



ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO E DE DUAS LINHAGENS DE LEVEDURA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

A. F. PEREIRA¹, P. H. A. SILVA², P. F. PINHEIRO³, L. M. BRAGA¹, C. A. PINHEIRO³

¹ Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Alimentos

³ Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Química e Física

E-mail: alexfper@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho foi avaliada a influência de duas linhagens de levedura (baixa fermentação (*Saflager*) e alta fermentação (*Safbrev*)) e três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, peptona de caseína e um pool de aminoácidos) nas concentrações 5 g.L⁻¹ e 25 g.L⁻¹, na composição do mosto durante a fermentação para produção da cachaça. As propriedades físico-químicas avaliadas foram: pH, acidez total, teor de sólidos solúveis e teor alcoólico, em amostras coletadas em 12, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação. As amostras de cachaça produzidas foram analisadas por cromatografia a gás, sendo que os alcoóis superiores, propan-1-ol, álcool isobutílico e álcool isoamílico tiveram comportamentos diferentes para as linhagens de leveduras de baixa fermentação e alta fermentação. A maior produção de etanol por consumo de substrato foi obtido pela linhagem de levedura *Saflager* (baixa fermentação) na fonte de nitrogênio sulfato de amônio, na concentração de 5 g.L⁻¹, nos mostos de cachaça.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação; Nitrogênio, Leveduras; Cachaça.

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos dos quais as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* participam são os mais difundidos mundialmente, sendo responsáveis por toda a produção industrial de bebidas alcoólicas do mundo (Pinheiro *et al.*, 2011). Do ponto de vista econômico e tecnológico, as leveduras supracitadas são, portanto, consideradas os microrganismos mais importantes. São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas, dentre eles destacam-se: a qualidade da matéria-prima, o método de condução do processo fermentativo, as práticas tecnológicas, as operações unitárias envolvidas no processamento e as características de maturação e envelhecimento do produto final (Silva *et al.*, 2009). Dessa forma, grande ênfase tem sido dada às leveduras e as condições de fermentação, pois é em função de seus metabolismos que são gerados os diversos tipos de bebidas alcoólicas (Stroppa, 2009).

Na produção de bebidas alcoólicas, a adição de fontes nitrogenadas ao mosto para complementação de nutrientes, tais como: sulfato de amônio, aminoácidos, amônia, uréia, proteína ou bases nitrogenadas podem constituir uma prática benéfica para a multiplicação e o

desenvolvimento do fermento, aumentando os índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo fermentativo. A levedura da fermentação alcoólica, espécie *Saccharomyces cerevisiae* é, portanto capaz de utilizar, além das fontes de nutrientes orgânicos, diversos compostos nitrogenados, iniciando-se o metabolismo através de diversos sistemas de transporte e absorção. Embora conveniente, se não for bem realizada, esta prática de enriquecimento nitrogenado pode prejudicar a qualidade do produto final, pois a produção de diversos compostos secundários, muitas vezes em excesso, é também influenciada pelos referidos substratos (Jeronimo, 2004).

Atualmente diversos são os métodos instrumentais que permitem um monitoramento eficiente dos processos fermentativos alcoólicos e de suas produtividades. Da mesma maneira, várias linhagens de leveduras podem ser empregadas nos diversos segmentos da indústria de bebidas. A escolha da linhagem pode influenciar significativamente a eficiência e a qualidade do processo fermentativo, bem como a qualidade química e sensorial do produto final. As leveduras são por si só, importantes produtoras de aroma (Silva, 2006).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são comumente classificadas em alta fermentação (tipo *ale*) e baixa fermentação (tipo *lager*), sendo que a principal diferença observada é que as leveduras de alta fermentação emergem para a superfície, carreadas pelas bolhas de CO₂, enquanto que as leveduras de baixa fermentação depositam-se no fundo da dorna no final do processo fermentativo. Segundo Venturini Filho (2010) também existe algumas diferenças bioquímicas entre estas duas cepas de leveduras, sendo que as leveduras de baixa fermentação tipo *lager*, possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose) e as leveduras de alta fermentação (tipo *ale*) são desprovidas desses genes MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose presente no meio fermentativo.

O etanol é proveniente do metabolismo principal das leveduras e, em paralelo, diversos compostos secundários, responsáveis pelo sabor e aroma das bebidas são produzidos em proporções menores, sendo de importância preponderante para a composição e a qualidade sensorial e físico-química das bebidas. No entanto, se produzidos em excesso, podem piorar a qualidade da bebida (Parazzi, 2008). As principais classes de compostos secundários já identificados em bebidas são: aldeídos, ésteres, alcoóis superiores, cetonas, ácidos graxos e seus ésteres, compostos fenólicos, mercaptanas e outros (Miranda, 2008).

Alguns alcoóis superiores são produzidos, metabolicamente, a partir de certos aminoácidos, sendo influenciados pela composição do meio e pelas suas características, tais como concentração e fonte de nitrogênio, tipo de açúcares, pH, temperatura, grau de aeração durante a fermentação e linhagem da levedura (Pereira, 2007). Alguns estudos de complementação nitrogenada em fermentação alcoólica foram conduzidos utilizando adubos nitrogenados, tais como: como sulfato de amônia, superfosfato simples e uréia, mas é importante testar outras fontes nitrogenadas, como os aminoácidos, visto que os alcoóis superiores são formados a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras, ocasião em que cetoácido envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução a álcool superior. Em excesso, estes compostos podem prejudicar a qualidade da cachaça.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: i) avaliar três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, peptona de caseína e um pool de aminoácidos) em duas concentrações (5 g.L⁻¹ e 25

g.L⁻¹) e o uso de duas linhagens de leveduras (baixa e alta fermentação) na composição do mosto de cachaça; ii) realizar um estudo das propriedades físico-químicas das amostras em diferentes de tempos de processamento; iii) avaliar a formação de compostos secundários na cachaça por cromatografia a gás.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do mosto de Fermentação

Para o preparo do inóculo foram utilizadas duas linhagens de leveduras, obtidas na forma liofilizada, da empresa Agromalte Ltda. A primeira linhagem utilizada foi a *Saflager* W-34/70 (baixa fermentação). Desta foi aferida a massa de 2,4 gramas, que foi posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C. A suspensão resultante foi dividida em duas partes de 50 mL e cada parte foi adicionada a diferentes balões de vidro com 3000 mL de mosto. Foi feito o mesmo procedimento de preparação do inóculo com a levedura *Safbrew* S-33 (alta fermentação), que foi pesada de acordo com a recomendação do fabricante, 1,5 gramas e posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C.

No preparo do mosto foi utilizado caldo de cana-de-açúcar, recém-cortada, submetida à moagem. O caldo foi filtrado e diluído com água destilada até um teor de sólidos solúveis de 14 °Brix. Foi adicionado o fosfato dibásico de potássio, na concentração de 0,1 g.L⁻¹ e o sulfato de magnésio heptahidratado, na concentração de 0,2 g.L⁻¹, como fontes de potássio e magnésio, respectivamente, sendo estas fontes usadas para enriquecimento mineral do meio.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2x3x2) em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizadas as duas linhagens de levedura: *Saflager* W-34/70 (baixa fermentação) e *Safbrew* S-33 (alta fermentação) e as três fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona de caseína e um pool de aminoácidos em duas concentrações, 5 g.L⁻¹ e 25 g.L⁻¹ e o controle (sem adição da fonte de nitrogênio). Os compostos secundários da cachaça, obtidos durante o processo fermentativo foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste Duncan, adotando-se 5% de probabilidade, utilizou-se o programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1, para efetuar as análises estatísticas.

No primeiro tratamento foi mantido apenas o caldo de cana-de-açúcar, sem adição de nitrogênio (controle), no segundo tratamento foi adicionado 5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio de alto grau de pureza da empresa Merck, no caldo de cana-de-açúcar. No terceiro tratamento foi adicionado 25 g.L⁻¹ de sulfato de amônio de alto grau de pureza da empresa Merck, no caldo de cana-de-açúcar. Foi repetido este procedimento para as outras fontes de nitrogênio, a peptona de caseína e um pool de aminoácidos, nas mesmas concentrações utilizadas do sulfato de amônio. O pool de aminoácidos foi composto pelos seguintes aminoácidos: arginina, treonina, serina, aspartato e isoleucina (na mesma proporção), estes podem ser considerados uma das melhores fontes de nitrogênio para as leveduras (Dutra *et al.*, 1999).

As fermentações foram conduzidas à temperatura ajustada de 28 °C em balões de vidro com um volume de 3000 mL de mosto. Coletaram-se 100 mL das amostras dos mostos fermentados de

cachaça em um béquer, antes do início da fermentação (0 horas), 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a inoculação da levedura. Foram realizadas as seguintes análises para cada amostra coletada: teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, teor alcoólico e acidez total. Após a obtenção do caldo de cana-de-açúcar fermentado foi realizado o processo de destilação em um alambique de cobre, com capacidade de 10 litros, para obtenção da cachaça.

2.2. Análises Físico-Químicas

Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix): Para a medida do teor de sólidos solúveis nas amostras de cachaça empregou-se um refratômetro tipo Brix, utilizado na medição da concentração de açúcar em alimentos em geral, principalmente na indústria de bebidas e refrigerantes, com escala de (0 a 32) °Brix. (Zenebon *et al.*, 2008).

Determinação do teor alcoólico por picnometria: A densidade das amostras de cachaça foram aferidas a 20 °C pelo Método do Picnômetro. Os valores encontrados foram comparados com uma tabela (densidade x grau alcoólico) e foram determinados os teores alcoólicos em °GL (% v v⁻¹) das amostras (A.O.A.C., 1995).

Medida da acidez total: Para determinar a acidez total foram medidos 100 mL de cada amostra para erlenmeyers de 500 mL, onde foi adicionado 0,5 mL de indicador fenolftaleína para posterior titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ padronizada, até coloração rósea (Zenebon *et al.*, 2008).

Análise das amostras de cachaça por cromatografia a gás: Foram analisados os principais compostos secundários, responsáveis pelo sabor e aroma da cachaça e determinados pela Instrução Normativa 13/2005, entre eles: acetaldeído, acetato de etila, metanol, alcoóis superiores (propan-1-ol, álcool isobutílico e álcool isoamílico) (BRASIL, 2005). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-17 A, modelo Shimadzu QP5050, com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar de sílica fundida PAG (polialqueno glicol) de caráter polar, com as seguintes dimensões: (30 metros de comprimento x 0,25 mm de espessura do filme x 0,25 µm de diâmetro interno) e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste (Zenebon *et al.*, 2008).

Para a quantificação dos constituintes da cachaça foi utilizado o método do padrão externo, sendo utilizados os padrões: acetaldeído, acetato de etila, metanol, propan-1-ol, álcool isobutílico e álcool isoamílico, da empresa Merck, todos com pureza acima de 99%. A temperatura inicial da coluna foi de 35 °C por 5 minutos; programada para subir em uma taxa de 10 °C por minuto até 120 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 180 °C, a temperatura do detector foi de 200 °C e o tempo de corrida foi de 32,5 minutos. A vazão da chama (H₂) usada foi de 20 mL.min⁻¹, a vazão do ar sintético foi de 175 mL.min⁻¹ e a vazão do gás de arraste (He) foi de 1 mL.min⁻¹. A razão de divisão (split) utilizada foi de 1:2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência da adição de fonte de nitrogênio na cinética de fermentação

Os valores de acidez encontrados nos mostos para produção de cachaça foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Variação da acidez nas amostras de cachaça (gramas de ácido acético por 100 mL de amostra).

Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (<i>Saflager</i>)			Alta fermentação (<i>Safbrew</i>)		
	Sulfato amônio	Peptona caseína	Pool aminoácidos	Sulfato amônio	Peptona caseína	Pool aminoácidos
12	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07
24	0,08	0,07	0,07	0,17	0,16	0,18
48	0,25	0,26	0,26	0,26	0,26	0,27
72	0,34	0,37	0,30	0,25	0,27	0,32
96	0,37	0,38	0,31	0,29	0,28	0,33

A acidez aumentou no mosto com o decorrer do tempo de fermentação em todas as fontes nitrogenadas. Uma elevação da acidez durante o avanço do processo fermentativo é normal devido à presença de bactérias acéticas no mosto. As relações entre o teor de sólidos solúveis (°Brix) e de etanol produzido (°GL) pelas linhagens de levedura de baixa fermentação (*Saflager*) e alta fermentação (*Safbrew*), nas concentrações de 0 (controle), 5 e 25 g.L⁻¹ das três fontes de nitrogênio, sulfato de amônio, peptona de caseína e um pool de aminoácidos foram demonstradas nas Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F.

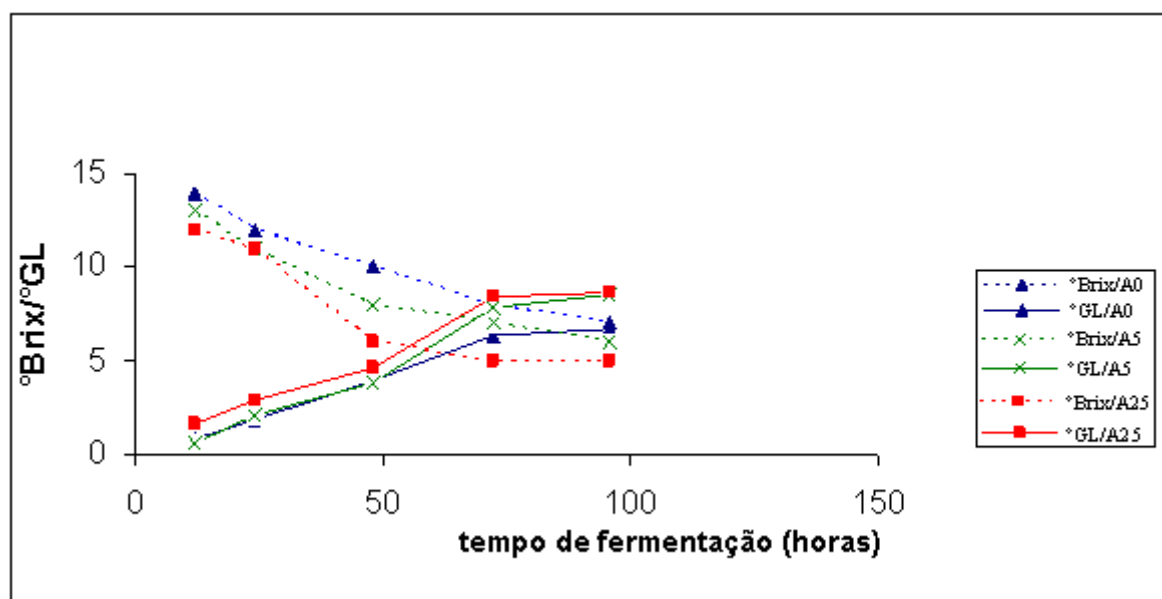


Figura 1A - Levedura baixa fermentação *Saflager*, com sulfato de amônio.

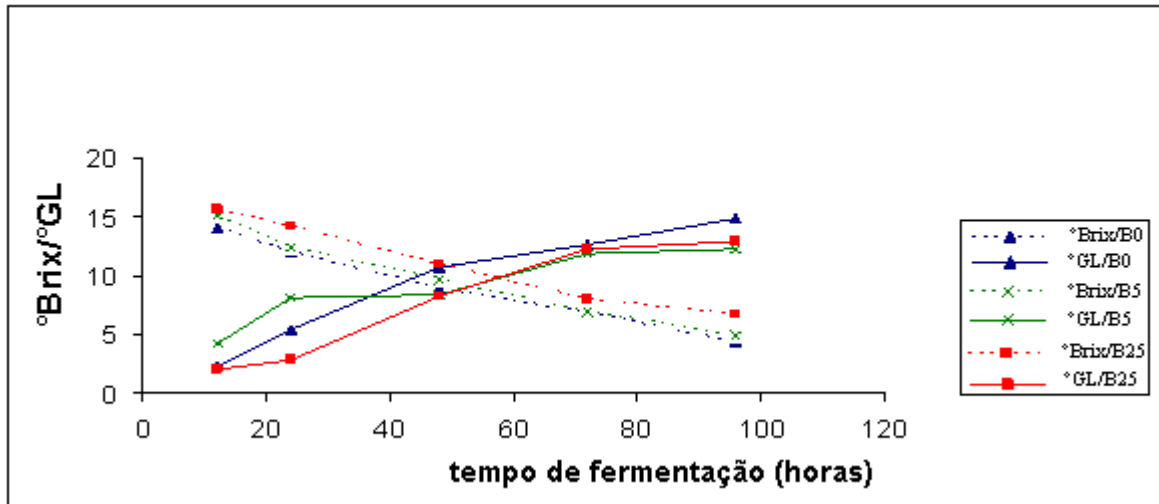


Figura 1B - Levedura alta fermentação *Safbrew* com sulfato de amônio.

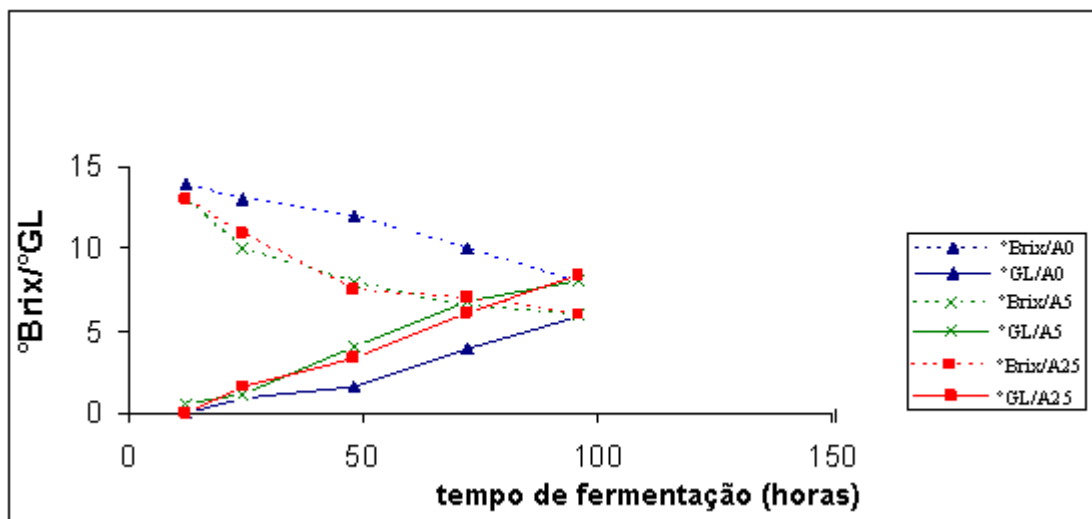


Figura 1C - Levedura baixa fermentação *Saflager* com peptona de caseína.

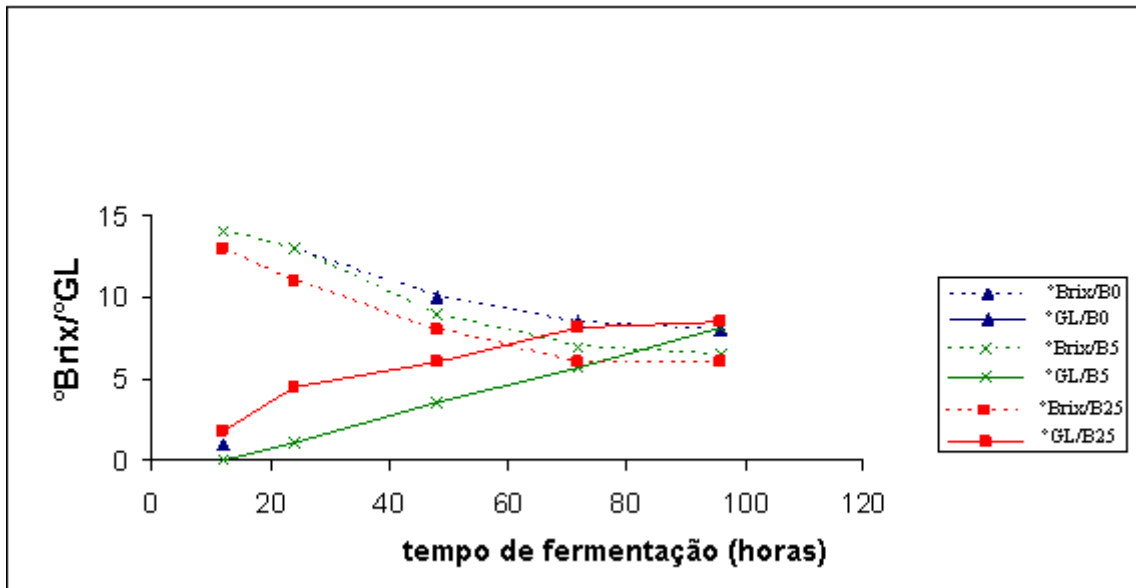


Figura 1D - Levedura alta fermentação *Safbrew* com peptona de caseína.

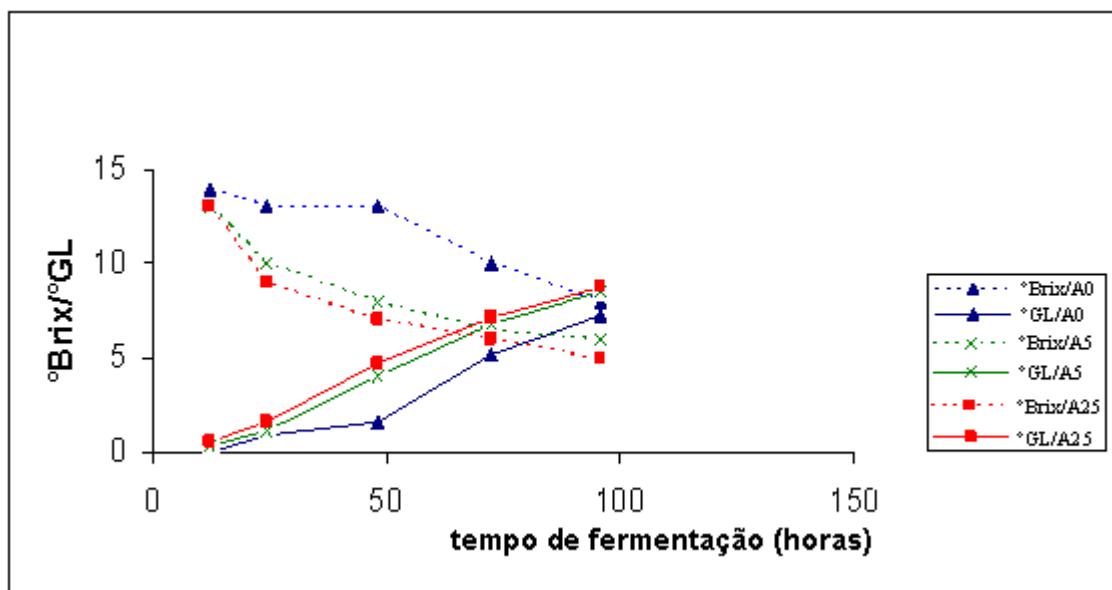


Figura 1E - Levedura baixa fermentação *Saflager* com pool de aminoácidos.

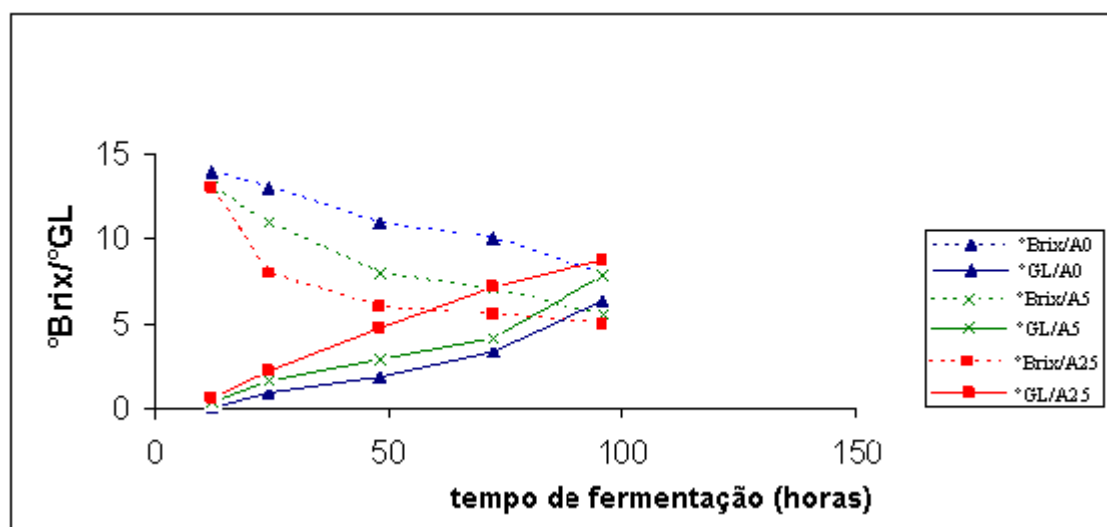


Figura 1F - Levedura alta fermentação *Safbrew* com pool de aminoácidos.

O maior rendimento, ou seja, a maior produção de etanol por consumo de substrato foi obtido na concentração de 5 g.L^{-1} , da fonte de nitrogênio sulfato de amônio, utilizando a levedura de baixa fermentação (Figura 1A).

Na Figura 1B estão representados os valores dos teores de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) e do etanol produzido pela linhagem de levedura de alta fermentação, adicionada da fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em duas concentrações 5 g.L^{-1} e 25 g.L^{-1} e o controle. Nesta situação, a adição de sulfato de amônio diminuiu o rendimento da fermentação alcoólica.

A quantidade de etanol produzido pelo processo fermentativo foi maior com o aumento da concentração da fonte nitrogenada peptona de caseína, com a levedura de baixa fermentação (Figura 1C). Entretanto, esta observação não foi similar, com a levedura de alta fermentação e a mesma fonte nitrogenada, pois, nesta situação, o teor de etanol foi inferior com o aumento da concentração da peptona de caseína (Figura 1D).

Utilizando as linhagens de levedura de baixa fermentação (*Saflager*) e de alta fermentação (*Safbrew*) e adição de pool de aminoácidos, o rendimento da fermentação alcoólica foi menor com o aumento da concentração do pool de aminoácidos (Figuras 1E e 1F).

O pH desejável em mostos de cana-de-açúcar para produção de cachaça, situa-se normalmente entre 4,0 e 5,0. Durante a fermentação do mosto neste experimento, o pH variou de 5,4 (máximo) a 3,0 (mínimo). Estes valores estão bem próximos aos desejáveis para fermentação alcoólica.

3.2. Influência da adição de fonte de nitrogênio na produção de compostos voláteis

A Figura 2 representa um cromatograma típico das amostras de cachaça obtido por injeção direta de $1\mu\text{L}$ em um cromatógrafo a gás com uma coluna polar de polialquenoglicol (PAG) e detector de ionização de chama (FID).

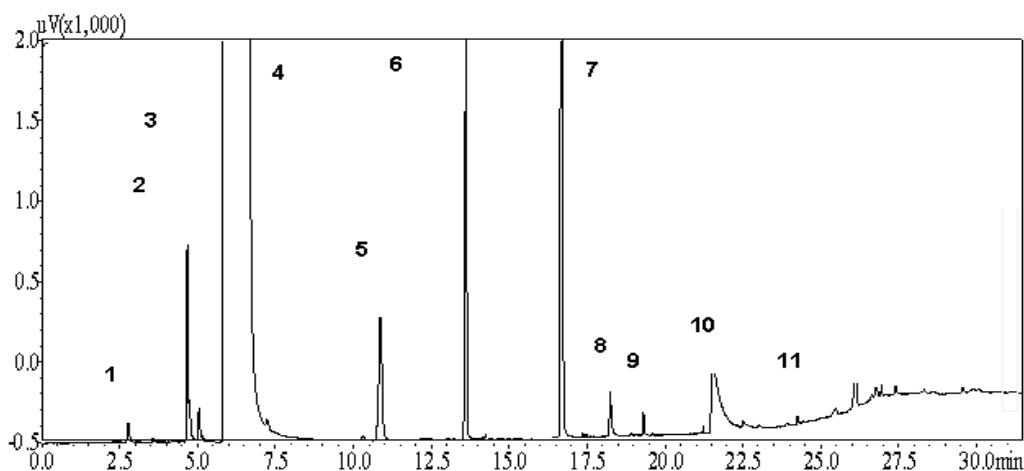


Figura 2 - Cromatograma típico das amostras de cachaça. (1) acetaldeído, (2) acetato de etila, (3) metanol, (4) etanol, (5) 1-propanol, (6) álcool isobutílico, (7) álcool isoamílico, (8) não identificado, (9) não identificado, (10) não identificado, (11) não identificado.

A concentração de acetaldeído, nas amostras de cachaça com as interações entre os tipos de leveduras e fontes de nitrogênio, não apresentou nenhuma fonte de variação significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo Teste F (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de variância da concentração do acetaldeído nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	13008,3 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	318463,0 n.s.
Concentração	2	64691,6 n.s.
Levedura x fonte de nitrogênio	2	44900,3 n.s.
Levedura x Concentração	2	51505,2 n.s.
Fonte de Nitrogênio x Concentração	4	51846,1 n.s.

* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores médios foram maiores na concentração de 5 g.L⁻¹ e na fonte nitrogenada peptona de caseína, apresentando um valor médio de 413,40 mg.L⁻¹ de amostra. O acetato de etila é um éster formado pelas leveduras em maior quantidade durante a fermentação alcoólica, para o referido composto, não foi observado efeito das interações, tipo de levedura e fontes de nitrogênio, desta forma foram avaliadas as fontes de variação de forma individual, sendo que não houve diferenças entre as duas leveduras *Saflager* (baixa fermentação) e *Safbrev* (alta fermentação). Houve um aumento nos valores do acetato de etila com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio. Na análise da influência das fontes nitrogenadas (Tabela 3) foi realizado um teste de médias (Duncan) ao nível de significância de 5 % de probabilidade. O sulfato de amônio foi a fonte nitrogenada que mais contribuiu para a formação do acetato de etila nas amostras de cachaça, seguido pelo pool de aminoácidos e pela peptona de caseína.

Tabela 3 - Comparação de médias para o acetato de etila nas diferentes fontes de nitrogênio.

Fontes de nitrogênio	Acetato de etila (mg/L)
Sulfato de amônio	1804,3 a
Pool de aminoácidos	1149,7 b
Peptona de caseína	716,7 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Duncan.

O metanol não é proveniente da atividade do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, mas da atividade de enzimas péclicas. A pectinesterase catalisa a desesterificação do metil éster do polímero do ácido poligalacturônico para formar ácido péctico, metanol e íons hidrogênio. O metanol não apresentou nenhuma fonte de variação significativa, sendo que na fonte de nitrogênio sulfato de amônio, o valor médio da concentração de metanol foi de 404,10 mg.L⁻¹ de amostra.

De acordo com Cardoso *et al.* (2013), os alcoóis superiores formados pela soma do propan-1-ol, álcool isobutílico e álcool isoamílico são juntamente com os ésteres, os principais compostos responsáveis pelo aroma e sabor da cachaça, além do seu "bouquet" característico. Entretanto, a sua concentração em excesso, piora de maneira significativa a qualidade do destilado.

Na análise do propan-1-ol, não houve efeito significativo das interações, desta forma foram avaliados os efeitos dos níveis dos fatores sobre as variáveis respostas de forma individual. Na Tabela 4 encontram-se os valores de sua média e desvio padrão.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão do propan-1-ol para as duas linhagens de levedura.

Leveduras e Concentrações de N₂	Média (mg L⁻¹)	Desvio padrão
<i>Saflager w-3470</i>	177,4	11,3
<i>Safbrev S-33</i>	202,1	15,0
0 g/L	171,3	4,8
5 g/L	206,1	5,4
25g/L	191,7	10,6

Para a análise da influência das fontes nitrogenadas (Tabela 5) foi realizado um teste de médias (Duncan) ao nível de significância de 5 % de probabilidade. As fontes nitrogenadas que mais contribuíram para a formação do propan-1-ol foram sulfato de amônio e peptona de caseína; o pool de aminoácidos foi o que menos influenciou na formação de propan-1-ol

Tabela 5 - Comparação de médias para o propan-1-ol nas diferentes fontes de nitrogênio.

Fontes de nitrogênio	Médias (mg L ⁻¹)
Sulfato de amônio	233,7 a
Peptona de caseína	218,0 a
Pool de aminoácidos	117,5 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Houve interação significativa entre os tipos de levedura, fontes de nitrogênio e concentração (Tabela 6), indicando a influência destes fatores na concentração do álcool isobutílico nas amostras de cachaça.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância da concentração do álcool isobutílico nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	34745,5 *
Fonte de nitrogênio	2	47359,3 *
Concentração	2	9421,5 n.s.
Levedura x fonte de nitrogênio	2	3876,8 *
Levedura x Concentração	2	13397,1 *
Fonte de Nitrogênio x Concentração	4	21446,7 *

* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

De acordo com a análise de regressão (Figura 3), os valores do álcool isobutílico reduziram com o aumento da concentração de nitrogênio em interação com a levedura *Saflager* (baixa fermentação).

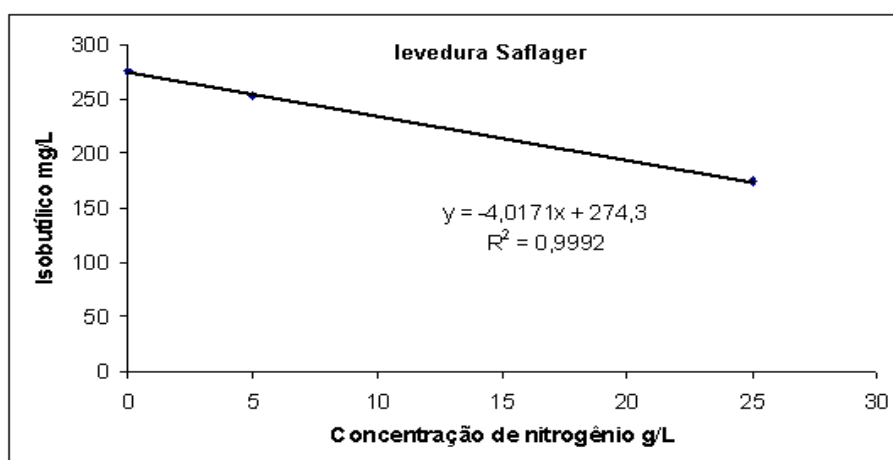


Figura 3 - Representação da concentração de álcool isobutílico em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura *Saflager*.

Os valores do álcool isobutílico reduziram com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio sulfato de amônio (Figura 4).

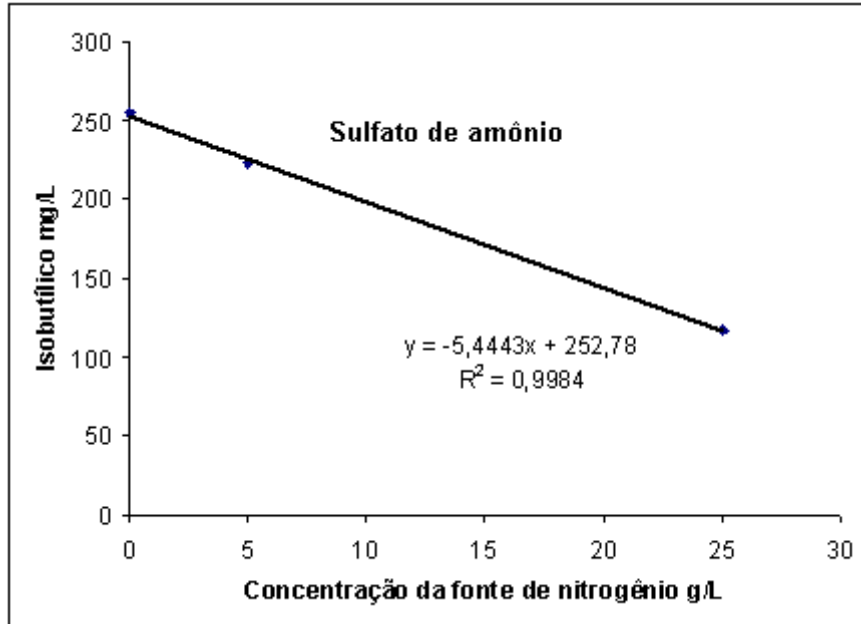


Figura 4 - Variação do álcool isobutílico com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio em diferentes concentrações.

Houve interação significativa entre os tipos de leveduras, fontes de nitrogênio e concentração (Tabela 7), indicando a influência destes fatores na concentração de álcool isoamílico nas amostras de cachaça.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância da concentração do álcool isoamílico nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	286926,3 *
Fonte de nitrogênio	2	1008596,9 *
Concentração	2	520911,4 *
Levedura x fonte de nitrogênio	2	108359,1 *
Levedura x Concentração	2	532051,4 *
Fonte de Nitrogênio x Concentração	4	198452,2 *

* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

De acordo com a Figura 5, o aumento da concentração da fonte nitrogenada e utilização da levedura de alta fermentação (*safbrew*), contribuíram de forma significativa para o aumento da concentração de álcool isoamílico nas amostras de cachaça.

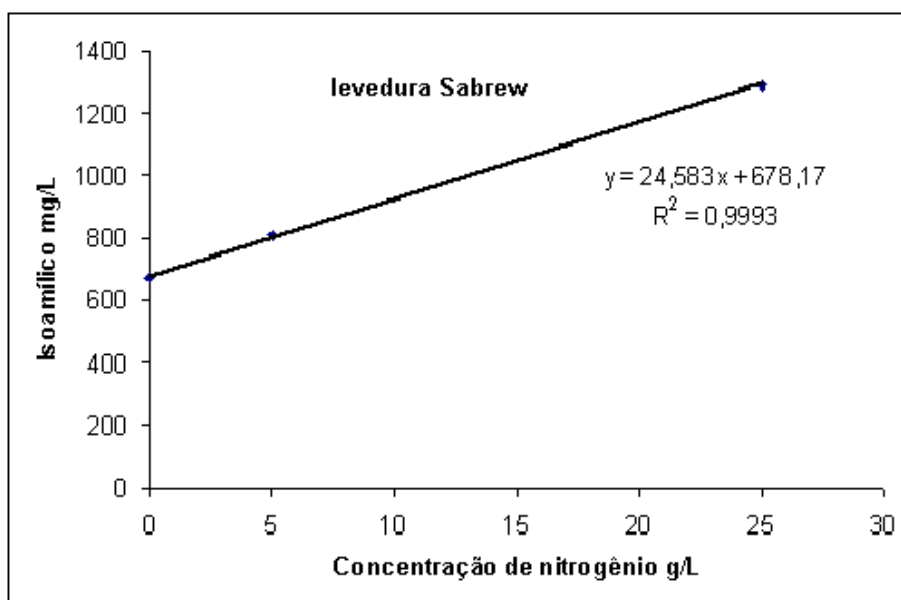


Figura 5 - Representação da concentração de isoamílico em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura *Safbrew*.

Na interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações (Figura 6) houve um aumento na concentração de álcool isoamílico, com a adição da fonte nitrogenada fornecida pelo pool de aminoácidos, visto que a produção destes alcoóis durante a fermentação alcoólica é influenciada principalmente pelas condições do meio, entre elas: a concentração de açúcares, o pH, o conteúdo e a fonte de nitrogênio disponível, a temperatura de fermentação, a aeração e a linhagem de levedura. Estes alcoóis superiores são formados a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras, ocasião em que cetoácido envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução a álcool superior.

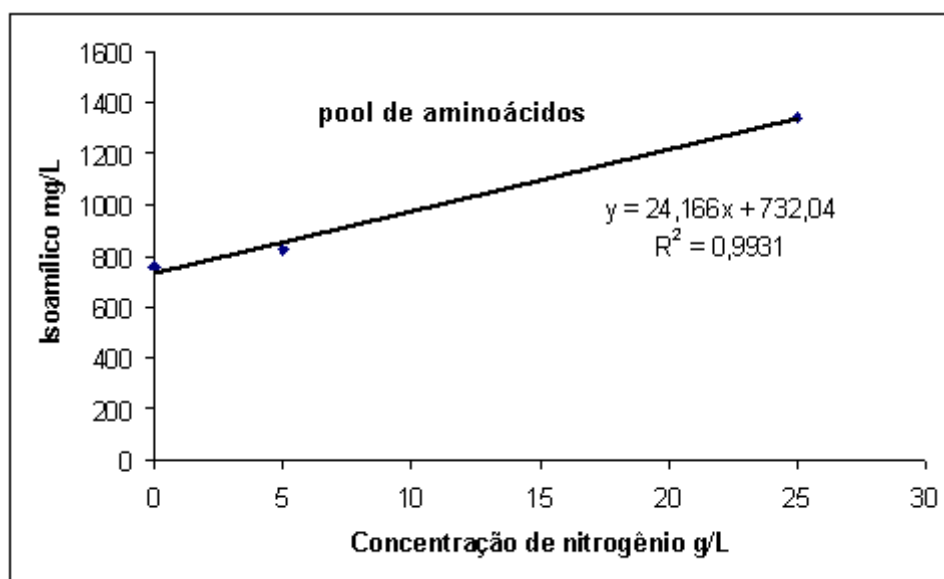


Figura 6 - Representação da interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações para o álcool isoamílico.

4. CONCLUSÃO

O maior rendimento da fermentação alcoólica, ou seja, maior produção de etanol por consumo de substrato foi obtido pela linhagem de levedura *Saflager* (baixa fermentação) na fonte de nitrogênio sulfato de amônio, na concentração de 5 g.L⁻¹, nos mostos de cachaça. As médias da concentração final de etanol nos mostos de fermentação foram 7,7 °GL. Com relação à produção de compostos secundários, os alcoóis superiores, propan-1-ol, álcool isobutílico e álcool isoamílico tiveram comportamentos diferentes nas amostras de cachaça para as duas linhagens de levedura (*Saflager* e *Safbrev*), para as três fontes de nitrogênio e para as diferentes concentrações de nitrogênio, 5 g.L⁻¹ e 25 g.L⁻¹. A adição de 5 g.L⁻¹ das fontes nitrogenadas já foi suficiente para elevar as concentrações dos alcoóis superiores nas amostras de cachaça.

A etapa de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas é de fundamental importância. Ficou evidente que a produção dos compostos secundários, responsáveis pelo aroma e sabor das bebidas é influenciada pela linhagem da levedura, pela concentração e fonte de nitrogênio. É preciso um maior controle ao adicionar fontes nitrogenadas para enriquecimento do meio de fermentação com a finalidade de aumento de produtividade e rendimento, pois esta prática pode na realidade piorar a qualidade do produto final. O controle de todas as variáveis do processo de fermentação alcoólica é necessário para a produção de bebidas alcoólicas de alta qualidade e seguras para o consumo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.47) Arlington: A.O.A.C., chapter 26. p.6, 1995.

BRASIL, Instrução Normativa nº13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial, Brasília, 30 de junho de 2005. Seção 1.

CARDOSO, M. G. Produção de Aguardente de Cana. 3º Edição. Lavras: UFLA, 340p. 2013.

DUTRA, S. V.; DAUDT, E. C.; SOUZA, M. Aminoácidos livres e ureia durante a fermentação de mosto de chardonnay com diferentes leveduras. Ciência e Tecnologia de Alimentos v.19, n.2, Campinas maio/ago. 1999.

JERONIMO, E. M. O nitrogênio proteico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça. 2004. 130p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - UNICAMP/FEA, Campinas: 2004.

MARINHO, A. V.; RODRIGUES, J. P. M.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação da acidez volátil, teor alcoólico e de cobre em cachaças artesanais. Estudos, Goiânia, v. 36, n. 1/2, p. 785-787, 2009.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. Food Science and Technology, Campinas, v. 28, p. 84-89, 2008.

PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.

PEREIRA, A. F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. 2007. 99p. Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PINHEIRO, P. C.; LEAL, M.; ARAÚJO, D. A. Origem, produção e composição química da cachaça. Química Nova na Escola, n. 18, p. 3-8, 2003.

SILVA, C. L. C.; ROSA, C. A.; MAIA, A. B. R. A.; OLIVEIRA, E. S. Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não-produtoras de H₂S e de referência). Curitiba: Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 24, n. 2, p. 405-422, 2006.

SILVA, P. H. A.; SANTOS, J. O.; ARAÚJO, L. D.; FARIA, F. C.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; BRANDÃO, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 1, p. 100-106, 2009.

STROPPIA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

VENTURINI FILHO, V. G. Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia. São Paulo: Blücher, v.1, cap. 2, p.26-27, 2010.

ZENEBO, O.; PASCUCT, N. S.; TIGLEA, P.; Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 919p. 2008.