 ± 0,09	74,20	
	Frutose	28,20 ± 1,16	0,90 ± 0,06	96,82	
TE	Sacarose	50,04 ± 3,96	25,15 ± 0,64	49,74	
	Glicose	61,44 ± 2,14	4,57 ± 4,53	92,56	
	Frutose	58,58 ± 1,02	0,55 ± 0,00	99,06	



TC: Mosto fermentado com levedura CA11; TE: Fermentação espontânea do mosto. T0: Início de fermentação; T24: Fim de fermentação.

Fonte: próprio autor.

É possível observar que há diferença entre a concentração inicial dos componentes entre os dois tratamentos (TC e TE). Isso pode acontecer devido à complexidade da amostra e quantidade do mosto a ser fermentado (600 litros).

A frutose foi o carboidrato mais consumido durante a fermentação para os dois tratamentos seguido da glicose e sacarose. Glicose e frutose são monossacarídeos e facilmente consumidos pela maioria dos microrganismos (ROSA; JÚNIOR; FARIA; 2016).

A glicose foi um pouco mais consumida em TE (92,56%) do que em TC (74,20%), entretanto, em TC (74,23%), a sacarose foi muito mais consumida se comparada com TE (49,74%). O mosto fermentado com levedura espontânea tinha maior concentração inicial de monossacarídeos, desta forma, não foi necessário utilizar alta concentração de sacarose, como em TC.

O consumo desses carboidratos gera a produção de etanol e gás carbônico (ROSA; JÚNIOR; FARIA; 2016). Na Tabela 3, pode-se observar as concentrações de etanol no início e ao final da fermentação. A concentração de etanol no início da fermentação pode ser explicada pelo volume de mosto que sobra junto com o ‘pé de cuba’ no fundo da dorna, visto que as amostras foram retiradas na terceira batelada de cada cocho.

Tabela 3: Produção de etanol durante a fermentação espontânea e utilizando CA11.

Tratamento	Concentração (g/L)		Quantidade produzida	
	T0	T24	(g/L)	% de produção
TC	17,09 ± 1,03	80,90 ± 0,77	63,81	373,39
TE	28,00 ± 0,04	119,45 ± 0,39	91,45	326,62

TC: Mosto fermentado com *S. cerevisiae* CA11; TE: Mosto com fermentação espontânea. T0: Início de fermentação; T24: Fim de fermentação.

Fonte: próprio autor.

Apesar de a levedura inoculada ter tido uma porcentagem de aumento em relação ao início maior, TC (373,39%) e TE (326,62%) ela produziu, em quantidade, menos etanol que o outro tratamento (63,81 g/L). A levedura espontânea, portanto, conseguiu produzir mais etanol durante a fermentação (91,45 g/L). O fermento inoculado é selecionado visando o aumento da produtividade, porém as condições climáticas na fazenda onde ocorreu o experimento podem ter influenciado na sua performance, já que o experimento foi realizado durante o inverno (agosto/2023), e a levedura espontânea já é ambientada ao local. Temperaturas baixas diminuem o metabolismo das leveduras e fazem com que a reação ocorra de maneira mais lenta.

Também foi avaliada a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação. Os ácidos analisados foram o cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico e acético, porém somente os ácidos acético e succínico foram detectados no mosto (Tabela 4).

Tabela 4: Detecção de ácidos orgânicos durante a fermentação espontânea e utilizando CA11.

Tratamento	Ácido	Concentração (g/L)		Quantidade produzida (g/L)	% de produção
		Inicial	Final		
TC	Succínico	2,07 ± 0,24	4,77 ± 0,57	2,70	130,83
	Acético	2,68 ± 1,54	3,78 ± 0,78	1,10	50,95
TE	Succínico	0,94 ± 0,05	4,89 ± 0,76	3,95	421,31
	Acético	3,64 ± 0,95	5,75 ± 0,61	2,11	57,92

TC: Tratamento com levedura CA11; TE: Tratamento com levedura espontânea.

Fonte: próprio autor.

Como esperado, o fermento espontâneo apresentou quantidades maiores de ácido acético no mosto (5,75 g/L). Esse ácido é produzido majoritariamente por bactérias acéticas e sua presença é indesejada na produção de cachaça (MACHADO *et al.*, 2021). Isso pode ser explicado pela maior contagem de bactérias neste tratamento, pelo fato de não ser inoculado e o processo de multiplicação celular ser mais demorado no início, a competição entre os microrganismos é maior.

Outro ponto muito interessante é a produção do ácido succínico, que tem sua presença desejada em bebidas alcoólicas, já que ele tem a capacidade de reagir com outras moléculas e formar ésteres (FEJZULLAHU *et al.*, 2021). A levedura espontânea produziu uma quantidade muito maior deste ácido, chegando a um aumento de 421,31% em relação a quantidade inicial, enquanto a levedura inoculada promoveu um aumento de somente 130,83%. Uma das explicações para essa diferença é justamente a seleção de leveduras. Ao realizar essa seleção visando uma produtividade melhor, acontece a diminuição da produção de componentes que não estão na via principal de conversão das reações que ocorrem durante a fermentação, que é o caso do ácido succínico.

Por fim, produtividade da fermentação é um importante parâmetro para avaliar a velocidade da fermentação e tomar decisões sobre como otimizar o processo. Por exemplo, aumentar a temperatura ou adicionar nutrientes pode aumentar a velocidade da fermentação e, portanto, aumentar a produtividade. Os valores encontrados para esse parâmetro foram 2,66 g/L/h para o fermento inoculado com *S. cerevisiae* CA11 e 3,8 g/L/h para o fermento espontâneo.

## 5. CONCLUSÃO

Houve diferença entre a diversidade microbiana encontrada em cada tratamento e tempo de fermentação, de forma que no fermento espontâneo foi encontrado maior diversidade de microrganismos e maior população de bactérias. Além disso, as populações de levedura permaneceram mais estáveis no fermento inoculado e diminuíram consideravelmente ao decorrer do processo no fermento espontâneo. A população de bactérias diminuiu ao longo do tempo em ambas as fermentações.

Em relação a performance de fermentação, também houve diferença entre os dois tratamentos. No fermento inoculado com *S. cerevisiae* CA11 a produção de ácido acético foi menor, como esperado, evidenciando que houve uma menor contaminação no mosto. Já no fermento espontâneo, a produção de etanol e ácido succínico foram mais elevadas, demonstrando boa performance de fermentação. A maior produtividade do fermento espontâneo (TE: 3,8 g/L/h e TC: 2,66 g/L/h) pode ser explicada devido a adaptação da microbiota ao local em que o experimento foi realizado.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, Raquel *et al.* Multiple rounds of artificial selection promote microbe secondary domestication—the case of cachaça yeasts. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 8, p. 1939-1955, 2018.

BARCELOS, Ana Clara Assis. **Produção de etanol com uso de leveduras selecionadas em usinas associadas à SIAMIG**. Orientador: Rogélio Lopes Brandão. 2021. 53 p. Trabalho de Conclusão de curso (Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da Cachaça: 2021**. 1ª edição. MAPA, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cachaca-2021-1.pdf>. Acesso em 14 de dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **PORTARIA MAPA Nº539 DE 26 DE DEZEMBRO DE 2022**. MAPA, 26 de dez. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mapa-n-539-de-26-de-dezembro-de-2022-453828778>. Acesso em 27 dez. 2023.

COSTA, Marcelo Augusto de Souza. **Efeito do sistema de fermentação, da adição de etanol ao tratamento ácido e da contaminação por *Lactobacillus sp.* na produção de etanol**. 2017. 105 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

DA SILVA, Marlon Vinicio Pinheiro; LOPES, Kelson Carvalho. Comportamento da fermentação alcoólica para produção de cachaça com e sem controle da temperatura em diferentes concentrações de brix e pH. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 13, n. 8, p. 90, Editora Poisson. 2022.

DA SILVA, Pollyana Alves Borges *et al.* **Caracterização das populações de leveduras e dos parâmetros químicos em fermentações contaminadas durante a produção de cachaça em Minas Gerais**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DE ALMEIDA, Juliane Cristina *et al.* Cachaça production from sugarcane infested by *Diatrea saccharalis*. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 266-272, 2019.

DE OLIVEIRA, Amanda Cristina Dias; DE OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes; KAMIMURA, Eliana Setsuko. Microbial contamination in the ethanol and cachaça fermentation process: impacts and applications. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1-8, 2023.

DE OLIVEIRA, Lucas; JUNIOR, Edemar Ferrarezi. Produção de cachaça artesanal. **Revista Interface Tecnológica**, v. 19, n. 2, p. 810-818, 2022.

DIAS, Gabriel Afra Vital Matos. **Influência do tipo de fermento e do envelhecimento sobre a qualidade da cachaça artesanal orgânica**. 2010. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2010.

DUARTE, Whasley Ferreira; AMORIM, Juliana Cunha; SCHWAN, Rosane Freitas. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 175-194, 2013.

ESTEVES, Marcos *et al.* Characterizing the potential of the non-conventional yeast *Saccharomyces ludwigii* UTAD17 in winemaking. **Microorganisms**, v.7 , n. 478, p. 1-16, 2019.

FEJZULLAHU, Fatjona *et al.* Influence of non-*Saccharomyces* strains on chemical characteristics and sensory quality of fruit Spirit. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1336, 2021.

FIRAT, Mehmet Caglar; CETIN, Bulent. Molecular characterization of the yeast isolates originating from Turkish Autochthonal Product, brined grapeleaves. **International Journal of Engineering Research & Technology**, v. 9, n. 7, 2020.

GONÇALVES, Cleber Miranda *et al.* Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC). **UM POUCO DE HISTÓRIA:** 2011. Brasília, 2011. Disponível em: < <http://www.ibrac.net/index.php/ig-cachaca/historia-da-cachaca> >. Acesso em: 14 de dezembro. 2023.

LALUCAT, Jorge *et al.* Biology of *Pseudomonas stutzeri*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 2, p. 510-547, 2006.

MACHADO, Bárbara Dias *et al.* Avaliação da formação dos componentes secundários da cachaça durante o processo fermentativo. **Revista Engenharia de Interesse Social**, v. 6, n. 8, p. 23-34, 2021.

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

MUTTON, Márcia Justino Rossini *et al.* The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.

NOVA, Meiriana Xavier Vila *et al.* Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009.

OLIVEIRA, Evelyn Souza *et al.* The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1569-1576, 2005.

PATARO, Carla. *et al.* Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PEREIRA, Gilberto Vinicius de melo *et al.* What is *Candida* doing in my food? A review and safety alert on its use as starter cultures in fermented foods. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1855, 2022.

PEREIRA, Norma Eliane *et al.* Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1068-1075, 2003.

PORTUGAL, Cauré Barbosa *et al.* The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1587-1597, 2016.

PUERARI, Cláudia *et al.* Optimization of alcohol-free beer production by lager and cachaça yeast strains using response surface methodology. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 1, p. 69-75, 2016.

RATKOVICH, Nicolas *et al.* The spirit of cachaça Production: An umbrella review of processes, flavour, contaminants and quality improvement. **Foods**, v. 12, n. 17, p. 3325, 2023.

ROSA, Carlos Augusto; JÚNIOR. Acir Moreno Soares; FARIA, João Bosco. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, v.1, n.17, p. 359-369, Editora Blucher. 2021.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e Pequenas Empresas. **A Cachaça de Alambique: um estudo sobre hábitos de consumo em Goiânia**. SEBRAE, 2019. Disponível em: <https://sebrae.com.br>. Acesso em 21 de outubro de 2023.

SOARES, Thaís Louise; SILVA, Cristina Ferreira; SCHWAN, Rosane Freitas. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 184-187, 2011.

SOUZA, Leandro Marelli de *et al.* **Produção de cachaça de qualidade**. 2013. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” - ESALQ. 2013.

## Material Suplementar

Tabela 1 – Caracterização morfológica dos isolados de mostos de cachaça por fermentação espontânea e CA11.

Amostra	Colônia	Repetição	Forma	Tamanho	Características morfológicas:			
					Superfície	Borda	Perfil	Cor
YEPG T0 CA11	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
CA11	2	1	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca
		2						
YEPG T0 CA11	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
CA11	2	1	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
YEPG T0 CA11	1	1	Circular	Grande/Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
		3						
YEPG T0 CA11	2	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
YEPG T0 CA11	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
CA11	2	1	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
		2						
YEPG T0 CA11	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branca/Creme
		2						
		3						
CA11	2	1	Circular	Médio/Pequeno	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Bege/Marrom claro
		2						
CA11	3	1	Circular	Pequena		Lisa	Circular	Creme
		1						



		2			Estria Concêntrica			
		1						
	1	2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
YEPG T12 CA11	2	1	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme com vermelho no meio
	3	2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Cinza transparente com brilho
	4	1	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branco pálido
		2						
	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branco
YEPG T12 CA11	2	1	Circular	Grande	Algodão	Filamentosa	Algodão	Branco
	3	2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Cinza quase transparente e com brilho
	4	1	Irregular	Médio/Pequeno	Granulosa	Arredondada	Granulosa	Branco pálido
		2						
YEPG T12 CA11	1	1	Circular	Média/Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		2						
YEPG T12 CA11	1	1	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
		2						

	2	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG T12 CA11	1	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
		1					Lisa, Convexa e com cume central	
YEPG T24 CA11	1	2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa		Creme
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
		1					Lisa, Convexa e com cume central	
YEPG T24 CA11	1	2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa		Creme
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
YEPG T24 CA11	1	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
	2	1 2	Circular	Muito Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
YEPG T24 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branca Creme
	2	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branca Creme
YEPG T24 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca Creme
	2	1	Circular	Pequena		Lisa		Branca Creme

		2			Estria Concêntrica		Lisa e convexa	
YEPG T24 CA11	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG T0 ESP	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme com vermelho no meio
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco
	4	1 2	Irregular	Média	Estria Concêntrica	Lobulada	Lisa e convexa	Branco
YEPG T0 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Amarronzado
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Branco
YEPG T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Quase transparente
YEPG T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme

	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
YEPG T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
YEPG T0 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Filamentosa	Lisa	Algodão	Marrom no centro
	2	1 2	Circular	Pequena	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme
	4	1 2	Circular	Muito Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Circular	Creme transparente
YEPG T0 ESP	1	1 2	Irregular	Grande	Algodão	Lisa	Algodão	Branco
	2	1 2	Circular	Grande	Algodão	Lisa	Algodão	Preto, amarelo e branco
	3	1 2	Circular	Grande	Granulosa	Lisa	Achatada	Branco
	4	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Amarronzado
	5	1 2	Circular	Pequena	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branco

	6	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG T12 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
YEPG T12 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
	2	1 2	Irregular	Grande	Algodão	Sem borda	Algodão	Branco
YEPG T12 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG T12 ESP	1	1 2	Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG FINAL ESP.(2)	1	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	0	Creme
	3	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	0	Creme transparente
YEPG T24 ESP	1	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Branca
	2	1	Circular	Média		Lisa	0	Creme

	3	2 1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	0	Creme transparente
YEPG T24 ESP	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
YEPG T24 ESP	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Creme
YEPG T24 ESP	1 2	1 2 1 2	Circular Circular	Grande Grande	Algodão Estria Concêntrica	Lisa Lisa	Algodão Lisa, Convexa e com cume central	Branco Creme
A.N. T0 CA11	1 2	1 2 1 2	Circular Circular	Média Pequena	Estria Concêntrica Estria Concêntrica	Lisa Lisa	Lisa e convexa Lisa e convexa	Branco pálido Branco pálido
A.N. T0 CA11	1 2 3	1 2 1 2 1	Circular Circular Circular	Média Pequena Média/Grande	Estria Concêntrica Estria Concêntrica	Lisa Lisa Lisa	Lisa e convexa Lisa e convexa Lisa, Convexa e com cume central	Branco, pálido e com brilho Branco pálido Cinza amarelo claro

	4	1 2	Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Cinza amarelo claro
	5	1 2	Circular	Média	Granulosa	Lisa	Granulosa	Muito branca
	6	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Verde claro
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo claro
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo alaranjado
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Esverdeada
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo alaranjado
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	3	1	Circular	Grande		Lisa		

		2			Estria Concêntrica		Lisa e crateriforme	Creme acinzentado
	4	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo brilhante
A.N. T0 CA11	1	1 2	Irregular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Lisa	0	Amarelo alaranjado
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	0	Amarelo claro
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	0	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	0	Branco pálido
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo
	2	1 2	Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo alaranjado
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarela
	2	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca pálida e transparente
	3	1	Circular	Média		Lisa		Branca



		2			Estria Concêntrica		Lisa e convexa	
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	5	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca pálida e transparente
A.N. T0 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Esverdeada
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Rosa claro
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T12 CA11	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Branco pálido
A.N. T12 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca pálida e com brilho
A.N. T12 CA11	1	1 2	Irregular	Grande/Média	Granulosa	Cronada	Achatada	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco, pálido e com brilho
	3	1 2	Irregular	Grande	Granulosa	Filamentosa	Achatada e pragueada	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e crateriforme	Branco pálido

A,N, T24 CA11	1	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca pálida e com brilho
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Rosa amarelado
	3	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A,N, T24 CA11	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Creme
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Transparente e branco
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca
	3	1 2	Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e crateriforme	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Quase transparente
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo alaranjado
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Esverdeada
	3	1	Circular	Média/Pequena		Lisa		Branco pálido

		2			Estria Concêntrica		Lisa e convexa	
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarela
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Achatada	Branco pálido
	2	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
	3	1 2	Irregular	Muito Grande	Estria Concêntrica	Ondulada	Achatada	Branco pálido
	4	1 2	Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Ondulada	Lisa e crateriforme	Branco pálido
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branca
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo claro
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco
A.N. T0 ESP	1	1 2	Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo alaranjado
	2	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo pálido
	3	1 2	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Amarelo dourado
	4	1 2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco
	1	1	Circular	Média/Grande		Lisa		Branco pálido

A.N. T0 ESP	2	2	Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido				
		1 2			Estria Concêntrica		Lisa e convexa					
A.N. T12 ESP	1	1	Irregular	Grande	Estria Concêntrica	Ondulada	Achatada	Amarelo pálido				
		2			2		Circular	Grande	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa, Convexa e com cume central	Branco pálido
		3			1 2		Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
A.N. T24 ESP	1	1	Circular	Média	Estria Concêntrica	Lisa	Achatada	Branco pálido				
		2			1 2		Circular	Pequena	Estria Concêntrica	Lisa	Lisa e convexa	Branco pálido
		3			1 2		Irregular	Muito Grande	Estria Concêntrica	Ondulada	Achatada	Branco pálido
		4			1 2		Circular	Média/Grande	Estria Concêntrica	Ondulada	Lisa e crateriforme	Branco pálido

T0 = início de fermentação; T12 = 12 h de fermentação; T24 = final de fermentação (24 h).

Tabela 2- Identificação e score dos isolados por MALDI-ToF.

<b>Tratamento</b>	<b>ID</b>	<b>Levedura</b>	<b>Score</b>	<b>ID</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Score</b>
T0 TC	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.003	45	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.921	46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.101
	3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.91	47	<i>Pseudoxantomonas sp.</i>	1.867
	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.92	48	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.797
	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.997	50	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.87
	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.971	51	NI	-
	7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		60	<i>Pseudoxantomonas sp.</i>	1.752
	8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.989	61	NI	-
	10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.971	62	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.024
	11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.866	63	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.749
	12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.949	64	NI	-
	13	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.962	65	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.722
	18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.828	66	NI	-
	19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.829	68	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.759
	21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.946	69	NI	-
	22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.996	70	<i>Bacillus sp.</i>	1.79
	23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.927	71	NI	-
	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.844	73	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.99
	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.044	76	NI	-
	26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.878	79	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.741
	27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.859	83	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.125
	28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.959	84	<i>Bacillus sp.</i>	
	29	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.745	87	NI	-
	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.952	91	NI	-
	31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.901	93	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.023
	32	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	2.055	102 <sup>a</sup>	<i>Pseudoxantomonas sp.</i>	1.95

	33	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.996	103	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.071
	34	NI	-	105	<i>Bacillus megaterium</i>	2.252
	35	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	2.03	110	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.925
	36	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.933	47b	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.156
	37	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.908			
	38	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.896			
	39	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.964			
	40	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.939			
	41	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.983			
	42	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.978			
T12 TC	122	NI	-	72	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.866
	123	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.568	74	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.921
	124	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.564	75	NI	-
	125	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.554	77	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.968
	126	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.545	78	NI	-
	127	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.584	85	NI	-
	128	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.547	86	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.759
	129	NI	-	90	<i>Bacillus cereus</i>	2.03
				104	<i>Bacillus simplex</i>	1.809
				106	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.538
				107	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	2.222
				109	<i>Bacillus megaterium</i>	2.095
T24 TC	112	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.454	57	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.912
	113	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.793	94	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.78
	114	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.5	58	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2.332
	115	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.525			
	116	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.478			
	117	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.562			
	118	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.749			

	119	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.921			
	120	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.528			
	121	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.563			
T0 TE	9	NI	-	43	NI	-
	15	NI	-	44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.871
	16	NI	-	53	<i>Pseudoxantomonas sp.</i>	2.167
	132	<i>Candida valida</i>	2.042	54	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.164
	133	<i>Candida valida</i>	1.849	55	NI	-
	134	<i>Candida valida</i>	1.87	56	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.837
	135	<i>Candida valida</i>	1.866	59	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.123
	138	<i>Candida valida</i>	2.029	67	NI	-
	139	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	1.727	80	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.148
	140	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.723	88	<i>Pseudoxantomonas sp.</i>	1.925
	141	<i>Candida valida</i>	2.082	89	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.725
	148	<i>Candida valida</i>	2.021	92	NI	-
	149	<i>Candida valida</i>	2.159	95	<i>Bacillus sp.</i>	1.835
	151	<i>Candida valida</i>	2.115	96	<i>Microbacterium testaceum</i>	1.733
	152	NI	-	97	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.734
	153	<i>Candida valida</i>	2.012	99	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.865
	154	NI	-	111	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.822
	17	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.728			
	150	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.779			
T12 TE	130	<i>Schizosacchoromyces pombe</i>	2.066	98	NI	-
	131	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.43	100	<i>Bacillus marisflavi</i>	1.743
	136	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.619	101	NI	-
	137	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.59	108	<i>Bacillus megaterium</i>	2.2
	146	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.746	-	NI	-
	147	<i>Sacchoromyces cervisiae</i>	1.743	-	NI	-

T24 TE	142	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.62	49	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
	143	<i>Candida valida</i>	2.004	52	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.97
	144	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.494	81	<i>Bacillus cereus</i>	2.047
	145	<i>Sacchoromyces cerevisiae</i>	1.582	82	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.897

NI = não identificado. T0 = início de fermentação; T12 = 12 h de fermentação; T24 = final de fermentação (24 h). Score: acima de 2,0 = identificação em nível de espécie; 1,7-1,99= identificação em nível de gênero; abaixo de 1,7 = não identificado/sugerido.