

MAYARA SALGADO SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO PARA PRODUÇÃO DE
HIDROMEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586d
2016 Silva, Mayara Salgado, 1989-
 Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel /
Mayara Salgado Silva. – Viçosa, MG, 2016.
 xii, 108f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Monique Renon Eller.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.90-101.

1. Fermentação. 2. Produtos das Abelha. 3. Processos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

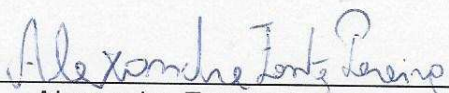
CDD 22 ed. 663.13

MAYARA SALGADO SILVA

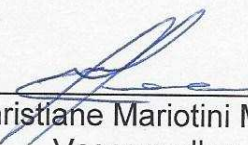
**DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO PARA PRODUÇÃO DE
HIDROMEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor scientiae*.

APROVADA: 01 de novembro de 2016



Alexandre Fontes Pereira



Christiane Mariotini Moura
Vasconcellos



Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)



Weyder Cristiano Santana
(Coorientador)



Monique Renon Eller
(Orientadora)

“O homem científico não pretende alcançar um resultado imediato. Ele não espera que suas ideias avançadas sejam imediatamente aceitas. Seus trabalhos são como sementes para o futuro. Seu dever é lançar as bases para aqueles que estão por vir e apontar o caminho.”

(Nikola Tesla)

Ao meu companheiro Rômulo Maia Ayres e meu filho Felipe Kauã Silva do Nascimento por suportarem ao meu lado toda a carga dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO

Agradeço inicialmente à Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) pelo financiamento de minha pesquisa através do Programa de Apoio à Pesquisa para Jovens Docentes Pesquisadores (FUNARPEQ), bem como o financiamento de bolsa de iniciação científica pelo Programa de Apoio a Iniciação Científica (FUNARBIC).

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento de bolsas pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PROBIC).

Ao Departamento de Tecnologia em Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV) por possibilitar minha pesquisa.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL) pelo apoio com interpretação de dados.

À minha orientadora Monique Renon Eller, por ter me ajudado a construir e concretizar meu sonho de papel, com a qual aprendi coisas além do conhecimento acadêmico como integridade e dedicação.

Aos coorientadores Luciano Gomes Fietto, Paulo Henrique Alves da Silva e Weyder Cristiano Santana, pelos ensinamentos e orientações que tornaram minha pesquisa mais completa.

À Alexandre Fontes Pereira, Fernando Augusto da Silveira, Luanda Medeiros e Valquiria Junia Campos pelas orientações e assistência com métodos e análises.

À minha amiga María Ximena Díaz Ramírez por ter me acompanhado em toda caminhada árdua, gaugada a duras penas sobre sonhos e frustrações.

Aos meus bolsistas Luciana Marina Arruda e Pedro Lanna Xavier, bem como aos estagiários Walter Silva Braga Stange, Eduardo Luis Menezes de Almeida, Josimar Elerate e Ana Flavia Costa pela disciplina e obediência, sem os quais eu jamais teria terminado o doutorado a tempo.

Ao Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos (LAPROBIQ) por proporcionar descontrações e apoio amigo.

À minha família pelo apoio e credibilidade.

Ao meu mentor Pahlevi Augusto de Souza (IFCE – Campus Limoeiro), por acreditar no meu sonho ainda que eu duvidasse.

Ao meu diretor José Façanha Gadelha (IFCE – Campus Limoeiro), pela credibilidade e apoio amigo.

Ao Instituto Federal do Ceará (IFCE) por possibilitar minha estadia e investir no meu aprimoramento.

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

MAYARA SALGADO SILVA, filha de Maria das Graças Salgado Silva, nasceu em Limoeiro do Norte, Ceará no dia 07 de fevereiro de 1989.

Em janeiro de 2010, graduou-se como Tecnóloga em Alimentos pelo Instituto Federal do Ceará campus Limoeiro do Norte.

Em janeiro de 2011 assumiu o cargo de Professor de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico pelo Instituto Federal do Ceará campus Limoeiro do Norte.

Em dezembro de 2013 conclui o Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, na área de Processamento de Frutos.

Em agosto de 2014, ingressou no Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, na área de Processos Bioquímicos e Fermentativos.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA – PRODUÇÃO DE HIDROMEL	4
1. HIDROMEL	4
1.1. Histórico de produção	4
1.2. Definições e Legislações	5
1.3. Importância econômica.....	6
2. PRODUÇÃO DE HIDROMEL	8
3. REVISÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO	11
3.1. Características das leveduras e do mel	11
3.2. Nutriente e suplementação	13
3.3. Uso de conservantes	14
3.4. Clarificação	15
3.5. Compostos aromáticos no produto final.....	16
4. CONCLUSÃO E DESAFIOS.....	19
CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS APÍCOLAS PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS	20
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Isolamento e manutenção das leveduras	23
2.2. Caracterização morfológica	24

2.3. Identificação de isolados por meio do sequenciamento.....	25
2.4. Seleção preliminar de linhagens.....	26
2.5. Tolerância das linhagens a condições de estresse.....	26
2.6. Caracterização tecnológica das linhagens.....	27
2.7. Delineamento estatístico.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
3.1. Isolamento e caracterização morfológica de leveduras.....	29
3.2. Identificação das linhagens.....	31
3.3. Seleção preliminar das linhagens.....	34
3.4. Testes de tolerância.....	36
3.5. Caracterização tecnológica das linhagens.....	44
4. CONCLUSÕES.....	51
ANEXOS.....	52
CAPÍTULO 3: TEMPERATURA IDEAL PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL COM LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS DE ABELHAS NATIVAS.....	54
RESUMO.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.1. Preparo do pré-inóculo e inoculação no mosto.....	56
2.2. Acompanhamento do processo fermentativo.....	56
2.3. Delineamento estatístico.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
3.1. Acompanhamento do processo fermentativo.....	57
3.2. Características do produto final.....	63

4. CONCLUSÕES.....	67
CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DE HIDROMEL SUAVE COM LEVEDURAS SELECIONADAS DE PRODUTOS DE ABELHAS NATIVAS	68
RESUMO	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1. Matéria-prima.....	70
2.2. Produção do hidromel.....	70
2.2.1. Pré-inóculo.....	70
2.2.2. Preparo do mosto e inoculação	71
2.2.3. Acompanhamento do processo fermentativo.....	71
2.2.4 Métodos Analíticos.....	72
2.3. Teste afetivo de aceitação por escala hedônica	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
3.1. Análise físico-química da matéria-prima	74
3.2. Produção do hidromel.....	75
3.3. Análise de compostos voláteis no produto final	79
3.4. Análise sensorial dos hidroméis.....	85
4. CONCLUSÕES.....	86
ANEXOS.....	87
CONCLUSÕES GERAIS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS.....	102
ANEXO 1: FINANCIAMENTOS E ATIVIDADES ACADÊMICAS ADICIONAIS VINCULADAS À TESE.	102

ANEXO 2: RESUMOS SIMPLES APRESENTADOS NO SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA (SIA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA EM 2016.....	104
ANEXO 3: RESUMOS SIMPLES SUBMETIDOS AO III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA (SIMB).....	107

RESUMO

SILVA, Mayara Salgado, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto, Paulo Henrique Alves da Silva e Weyder Cristiano Santana.

O objetivo deste trabalho foi o isolamento de linhagens de leveduras a partir de produtos de abelhas nativas e exóticas, para tanto linhagens de leveduras foram isoladas a partir de méis e pólen apícola de abelhas *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí) e *Apis mellifera*. Ao todo 19 leveduras foram isoladas, das quais 9 foram identificadas como *Starmerella meliponinorum*, 1 *Papiliotrema flavescens*, 2 *Rhodotorula mucilaginosa*, duas *Candida apícola* e 5 como *Saccharomyces cerevisiae*. Estas linhagens foram submetidas a estresse de 5% (v/v) de etanol e 20% (m/v) de glicose. Sete linhagens foram selecionadas e testadas quanto à tolerância a diferentes concentrações de glicose, etanol e metabissulfito de sódio, das quais selecionou-se JP14, IM8 e IP9, identificadas como *S. cerevisiae*, para produção de bebidas. Estas linhagens foram testadas em temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C, onde JP14 mostrou-se aptas para fermentações em temperaturas inferiores, e a temperatura de 20 °C foi caracterizada como ideal e comum às três linhagens, proporcionando um hidromel de menor acidez volátil, maior consumo de açúcares e maior teor alcoólico. Com a temperatura definida, iniciou-se a fermentação do mosto que durou 35 dias seguidos por 35 dias de maturação, onde determinou-se consumo de açúcares, contagem de leveduras, turbidez, teor alcoólico, acidez total, volátil e fixa, e compostos voláteis. O melhor tempo de maturação foi de 28 dias. Os 3 hidroméis apresentaram perfil de compostos voláteis diferentes, e após a análise sensorial exibiram pontuações que variaram entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, entretanto os provadores não identificaram diferença entre eles. Assim foi possível desenvolver com sucesso fermentos a partir de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de produtos de abelhas sem ferrão para produção de hidromel, consideradas seguras na produção de bebidas.

ABSTRACT

SILVA, Mayara Salgado, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2016. **Leaven development for mead production.** Adviser: Monique Renon Eller. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto, Paulo Henrique Alves da Silva and Weyder Cristiano Santana.

The objective of this study is isolation of yeast strains from products of exotic and native bees. Yeast strains have been isolated from honey and bee bread of *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí) and *Apis mellifera* bees. In total, 19 strains were isolated, 9 of which were identified by sequencing as *Starmerella meliponinorum*, 1 as *Papiliotrema flavescens*, 2 as *Rhodotorula mucilaginosa*, 2 as *Candida apícola* and 5 as *Saccharomyces cerevisiae*, being subjected to stress at 5% (v / v) ethanol and 20% (w / v) glucose. Seven strains were selected and tested by tolerance for different concentrations of glucose, ethanol and sodium metabisulphite. *S. cerevisiae* JP14, IM8 and IP9 strains were selected as for the production of drinks. These strains were tested at temperatures of 15, 20, 25 and 30 ° C, JP14 and IM8 have proved being suitable for adaptation and fermentation at lower temperatures, the temperature of 20 ° C was characterized as ideal and common to all, providing mead with less acidity volatile , higher consumption of sugars and higher alcohol content. With the fixed temperature, the fermentation was begun during 35 days followed by 35 days of maturation, during this time, consumption of sugars, yeast count, turbidity, alcohol content, total acidity, volatile acidity, fixed acidity and volatile compounds were quantified. The best maturation time was 28 days under the conditions tested. The meads showed different profile of volatile compounds, and scores ranging from "I liked it slightly" and "I liked it moderately", however after the sensory analysis, testers didn't identified difference between them. Thus it was possible to develop with success ferments from isolated *S. cerevisiae* strains of stingless bee products for mead production, considered safe and unrestricted use in beverage production.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o oitavo maior produtor de mel, mas devido às condições de produção e armazenamento inadequado de alguns produtores, a conservação deste é comprometida, passando a não apresentar características próprias para exportação, o que diminui seu valor comercial. Além disso, embora seja considerado microbiologicamente estável, o mel é um produto sensível a variações de temperatura, que acelera a degradação dos seus açúcares por meio de reações como caramelização e Maillard (CAVRAR; YILDIZ; ŞAHİN, 2013; CODEX STANDARD FOR HONEY, 2001; MOREIRA et al., 2010). Assim, o produtor sofre perdas econômicas associadas à desvalorização do produto. Uma solução para estes problemas é a transformação do mel em produtos de maior valor agregado, como o hidromel.

O hidromel é uma bebida com graduação alcoólica entre 4 e 14 °GL, obtida pela fermentação de mel diluído em água potável adicionado de sais minerais. Além desta formulação básica pode-se adicionar ervas, cereais e/ou frutas, variando assim na coloração e sabores (MAPA, 2008).

Além das variantes decorrentes de ingredientes adicionais, no decorrer da fermentação e maturação, compostos voláteis são formados, promovendo a diversificação dos aromas e sabores dos hidroméis. Essas substâncias são provenientes do metabolismo secundário das leveduras e as principais são os ésteres como fonte primária de aromas frutados (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010), bem como os álcoois superiores que apresentam aromas frutados, florais e balsâmicos, produzidos como forma de desintoxicação celular pelo excesso de etanol e esterres presentes no final da fermentação (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

O processo de produção de hidromel não é padronizado e por isso nele são aplicadas técnicas destinadas à produção de vinho. Além disso, em grande parte dos processo aplica-se a esta bebida leveduras vinícolas, cervejeiras ou de panificação (GUPTA; SHARMA, 2009). Diferentes linhagens de leveduras de uma mesma espécie produzem

diferentes perfis de compostos voláteis e aromáticos em bebidas e devido a isto são apontadas como uma das principais responsáveis pelas características finais do hidromel (PEREIRA et al., 2012, 2015). A baixa oferta de linhagens de leveduras específicas leva à falta de características padronizadas para o hidromel brasileiro.

Leveduras usadas para produção de bebidas devem possuir características particulares como tolerância às concentrações de açúcares presentes no mosto de fermentação (osmotolerância); tolerância e capacidade de produzir etanol, principal produto gerado a partir da transformação dos açúcares do mosto; resistência à sulfito, principal conservante utilizado em mostos de fermentação; capacidade de produzir alcoóis superiores e ésteres durante a maturação para a complexidade aromática da bebida; resistência à uma extensa faixa de pH; e estabilidade genética durante a propagação e armazenamento (GUPTA; SHARMA, 2009; PEREIRA et al., 2012; SROKA; TUSZYŃSKI, 2007). O uso de linhagens isoladas apropriadas permite um melhor controle do processo produtivo, o que leva à padronização da bebida e possibilita o desenvolvimento de uma bebida de qualidade com relação aos atributos físico-químicos e sensoriais. Uma possível fonte para buscar leveduras são as abelhas sem ferrão, pois suas colmeias possuem uma grande diversidade de microrganismos simbiotes associados ou não com a sua nutrição (ROSA et al., 2003). Microrganismos já isolados nesses ambientes incluem bactérias do gênero *Bacillus* e leveduras dos gêneros *Stamerella* e *Candida* (GILLIAM, PREST, & LORENZ, 2000 e TEIXEIRA, 2003). Visando o desenvolvimento de fermentos próprios para a produção de hidromel e o aperfeiçoamento dos processos produtivos, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar de leveduras apropriadas para produção de hidroméis.

OBJETIVO GERAL

Isolar leveduras apropriadas para produção de hidromel

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de leveduras de fontes apícolas;
- Identificação das espécies das leveduras isoladas;
- Seleção de leveduras apropriadas para produção de hidromel;
- Determinação da temperatura apropriada para produção de hidromel;
- Aplicação das leveduras selecionadas na produção de hidromel;
- Caracterização dos compostos voláteis produzidos;
- Aceitação sensorial dos hidroméis produzidos.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA – PRODUÇÃO DE HIDROMEL

O hidromel é considerado uma das bebidas alcoólicas mais antiga que se tem conhecimento (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983). O declínio na produção e consumo desta bebida ocorreu devido ao desenvolvimento do açúcar cristal e a produção de vinho, principalmente em locais onde havia grande produção de uva (GUPTA; SHARMA, 2009). Devido ao interesse atual por produtos fermentados, bem como a divulgação por meio de filmes e séries de TV este produto tem recebido atenção novamente.

1. HIDROMEL

1.1. Histórico de produção

O primeiro registro da produção de hidromel data 7.000 a.c. no norte da China, onde foram encontrados vasos contendo uma mistura de hidromel, arroz e algumas frutas. Aparentemente, esta bebida era utilizada em rituais religiosos (MCGOVERN et al., 2004). Além da produção chinesa, estudos arqueológicos mostram consumo desta bebida na África cerca de 3.000 anos a.c. (BAYON, 1997), sendo posteriormente produzida no Mediterrâneo e na Europa em civilizações antigas. Além dos romanos e gregos, outros povos consumidores desta bebida foram os Celtas, os Saxões e os Vikings (PIATZ, 2014). O hidromel se expandiu pela Europa até atingir os mosteiros, onde os monges que se dedicavam à apicultura também produziam a bebida (PIATZ, 2014).

No início do século XII, a produção de hidromel deu lugar aos vinhos e cervejas, que devido à facilidade de colheita da matéria-prima acabaram predominando (BERTELLO, 2001). Com a chegada do açúcar das Índias Ocidentais no século XVII, a produção e incentivo à apicultura decaíram ainda mais e a bebida passou a ser consumida na Grã-Bretanha (BERTELLO, 2001). Nos mosteiros, a produção de mel (e, conseqüentemente, hidromel) continuou, pois a apicultura era essencial

para produção de ceras destinadas a fabricação de velas (PIATZ, 2014). No Brasil, a “Companhia de Comércio” decretou uma lei proibindo a produção de bebidas alcoólicas no Brasil, dentre elas o hidromel, e seus produtores ficaram sujeitos a multas, de modo que única bebida permitida era o vinho Português (SOUZA, 2004). Por este motivo durante muito tempo a produção desta bebida foi deixada de lado. Entretanto com o aumento do interesse pelo consumo de produtos fermentados capazes de aportar características antioxidantes, atenção tem sido dada também ao hidromel, pois sendo o mel um alimento capad e trazer benefícios além da nutrição (DA COSTA LEITE et al., 2000), acredita-se que o hidromel mantenha esta característica, fato que ocasionou o aumento da divulgação e dos estudos relacionadas a esta bebida (BUENO-COSTA et al., 2016; ESCUREDO et al., 2013; WINTERSTEEN; ANDRAE; ENGESETH, 2005).

1.2. Definições e Legislações

Segundo a portaria nº 64, de 23 de abril de 2008 o hidromel é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% (v/v), a 20 °C, obtida pela fermentação alcoólica de uma solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável (MAPA, 2008). Além do hidromel tradicional, existem diversas variedades de hidromel registradas na literatura que podem ser produzidas mediante a adição de frutas e ervas essenciais. A tabela 1 apresenta algumas variações na produção de hidromel.

Tabela 1: Variantes na produção de hidroméis.

Variedades	Ingredientes
Hidromel tradicional	Mel, água e nutrientes (opcional)
Melomel	Mel, água e frutas (exceto uvas)
Cyser	Mel e maçã ou suco de maçã
Pyment	Mel e uvas ou suco de uvas
Metheglin	Mel e especiarias
Bragoot	Mel e malte
Hippocras	Mel e pimentas

Fonte: (PIATZ, 2014)

A Instrução Normativa nº 34 de 29 de novembro 2012 define padrões de identidade e qualidade para hidromel (Tabela 2).

Tabela 2: Padrões de identidade e qualidade para hidromel

Parâmetro	Limite min.	Limite máx.	Classificação
Acidez fixa, em meq·L ⁻¹	30	--	--
Acidez total, em meq·L ⁻¹	50	130	--
Acidez volátil, em meq·L ⁻¹	--	20	--
Anidrido sulfuroso total, em g·L ⁻¹	--	0,35	--
Cinzas em g·L ⁻¹	1,5	--	--
Cloretos totais, em g·L ⁻¹	--	0,5	--
Extrato seco reduzido em g·L ⁻¹	7	--	--
Gradação alcoólica em % (v/v) a 20 °C	4	14	--
Teor de açúcar em g·L ⁻¹	--	< 3	Seco
	> 3	--	Suave

Fonte: (BRASIL, 2012)

As legislações direcionadas ao hidromel são bem recentes e remetem ao interesse brasileiro pela padronização deste produto. O Brasil pode vir a se tornar um grande produtor de hidromel, pois é reconhecido mundialmente como 8^o maior exportador de mel (CUBA, 2016). O mercado interno ainda está em ascensão, pois enquanto países compradores do mel brasileiro apresentam consumo de 1,8 kg anuais por pessoa, a média de consumo interno é de 160 g/pessoa/ano (FAEB, 2016). Para que o mercado interno aumente, é necessário incentivo ao consumo do produto, seja este *in natura* ou transformado em produtos derivados, como o hidromel.

1.3. Importância econômica

Atualmente a produção de hidromel tem sido desenvolvida por pequenos produtores. Até 2016, haviam apenas 4 registrados no ministério da agricultura (MAPA, 2016), entretanto em 2014 após o I Encontro Nacional de Produtores de Hidromel, 67 produtores artesanais foram encontrados distribuídos pelo país (Figura 1) (CASA DO HIDROMEL, 2015).

Produtores de hidromel

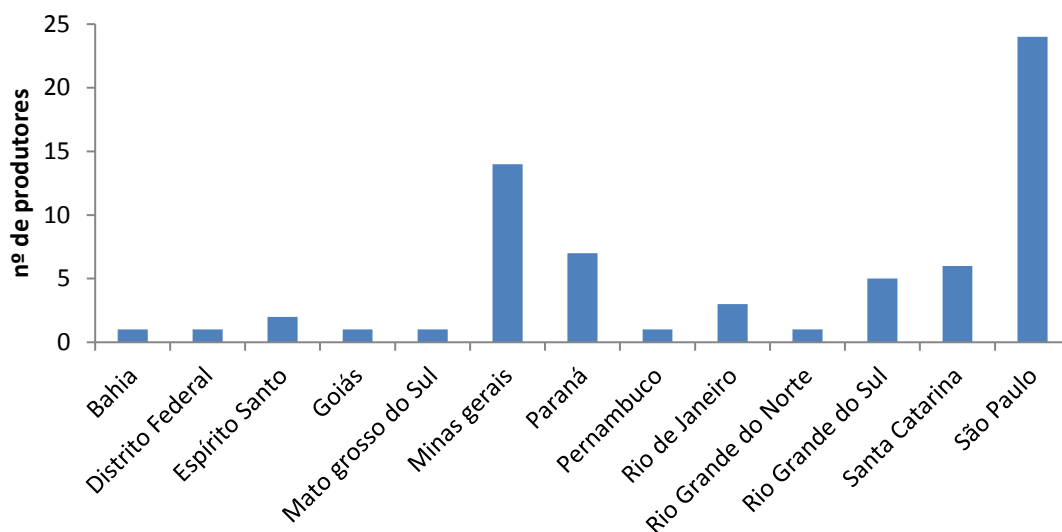


Figura 1. Distribuição de produtores informais de hidromel no Brasil.

Fonte: (CASA DO HIDROMEL, 2015).

Nos Estados Unidos a revista “Wine e Vines” declarou em 2009 que os produtores de hidromel representavam 2% dos profissionais que trabalham com fermentados no país. Em 2012 existiam cerca de 404, já em 2013, foram registrados 823, representando um aumento de 103%. Com relação às vendas médias, em 2012 registrou-se \$ 48.624 de vendas brutas enquanto em 2013 este valor subiu 130% chegando a \$ 112.000 dólares. A “American Mead Makers Association” declarou que o hidromel apresentou o maior crescimento registrado no seguimento de bebidas alcoólicas dos Estados Unidos (HERBERT; HERBERT, 2014).

Na revista “Wine Enthusiast Network” foi publicado um artigo descrevendo o aumento do interesse pela produção de hidromel, no qual o autor lista oito hidroméis mais bem pontuados produzidos nos Estados Unidos durante o evento “The Mazer Cup” (a competição internacional anual de hidroméis) e seus respectivos preços (KETTMANN, 2016).

Tabela 3: Marcas de hidroméis e seus respectivos preços nos Estados Unidos.

Marca	Tipo de Hidromel	Preço (US\$)
Bee d'Vine Brut	Melomel com aromas cítricos	\$24/375 mL
Bos Meadery 2015 Hammer-Smashed Cherry	Melomel elaborado com cerejas	\$8/500 mL
HoneyMaker Dry Mead	Melomel seco elaborado com limões e maçãs cozidas	\$15/750 mL
B. Nektar Necromangocon	Melomel elaborado com manga e pimenta	\$8/500 mL
Rabbit's Foot Meadery Odin	Hidromel tradicional feito com mel escuro	\$70/375 mL
Nectar Creek	Metheglin preparado com gengibre	\$11/500 mL
Redstone Meadery Traditional Mountain Honey Wine	Metheglin de mel de floradas de laranjeira e bagas de zimbro	\$22/750 mL
St. Ambrose Cellars Tupelo Ambrosia Mead	Metheglin feito com adição de noz torrada	\$14/750 mL

Fonte: (KETTMANN, 2016)

No Brasil, este produto artesanal pode variar entre R\$ 43,00 em uma garrafa de 750 mL de Metheglin à R\$ 15,00 em uma garrafa de 250 mL de hidromel tradicional (LIVRE, 2016).

2. PRODUÇÃO DE HIDROMEL

Mediante as pesquisas relatadas pode-se sugerir um processo para produção de hidromel que deverá seguir o fluxograma descrito na figura 2.

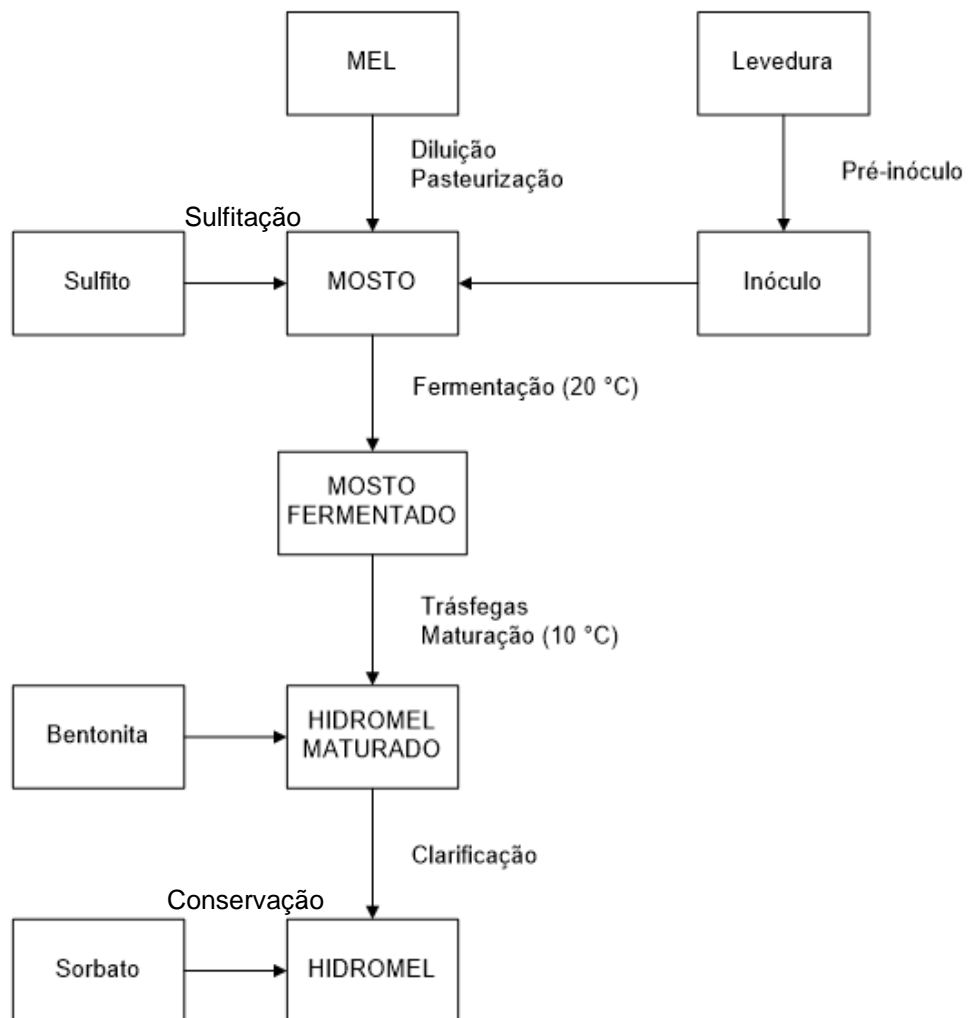


Figura 2: Fluxograma de produção de hidromel

Inicialmente deve-se selecionar a matéria-prima e ingredientes adicionais que inclui água, mel, nutrientes, ácidos, metabissulfito de sódio ou potássio e leveduras.

A água deverá ser potável, de preferência mineralizada contribuindo assim com a nutrição das leveduras. Estas leveduras devem apresentar baixas restrições nutricionais e alta tolerância osmótica, características estas encontradas nos mostos destinados a produção de hidroméis (GUIMARÃES et al., 2006; PEREIRA et al., 2012, 2009). (GUIMARÃES, 2006; PEREIRA et al., 2012)

Os nutrientes a serem adicionados podem ser aqueles adquiridos no mercado que incluem compostos nitrogenados, devendo ser adicionados na concentração indicada pelo fabricante (IGLESIAS et al., 2014; PIATZ, 2014), entretanto também pode-se optar por adição de pólen como nutriente na concentração de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ROLDÁN et al., 2011).

A adição de ácidos como tartarato de sódio e potássio e ácido málico é opcional já que não foi determinada influência sobre o processo fermentativo de hidroméis (MENDES-FERREIRA et al., 2010), mas o pH do mosto deve estar no máximo em 4,5 evitando assim a formação de álcoois superiores em excesso durante a fermentação, bem como prevenindo o aparecimento de bactérias contaminantes (MENDES-FERREIRA et al., 2010; RIBEREAU-GAYON et al., 2006)

Conservantes como metabissulfito de sódio ou de potássio devem ser adicionados garantindo a seletividade do mosto, facilitando a clarificação e reduzindo o teor de acetaldeído formado (RIBEREAU-GAYON et al., 2006), não ultrapassando a concentração de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfito livre, o que corresponde a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de metabissulfito de sódio ou potássio (ANVISA, 2013; ENATIS, 2006).

O mel deverá ser colhido mediante as boas práticas de produção evitando assim a contaminação da matéria prima, e deverá ser diluído até que o mosto atinja concentração de 20-30 °Brix dependendo do teor de açúcares desejado ao final da fermentação, variando assim o produto entre seco e suave (GOMES et al., 2015; GUPTA; SHARMA, 2009; MATTIETTO et al., 2006). O mel diluído e adicionado de nutrientes e metabissulfito conforme as indicações do fabricante é pasteurizado na temperatura de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min ou $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min (MATTIETTO et al., 2006; PEREIRA et al., 2013, 2015).

Paralelo ao preparo do mosto, a levedura a ser utilizada deverá ser pré-ativada em um menor volume de mosto durante 12 h e inoculada até a contagem de $10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PEREIRA et al., 2013). O mosto deverá ser

armazenado a uma temperatura de 20-24 °C e a fermentação será acompanhada durante 25-30 dias. O acompanhamento é feito pelo teor de açúcares consumidos, contagem de microrganismos, turbidez e acidez garantindo que a fermentação ocorra de modo eficiente e sem o aparecimento de contaminante (GOMES et al., 2013).

Ao final da fermentação a bebida deverá ser transferida e armazenada sobre refrigeração (10 °C) por 30 dias para que haja clarificação e maturação do produto (MATTIETTO et al., 2006). A fermentação poderá ser interrompida a qualquer momento mediante a trasfega e refrigeração, ou com uso de sorbato de sódio ou potássio conforme a preferência do produtor (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Com o produto maturado faz-se uma nova trasfegas, caso necessário pode-se adicionar algum clarificante como bentonita ou terra diatomácea na concentração recomendada pelo fabricante, ou mesmo gelatina preparando-se uma solução de 20%, adicionando 6 mL dessa solução para cada litro de hidromel, acelerando a clarificação durante a maturação (MATTIETTO et al., 2006).

Com o produto finalizado deve-se fazer adição de sorbato de sódio (max. 200 mg·L⁻¹), o qual previne eventual fermentação posterior e mantém o hidromel conservado por mais tempo, aumentando assim a qualidade do produto final e tempo de vida útil (ANVISA, 2013; PIATZ, 2014).

3. REVISÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO

3.1. Características das leveduras e do mel

O emprego de leveduras selecionadas com características específicas para produção de hidromel oferece diversas vantagens como: fermentação completa e regular do mosto, produção adequada de etanol, produção controlada de ácidos, possibilidade de uma clarificação mais

rápida do mosto, melhoria da estabilidade biológica da bebida e obtenção de aromas particulares (ANGIOLLETO, 2013; NOGUEIRA et al., 2003).

Durante a seleção de estirpes próprias para a produção de hidromel, é necessário considerar tolerância ao etanol, atividade fermentativa, capacidade fermentativa sob temperaturas condizentes com as condições de fermentação, multiplicação e produção de glicerol. É necessário ainda que haja uma produção reduzida de dióxido de enxofre e resistência a sulfito, produção reduzida de espuma, baixa produção de acetaldeído e ausência de amins biogênicas (NIKOLAOU et al., 2006).

Quanto a seleção da matéria-prima apropriada, a Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 define padrões de identidade e qualidade do mel como açúcares redutores, sacarose aparente, umidade, sólidos insolúveis em água, minerais (cinzas), acidez e hidroximetilfurfural (MAPA, 2008). Essas exigências para a comercialização do mel levam em conta padrões internacionais que nem sempre condizem com as características adquiridas pelo produto no decorrer da produção e colheita do Brasil (LUIZ et al., 2015). A composição do mel depende da fonte floral, do néctar, das condições ambientais e sazonais, bem como do manuseamento e do processamento (PEREIRA, 2008).

Qualquer mel pode ser utilizado para produção de hidromel, desde que colhido de modo adequado e higiênico. Entretanto um mel com alto teor de minerais (que poderá apresentar coloração mais escura) irá favorecer o crescimento das leveduras, reduzindo o tempo de adaptação requerido conforme descrito por Kempka e Mantovani (2013), que produziram hidroméis a partir de méis de diferentes floradas, com coloração e teor de minerais variados, sendo que aqueles com maior teor de minerais apresentaram fermentação mais rápida e maior teor de etanol (KEMPKA; MANTOVANI, 2013).

3.2. Nutriente e suplementação

Alguns nutrientes são necessários para que o processo de multiplicação e fermentação pelas leveduras ocorra adequadamente, como fontes de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, e íons como potássio e magnésio (WALKER, 1998).

Devido à composição do mel, que contém um baixo teor de compostos nitrogenados, a produção de hidromel requer uma suplementação do mosto com nutrientes (PIATZ, 2014). Uma grande diversidade de ingredientes já aplicados como suplemento são listados na Tabela 4.

Tabela 4: Aditivos, suplementos ou ingrediente sugeridos em artigos para produção de hidromel.

País	Aditivo	Fermentação (Dias)	Referência
Índia	$C_6H_{12}O_6$, Extrato de levedura, Peptona, $MgSO_4$, $ZnSO_4$ e KH_2PO_4	90	(QURESHI; TAMHANE, 1985)
Portugal	$(NH_4)_2HPO_4$	5	(PEREIRA et al., 2014)
Portugal	Suplemento 1: Nutrientes comerciais (Enovit®) e $C_4H_6O_6$. Suplemento 2: $NH_4H_2PO_4$; $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaSO_4$, SO_2 , $C_4H_6O_6$ e bentonita.	8–13	(PEREIRA et al., 2009)
Portugal	$K_2C_4H_4O_6$, ácido málico e $(NH_4)_2HPO_4$	11–14	(MENDES-FERREIRA et al., 2010)
Portugal	Nutrientes comerciais e SO_2	15	(GOMES et al., 2013)
Eslováquia	Vitamon Ultra salt®	NI	(NAVRÁTIL; ŠTURDÍK; GEMEINER, 2001)
Polônia	$(NH_4)_2HPO_4$ e $C_6H_8O_7$	25–30	(SROKA; TUSZYŃSKI, 2007)
Portugal	$K_2C_4H_4O_6$, ácido málico e $(NH_4)_2HPO_4$	NI	(PEREIRA et al., 2013)
Nigéria	H_2SO_3 e SO_2	21	(UKPABI, 2006)
Espanha	$K_2S_2O_5$ e pólen	NI	(ROLDÁN et al., 2011)

Fonte: Iglesias et al. (2014). NI – Não identificado

O pólen é a fonte de proteínas na colmeia, e atualmente é utilizado também para alimentação humana. O pólen apícola contém alta concentração de vitaminas do complexo B: 0,59 – 1,09 mg·100 g⁻¹ de

vitamina B1; 1,73 – 2,56 mg·100 g⁻¹ de vitamina B2; 0,33 – 0,68 mg·100 g⁻¹ de vitamina B6; além de outros componentes, como 2,98 % (m/m) de cinzas; 5,39 % (m/m) de lipídeos e 23,38 % (m/m) de proteínas (DE ARRUDA et al., 2013). Dessa forma, o pólen apresenta-se como uma opção de suplementação do mosto de mel, como verificado por Roldán et al (2011) que testaram concentrações variando entre 10 e 50 g.L⁻¹, e a adição de 30 g.L⁻¹ levou ao aumento na produção de etanol, bem como boa aceitação nas características sensoriais do produto final.

3.3. Uso de conservantes

Os conservantes devem ser aplicados nos mostos antes da fermentação para prevenir contaminação por bactérias e outras leveduras, bem como durante a maturação afim de interromper a fermentação e prevenir o processo oxidativo (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Assim, o metabissulfito pode ser utilizado no mosto durante a fermentação como bactericida e após a fermentação como antioxidante, enquanto o sorbato só deve ser aplicado após a fermentação devido a sua efetividade contra fungos e bactérias (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

O dióxido de enxofre pode ser adicionado ao mosto de diversas formas: gás anidrido sulfuroso, ácido sulfuroso, dióxido de enxofre, bissulfito de potássio, metabissulfito de potássio, metabissulfito de sódio, e o efeito sobre a bebida será sempre o mesmo. (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As concentrações máximas de SO₂ livre são de 160 mg·L⁻¹ para vinhos tintos, 210 mg·L⁻¹ para vinhos brancos e roses, e 235 mg·L⁻¹ para vinhos espumantes (EUROPEIA, 2009), sendo que a concentração máxima permitida pela legislação brasileira é de 200 mg·L⁻¹ de SO₂ livre (ANVISA, 2012).

Após a fermentação e maturação o produto elaborado ainda fica a mercê de possíveis contaminantes e deteriorantes provenientes do

armazenamento ou da maturação. Por este motivo, o uso de um aditivo capaz de parar o processo fermentativo e manter o produto estável durante o armazenamento é importante. Com este intuito, os conservantes sorbato, benzoato de sódio e potássio são utilizados. Seus efeitos antimicrobianos são mais efetivos em pH menores que 5,0 e seu mecanismo de ação consiste na inibição de enzimas sulfidrilas e catalases nos microrganismos (BEUCHAT, 1981).

O sorbato tem capacidade antifúngica, assim sua adição cessa a fermentação com a morte das leveduras. O uso recomendado varia entre 100 e 1000 mg·L⁻¹, com médias de 300–500 mg·L⁻¹ em vinhos que possuem concentrações altas de açúcares redutores que podem ser utilizados por leveduras durante o armazenamento (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). O Brasil limita o uso em 200 mg·L⁻¹ de ácido sórbico (ANVISA, 2013). Sendo um conservante reconhecido na conservação de vinhos, este também é recomendado na conservação de hidroméis (GARLET et al., 2015; PIATZ, 2014).

3.4. Clarificação

O processo de clarificação pode ocorrer de modo espontâneo conhecido como autoclarificação, mediante agentes químicos, físico-químicos ou de desmetalização; por ação mecânica; ou através de substâncias orgânicas e inorgânicas usadas como clarificantes (albumina, argilas, bentonita, caseína entre outras) (AQUARONE et al., 2001). A clarificação objetiva a redução da turbidez causada por substância em suspensão como pectinas, resíduos e leveduras (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Nos hidroméis os principais componentes capazes de dar turbidez à bebida são as próprias leveduras, o pólen, resíduos de cera ou mesmo contaminações como cinzas e areia adquiridas pelo mel durante a colheita (PEREIRA et al., 2013).

A turbidez reduz naturalmente durante a maturação, principalmente a baixas temperaturas, método conhecido como autoclarificação que

ocorre mediante a decantação do material em suspensão por força gravitacional (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

A colagem é outro processo de clarificação largamente utilizado em vinhos, onde coagulantes capazes de flocular e sedimentar são adicionadas a bebidas, se ligando as substâncias responsáveis pela turbidez (SCHRAMM, 2003). Dentre os agentes floculantes utilizados na produção de hidromel o destaque é dado ao silicato de alumínio (bentonita) (PEREIRA et al., 2009; ROLDÁN et al., 2011; SCHRAMM, 2003), e a gelatina (ROLDÁN et al., 2011), sendo agentes floculantes de origem inorgânica e orgânica, respectivamente (CARVALHEIRA, 2014). A dose recomendada de gelatina para vinho branco é de 3 a 5 g·hL⁻¹, entretanto para uma clarificação eficiente, a temperatura do mosto deve estar abaixo de 25 °C e o pH ideal para precipitação varia entre 3,2 e 3,6 (CARVALHEIRA, 2014). A bentonita é o clarificante mais indicado para hidroméis. Este atua em pH variado, entretanto à medida que se aumenta o pH da bebida são necessárias maiores quantidades, e a temperatura não exerce influência sobre a eficiência deste composto (CARVALHEIRA, 2014).

A eficiência dos métodos de clarificação citados também é dependente da concentração de pré-inóculo utilizado. Pereira et al (2013), testando diferentes concentrações de pré-inóculos descrevem que apesar da concentração de 10⁸ cel·mL⁻¹ acelerar o processo fermentativo, o processo de clarificação é retardado, sendo que a menor concentração de células (10⁵ cel·mL⁻¹) desenvolveu um produto de aroma mais agradável e de fácil clarificação.

3.5. Compostos aromáticos no produto final

Durante a maturação ocorre a degradação de substâncias desagradáveis e a produção de substâncias desejáveis provenientes do metabolismo secundário das leveduras. Dentre as substâncias produzidas estão os ésteres presentes nas bebidas fermentadas, não ultrapassando

100 mg·L⁻¹, mas que ainda assim representam grande parte dos constituintes aromáticos sendo a fonte primária dos aromas frutados. A tabela a seguir apresenta os principais ésteres seguidos de seus aromas característicos (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010).

Tabela 5: Ésteres formados e detectados em vinhos

Composto (nome usual)	Característica aromática	Limites de detecção registrados (mg·L⁻¹)
2-metilpropanoato de etilo	Frutado, morango, limão	0,001; 0,015; 5,0
2-metiobutanoato de etilo	Maçã, morango, baga, doce, cidra, anis	0,0001; 0,001; 0,018
2-metilbutanoato de etilo	Fruta doce, abacaxi, limão, anis, floral	0,000; 0,003; 1,3
2-hidroxipropanoato de etilo	Leite, sabão, amanteigado, frutado	0,05–0,2; 150
3-hidroxibutanoato de etila	Frutado (avinhadado), verde, marshmallow	20
Butanoato de etila	Floral, frutado, morango, doce	0,001; 0,02; 0,4
Hexanoato de etila	Frutado, morango, maçã verde, anis	0,005; 0,08; 0,85
Octanoato de etila	Doce, frutado, fruta madura, queimado, cerveja	0,002; 0,005; 0,012; 0,58
Decanoato de etila	Oleosa, frutado (uva), floral	0,2; 0,012; 0,51
3-fenilpropanoato de etila	Flores	0,002
Cinamato de etila	Mel, canela	0,001; 0,048
Acetato de etila	Frutados (a > 100 mg ml ⁻¹), solvente, balsâmico	7,5; 60; 12,27
Acetato de isobutila	Frutado, maçã	1,6
Acetato de isoamila	Banana, frutado	0,03; 0,16
Acetato de feniletila	Rose, floral	0,25; 0,65; 1,80
Acetato de hexila	Verde, herbáceo, fruta, uva	0,002–0,48; 0,67/2,4

Fonte: Tabela adaptada do artigo de SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010.

Outro importante componente presente nas bebidas é o acetaldeído, responsável por intoxicações decorrente do consumo de etanol, devido sua reação com proteínas, aminoácidos e glutatona porém, estudos demonstram a degradação deste composto durante a fermentação malolática observada em vinhos (OSBORNE et al., 2000). A mesma pode ser estimulada também em hidroméis pela inoculação de cepas selecionadas durante a maturação. O limite do mesmo em bebidas é de 100 mg·L⁻¹, acima desse valor a bebida passa a apresentar aroma de frutas vermelhas estragadas. Entretanto, a Legislação Federal dos Estados Unidos estipula o limite máximo de 300 mg·L⁻¹ (ROLDÁN et al.,

2011; SHERIDAN; ELIAS, 2015). Já a legislação brasileira não prever limites para estes compostos, pois seus valores são contabilizados como acidez volátil (MAPA, 2008).

Os álcoois superiores correspondem à outra classe de importância na formação de aromas. Durante seu metabolismo as leveduras podem excretar ácidos cetônicos seguindo para uma descarboxilação a aldeído e uma redução a álcool. Por meio desta reação são formados a maioria dos álcoois superiores (Figura 3) (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Entretanto alguns como 1-propanol e 1-butanol são independentes deste metabolismo. Na tabela 6 são listados os principais álcoois superiores e seus respectivos aminoácidos precursores (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

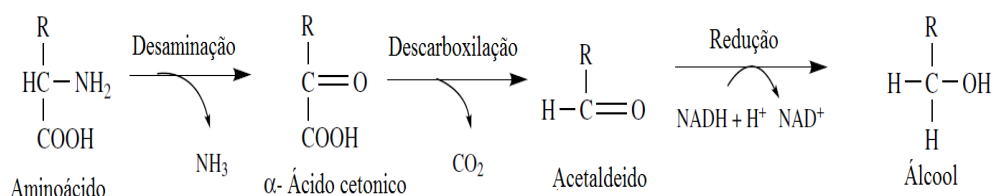


Figura 3: Formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Tabela 6: Principais álcoois superiores e seus respectivos aminoácidos precursores

Álcoois superiores	Concentração em vinhos (mg/l)	Aminoácido precursor
Alcool isoamílico	80-300	Leucina
2-metil-butan-2-ol	30-100	Isoleucina
Alcool isobutilico	50-150	Valina
Feniletanol	10-100	Penilalanina
Tirosol	20-50	Tirosina
1-propanol	10-50	ND
1-butanol	1-10	ND
Triptofol	0-1	Triptofano
γ-butirolactona	0-5	ácido glutâmico
Metionol	0-5	Metionina

ND – Não Determinado

Fonte: Tabela adaptada do livro de RIBEREAU-GAYON et al., 2006.

Estes álcoois produzidos durante o metabolismo podem trazer aromas agradáveis dependendo da concentração. Como exemplo, têm-se o feniletanol que tem aroma de rosas, e o álcool isoamílico que em altas concentrações trazem odor de solvente à bebida (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Afim de evitar a formação destes compostos em excesso deve-se evitar alto pH, elevada temperatura de fermentação, baixa concentração de nutrientes e aeração excessiva (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Ao testar a produção de compostos voláteis em hidroméis produzidos com duas cepas de leveduras destinadas a produção de vinho, Pereira et al (2013) detectaram 27 aromas fermentativos, incluindo álcoois, ésteres, fenóis voláteis, ácidos graxos voláteis e carbonila, os dados confirmam que o tipo de levedura utilizado tem influência direta sobre os aromas formados ao final da fermentação. Dentre eles apenas 14 contribuíram para o aroma dos hidroméis por estarem dentro do limite de detecção, sendo que os principais foram os ésteres hexanoato de etila, octanoato de etila e acetato isoamílico (PEREIRA et al., 2012).

4. CONCLUSÃO E DESAFIOS

Durante a produção de hidromel méis de coloração mais escura e ricos em minerais aceleram o processo fermentativo. A suplementação do mosto é necessária por meio de ativantes de fermentação, sendo que o pólen apícola também pode ser utilizado. Leveduras resistentes às condições do mosto devem ser pesquisadas e a concentração ideal de células é dependente do tempo de fermentação que se deseja, porém quanto menor a concentração de células e maior o tempo de fermentação, mais aromático será o produto final. Dentre os agentes clarificantes, o mais recomendado é a bentonita. A adição de compostos sulfatantes (metabiossulfitos) e conservantes (sorbatos) é essencial para garantir qualidade e maior tempo de vida útil ao produto final.

Pode-se constatar um crescente interesse pelo hidromel, entretanto detalhes técnicos ainda encontram-se pendentes de pesquisa como o isolamento e otimização de uma levedura mais eficiente que aquela destinada à fermentação de vinhos; estudos associados aos processos de envelhecimento; processos de clarificação a serem aplicados; e otimização do processo para cada variação de mel.

CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS APÍCOLAS PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS

RESUMO

A disponibilização de novos fermentos contribui para o desenvolvimento de novos produtos e processos. Os produtos apícolas provenientes de abelhas são fontes em potencial para a obtenção de microrganismos com as características desejadas pela indústria de bebidas. Linhagens de leveduras foram isoladas de méis e pólen apícola de abelhas *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí) e *Apis mellifera*, e caracterizadas quanto a sua fisiologia e melhores condições de fermentação para produção de bebidas alcoólicas. Dezenove linhagens foram selecionadas e identificadas, das quais 9 são da espécie *Starmerella meliponinorum*, 1 *Papiliotrema flavescens*, 5 *Saccharomyces cerevisiae* e 2 *Rhodotorula mucilaginosa*. Dentre as quais, 7 se desenvolveram em meios contendo até 20% (m/v) de glicose e 4% (v/v) de etanol de modo semelhante à levedura *S. cerevisiae* comercial. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* codificados como JP14 (Jataí - pólen), IP9 (Iraí - pólen) e IM8 (Iraí - mel) apresentaram maior velocidade específica de crescimento nas concentrações de glicose entre 10-50% (m/v), etanol entre 5-10% (v/v) e metabissulfito de sódio entre 100-500 mg·L⁻¹. Todos as 3 linhagens foram capazes de produzir etanol e glicerol nas condições de pH entre 4,0-8,0 e temperatura entre 10-30 °C, com a produção de baixas concentrações de compostos indesejáveis como ácido acético ou metanol. Estas linhagens apresentaram potencial para produção de bebidas alcoólicas ou mesmo bioetanol, uma vez que apresentaram rendimento real de etanol superior ao padrão comparativo em diferentes valores de pH e temperaturas. Portanto, que as fontes apícolas são ricas para o isolamento de leveduras que apresentam qualidades semelhantes ou superiores à levedura comercial para produção de bebidas.

Palavras-chave: Fermentos; *Saccharomyces cerevisiae*; Identificação.

1. INTRODUÇÃO

As bebidas alcoólicas menos tradicionais como cidra, hidromel, vinhos de palma, cerveja de sorgo, dentre outras, são produzidas com uso de leveduras disponibilizadas no mercado para outras bebidas. Por esse motivo são frequentes estudos que busquem por leveduras para produção destas bebidas (GUIMARÃES et al., 2006; PANDO BEDRIÑANA; QUEROL SIMÓN; SUÁREZ VALLES, 2010; PEREIRA et al., 2009; TAPSOBA et al., 2015; VAN DER AA KÜHLE et al., 2001). O uso de linhagens apropriadas permite um melhor controle do processo produtivo, o que leva à padronização da bebida e possibilita o desenvolvimento de produtos de qualidade (PEREIRA et al., 2009). Para isso faz-se necessário o isolamento de novas linhagens de leveduras que se adequem as condições de cada mosto.

Leveduras usadas para produção de bebidas devem ser inócuas, osmotolerantes, devido às altas concentrações de açúcares utilizadas na fabricação dos mostos, e capazes de produzir etanol e tolerar sua concentração no meio (RIBEREAU-GAYON et al., 2006; VERSTREPEN; KLIS, 2006). Além disso, devem apresentar resistência a compostos sulfurosos, utilizados para o controle microbiano durante a fermentação (RIBEREAU-GAYON et al., 2006), bem como ser geneticamente estáveis (CARRETO et al., 2008).

Os produtos apícolas apresentam-se como fontes promissoras para o isolamento de leveduras, pois são tradicionalmente consumidos pelos seres humanos, sendo considerados produtos inócuos e microbiologicamente estáveis (BOGDANOV, 2010). Por esse motivo são divulgados como produtos naturais e seguros de amplo consumo, dentre eles podemos citar o pólen apícola e o mel.

O pólen apícola possui microrganismos não patogênicos que são incorporados pelas abelhas para torná-lo um alimento palatável e disponível (GILLIAM; PREST; LORENZ, 1989). No mel das abelhas sem ferrão, outros microrganismos são incorporados para garantir um

processo fermentativo que leva a conservação desse alimento mediante a produção de etanol e ácidos orgânicos (ROSA et al., 2003). Espécies isoladas a partir de produtos de abelhas sem ferrão incluem *Zygosaccharomyces machadoi*, obtida de produtos provenientes de abelha *Tetragonisca angustula*, bem como *Starmerella neotropicalis f.a.*, da abelha *Melipona quinquefasciata* (DANIEL et al., 2013; GILLIAM, 2000; ROSA; LACHANCE, 2005).

O trabalho teve por objetivo obter leveduras de méis e pólen apícolas de abelhas nativas e exóticas visando a seleção e o desenvolvimento de fermentos para produção de bebidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolamento e manutenção das leveduras

Para o isolamento de leveduras das abelhas nativas fez-se um mix de pólen apícola e outro de mel, a partir de três colméias de *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí). Para o isolamento de leveduras de abelha exótica *Apis mellífera*, fez-se uma amostragem de mel recentemente colhido totalizando assim 5 amostras. Todas as amostras foram coletadas no Apiário Central do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa e analisadas no Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizada levedura comercial liofilizada *Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus* E491 (Perdomini/Blastosel Delta®) como padrão comparativo.

Para o isolamento de colônias, 5 g das amostras foram maceradas em tubo falcon contendo 45 mL de solução salina com diluente. A partir desta solução, foram realizadas 3 diluições seriadas, as quais foram plaqueadas em duplicata no meio BDA (Batata Dextrose Agar - BIOMEDH®) acidificado com ácido tartárico (SINTH®) a 10% (m/v) até pH 3,5 e incubados a 25 °C por 48 h. Foram selecionadas as placas que apresentaram maior número de colônias isoladas, dentre as colônias

foram escolhidas aquelas que apresentassem características morfológicas e/ou fontes de isolamento diferentes. Em caso de baixa diversidade morfológica, foram escolhidas 10 colônias por placa (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

As linhagens foram cultivados em meio YEPG líquido (0,5% de extrato de levedura - KASVI[®], 1% de peptona - IMEDIA[®] e 2% de glicose - NEON[®]), aqueles que não cresceram no meio foram descartados e os demais foram concentrados por meio de centrifugação e ressuspensão em metade do volume inicial. A ressuspensão foi realizada em YEPG líquido adicionado de glicerol 15 % (v/v) (SYNTH[®]) como crioprotetante. Os estoques foram congelados a -80 °C para armazenamento a longo prazo, e a -20 °C para ativação de rotina.

Para cada teste, os isolados foram previamente ativados em meio YEPG 2% líquido a 25 °C por 12 h seguido de centrifugação a 2.236 *xg* por 10 min a 4 °C e ressuspensão no meio a ser testado, na concentração inicial de aproximadamente 10⁶ células·mL⁻¹.

2.2. Caracterização morfológica

As colônias foram avaliadas com relação às características macroscópicas em quatro aspectos: (I) forma, podendo ser circular ou irregular; (II) tamanho e diâmetro, sendo este classificado em pequeno (2 mm), médio (2-5 mm) e grande (5 mm ou maior); (III) superfície celular, podendo ser com estrias concêntricas, estrias radiais, vales radiais ou granuladas; e (IV) bordas, sendo essas lisas, franjeadas, onduladas, pregueadas, crenadas, lobuladas e filamentosas (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

Microscopicamente, os isolados foram caracterizados em relação à sua forma como elipsoide, globoso, cilíndrico, apiculado, triangular, taloide, globular com hifas, globular com pseudo-hifas e formas variadas com ascósporos (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

2.3. Identificação de isolados por meio do sequenciamento

As linhagens de leveduras foram identificadas por meio da análise das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA (ROSA; LACHANCE, 1998).

A extração do DNA foi realizada pelo método descrito por Lachance (1990) com algumas modificações. As leveduras foram incubadas por 12 h em meio YEPG 2% a 28 °C, e o material foi centrifugado a 2.236 *xg* por 10 min. O material decantado foi então incubado em tampão de lise [50 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; 10 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 20 mL de NaCl 5 M; 50 mL de SDS a 10% (m/v)] a 65 °C por 30 min. Após este período foi adicionado 100 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isopropílico na proporção 25:24:1. A amostra foi agitada por 3 minutos e submetida à centrifugação a 6.000 *xg* por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado a ele um volume de 100 µL de etanol 95% gelado e 20 µL de solução de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹. A amostra foi homogeneizada por inversão e novamente submetida a centrifugação a 6.000 *xg* por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspendido em 100 µL de solução tampão TE pH 8,0 (10 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) (LACHANCE, 1990). O DNA genômico total foi quantificado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

A amostra foi então enviada para a empresa MacroGen[®] Inc. (Coréia) para o sequenciamento da região D1-D2 com uso dos iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (MEYER; ROSA; LACHANCE, 1998).

Os dados do sequenciamento foram submetidos ao programa CLCGenomic[®] para triagem e corte das sequências consenso, as quais foram alinhadas à sequências contidas no banco de dados Blast[®] (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

2.4. Seleção preliminar de linhagens

As linhagens foram submetidas a condições de estresse comuns a processos fermentativos para produção de bebidas: I) 4% (v/v) de etanol, limite mínimo de teor alcoólico para fermentados de frutas, sidra e hidromel (BRASIL, 2012); II) 20% (m/v) de glicose; e III) estresse cruzado entre as duas condições. A seleção se deu por meio da análise da evolução da Densidade Óptica (DO_{600}) durante 72 h a 28 °C. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados comparados mediante a porcentagem de adequação ao padrão (GUIMARÃES, 2006). As leveduras que apresentaram uma DO_{600} final em fase estacionária de pelo menos 50% do padrão foram selecionadas para os testes posteriores.

2.5. Tolerância das linhagens a condições de estresse

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento, cada levedura foi ativada, inoculada em meio YEPG 2% e incubado durante 24 h a 28 °C, durante as quais, a cada 3 h, uma alíquota foi retirada para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de metileno (Merk®) a 1% e determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}). A linearidade foi observada nos valores de DO_{600} entre 0,100 e 0,650 (ANEXO1, p. 53). Em posse desses dados foi realizada a correlação entre essas variáveis por meio de regressão linear.

As linhagens selecionadas foram submetidas a testes de tolerância a concentrações variadas de glicose, etanol e metabissulfito de sódio, sendo inoculados nos respectivos meios em placas de 96 poços, as quais foram incubadas em leitor de microplaca a 28 °C por 24 h. O crescimento microbiano foi monitorado pela leitura da DO_{600} a cada 30 min. Os valores de concentração dos componentes para cada teste foram: I) teste de osmotolerância: 10, 20, 30, 40 e 50% (m/v) de glicose; II) teste de tolerância ao etanol: 5, 10, 15 e 20% (v/v) e 2% de glicose; e III) teste de tolerância ao sulfito: 100, 250 e 500 mg·L⁻¹ de metabissulfito de sódio

(Marca Basequímica®). A velocidade específica de crescimento (h^{-1}) das leveduras em cada condição foi calculada por meio da equação 1.

$$\begin{aligned} y &= a + b \cdot x \\ \ln N &= \ln N_0 + \mu \cdot t \end{aligned} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: N = número de células viáveis no final teste; N_0 = número de células viáveis no tempo 0; t = tempo transcorrido (h).

Foram selecionadas para a caracterização tecnológicas (pH, temperatura e fontes de carbono assimiláveis) as três linhagens que apresentaram maior velocidade específica de crescimento nas condições testadas.

2.6. Caracterização tecnológica das linhagens

As linhagens selecionadas foram avaliadas quanto à capacidade de multiplicação e fermentação utilizando fontes alternativas de carbono e sob diferentes condições de pH e temperatura. O acompanhamento do crescimento foi realizado por meio de leituras de DO_{600} a cada 5 h durante 25 h.

Para o teste de utilização de fontes de carbono foi utilizado meio YNB (DIFCO®) adicionado de peptona (DIFCO®) como fonte de nitrogênio. Glicose, sacarose, frutose, lactose, galactose, manose ou xilose foram separadamente avaliadas a 5% (m/v).

O meio YEPG 2% teve seu pH ajustado por meio da adição de tampão citrato $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (SIGMA®) calibrado com HCl (VETEC®) $2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 2,5; 4,0 e 5,5) ou tampão hidroximetil amino metano (INLAB®) calibrado com NaOH (VETEC) $2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8,0 e 9,5) e as soluções foram inoculadas e incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h.

Por fim, as leveduras foram inoculadas em meio YEPG 2% pH 7,0 e incubadas nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

A influência do pH e temperatura na produção de etanol, metanol, glicerol e ácido acético foi verificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para isso, alíquotas de 1 mL de cada teste foram centrifugadas 2.236 *xg* e o sobrenadante congelado a -20 °C até as análises. As amostras foram diluídas 4 vezes e filtradas em filtro Gelman poro de 0,22 µm (ACRODISC®). Posteriormente, foram injetadas em uma coluna Aminex® HPX-87H com fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM (VETEC®) e identificadas por detector de índice de refração. Padrões dos compostos de interesse (glicose - SYNTH®, etanol - VETEC®, metanol - VETEC®, glicerol - SYNTH® e ácido acético - VETEC®) foram submetidos ao mesmo processo para correlação do tempo de retenção e concentrações dos mesmos nas amostras (SCMIDELL et al., 2001).

Cada padrão foi preparado nas concentrações de 3, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 78 e 100 mM. Após a diluição com água MiliQ, os padrões foram filtrados em filtros de 0,22 µm e injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência como fase móvel de ácido sulfúrico 5 mM. Com os dados de concentração e área do pico foi plotado um gráfico contendo a correlação entre os dados, assim com a área do pico dada pelo cromatograma pode-se determinar a concentração do composto na amostra.

A velocidade específica de crescimento (Equação 1), assim como o rendimento real em etanol (Equação 2), foram calculados.

$$Y_{(et/gli)} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $Y_{(et/gli)}$ = Rendimento real (%); P_f = Concentração do produto no final da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); P_i = Concentração do produto no início da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); S_i = Concentração do substrato no início da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); S_f = Concentração do substrato no final da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.7. Delineamento estatístico

As médias referentes à contagem final de leveduras no material isolado (Item 2.1); porcentagem de resistência relativa ao padrão (Item 2.4); velocidade específica das mesmas submetidas a diferentes concentrações de glicose, etanol e metabissulfito de sódio (Item 2.5); e porcentagem de rendimento real em etanol (Item 2.6) foram comparadas entre as leveduras a fim de selecionar as melhores linhagens para cada atributo.

As médias referentes à velocidade específica das linhagens de leveduras submetidas a diferentes temperaturas e pH (Item 2.6) foram comparadas a fim de selecionar a melhor temperatura e pH para cada levedura.

A análise de variancia foi realizada mediante ANOVA e a comparação entre médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Isolamento e caracterização morfológica de leveduras

As contagens de colônias realizadas nos produtos apícolas coletados evidenciaram uma quantidade maior de leveduras cultiváveis no pólen apícola de abelhas sem ferrão (Iraí e Jataí), seguido do mel dessas espécies (Tabela 1). Essa predominância se dá porque as abelhas sem ferrão incorporam neste substrato microrganismos fermentadores que metabolizarão o pólen para facilitar o processo de absorção de nutrientes pelas abelhas e permite a conservação do alimento (GILLIAM, 1979; MORAIS; CALAÇA; ROSA, 2013). No mel, por sua vez, a presença de compostos antimicrobianos e a alta concentração de açúcar (MONIKA et al., 2013) diminuem a necessidade da presença de microrganismos para estes fins.

Tabela 1. Contagem de leveduras nas fontes apícolas provenientes das abelhas Iraí, Jataí e *Apis mellifera*.

Abelha	Amostra	*Contagem (log UFC·mL ⁻¹)
Iraí	Pólen apícola	5.34± 0,18 a
	Mel	4.34± 0,12 b
Jataí	Pólen apícola	5.20± 0,19 a
	Mel	3.22± 0,10 c
<i>Apis mellifera</i>	Mel	1.59± 0,11 d

*Resultado obtido pela média de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

O mel de *Apis mellifera* possui um teor de umidade de 17,23% e um índice de acidez de 14,53 m.e.q·kg⁻¹, dificultando a manutenção de microrganismos neste ambiente (BEGUM et al., 2015), o que ficou evidente pela menor número de leveduras encontradas. As abelhas sem ferrão não são capazes de reduzir a tal nível a umidade do mel, a qual pode atingir até 31% (AYALA; GONZALEZ; ENGEL, 2013). Assim, para manter a estabilidade do alimento elas incorporam microrganismos que modificam nos teores de acidez, atingindo até 164 m.e.q·kg⁻¹, facilitando a manutenção da qualidade do mel durante o período de estocagem até o consumo (CHUTTONG et al., 2015). Dessa forma, as fontes apícolas provenientes de abelhas sem ferrão são fontes robustas para obtenção de microrganismos fermentadores, uma vez que estes são naturalmente incorporados nestes produtos pelas abelhas visando à metabolização dos substratos via processos fermentativos.

Após a contagem, 19 isolados foram selecionados por possuírem características morfológicas distintas, serem provenientes de fontes diferentes e resistentes as condições de isolamento. Destes, nove foram provenientes do mel de abelha Jataí (JM4, JM5, JM7, JM9, JM10, JM11, JM12, JM13, JM15); quatro do pólen apícola de abelha Jataí (JP3, JP6, JP12, JP14); um do mel de abelha Iraí (IM8); quatro do pólen apícola de abelha Iraí (IP5, IP6, IP9, IP12) e um do mel de abelha com ferrão (M1).

As colônias formadas pelos isolados tiveram morfologia predominantemente circular (79%), com superfície granulosa (100%) e convexa (74%), bordas lisas (95%) e de diâmetro entre 0,5 e 2,0 mm

(84%). As células apresentaram formato globuloso (95%) e se reproduziam por brotamento (95%), características comuns à maioria das leveduras conhecidas. O isolado IP12 se reproduz por fissão, diferindo dos demais. Entretanto, algumas leveduras já foram descritas realizando este tipo de reprodução, como a levedura *Schizosaccharomyces pombe*, que, além disso, possui forma cilíndrica (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010). A fonte de isolamento influencia o perfil de microrganismos isolados, os quais precisam se adaptar às condições do meio para sobreviverem (STANLEY et al., 2010). Entretanto, não houve nenhuma relação direta entre a morfologia e a fonte de isolamento.

3.2. Identificação das linhagens

Dos 19 isolados avaliados 9 foram provenientes de abelhas Jataí e pertenciam à espécie *Starmerella meliponinorum*, 2 da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*; 5 da espécie *Saccharomyces cerevisiae*; 1 da espécie *Papiliotrema flavescens* e 2 da espécie *Candida apicola* (Tabela 2).

Tabela 2: Alinhamento das sequências dos isolados via software Blast®.

Isolados	*Cod.	Descrição	E-value	Ident	Código
JM4	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM5	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM7	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM9	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM10	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM11	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM12	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JM13	<i>S. c.</i>	Saccharomyces cerevisiae cepa Y11	0.0	98%	KX428527.1
JM15	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa SB147	0.0	100%	AB568334.1
JP3	<i>P. f.</i>	Papiliotrema flavescens, cepa: DMKU-CE139	0.0	100%	LC178830.1
JP6	<i>S. m.</i>	Starmerella meliponinorum cepa CBS 9117	0.0	99%	KJ630492.1
JP12	<i>R. m.</i>	Rhodotorula mucilaginosa cepa SK0809R 2	0.0	100%	KP990660.1
JP14	<i>S. c.</i>	Saccharomyces cerevisiae cepa S2-6	0.0	100%	KU862641.1
IM8	<i>S. c.</i>	Saccharomyces cerevisiae isolate yazhong W3N4	1,00E-35	97%	KX119945.1
M1	<i>C. a.</i>	Candida apícola	0.0	100%	U45703.1
IP5	<i>C. a.</i>	Candida apicola cepa BEE-2b	0.0	99%	KT718105.1
IP6	<i>R. m.</i>	Rhodotorula mucilaginosa isolate SM6-1	0.0	100%	KU316790.1
IP9	<i>S. c.</i>	Saccharomyces cerevisiae cepa 4	0.0	96%	HM107797.1
IP12	<i>S. c.</i>	Saccharomyces cerevisiae cepa V3	9,00E-177	86%	KX428526.1

* Código atribuído as espécies

As linhagens da levedura *Starmerella meliponinorum* são associadas aos substratos das abelhas sem ferrão no Brasil e na Costa Rica. Essas estão presentes nos descartes feitos pelas abelhas na colméia, no pólen apícola, no mel e na própolis de *Tetragonisca angustula* (Jataí), em mel de *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) e em adultos de abelhas *Melipona rufiventris* (Uruçú-amarela) e *Trigona fulviventris* (abelha cachorro) (TEIXEIRA et al., 2003).

A levedura *Cryptococcus (Papilotrema) flavescens* foi originalmente chamada de *C. laurentii* sendo considerada potencialmente patogênica para seres humanos imunodeprimidos (IKEDA; MAEDA, 2004), entretanto

pode ser encontrada no solo, folhas e pântanos (SURUSSAWADEE et al., 2014; YURKOV et al., 2015). Linhagens de *Cryptococcus flavescens* são capazes de metabolizar glicose para produção de etanol, podendo ser aplicadas em indústrias de biocombustíveis (JAIBOON et al., 2016). Estudos mostram que esta levedura já foi encontrada em mel de abelha Jataí em São Paulo, bem como em abelhas dos gêneros *Bombus* e *Centris* no estado de Tocantins. Esta levedura apresentou a maior produção de lipídeos totais (1,27 g·L⁻¹) a partir da fermentação de resíduos de laticínios, o qual poderia ser direcionado à produção de biocombustível (CASTANHA et al., 2011; MORAIS et al., 2013).

As leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* possuem alta concentração de carotenoides em seu citoplasma (AKSU; TUĞBA EREN, 2005), sendo também associadas ao controle de fungo filamentosso cinzento em pós-colheita de frutos (LI et al., 2011). Também são capazes de produzir e acumular ácidos graxos como ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linolênico, podendo ser utilizadas para produção de biodiesel (LI et al., 2010). Esta levedura foi encontrada em méis de abelhas *Apis mellifera* na cidade de Trás-dos-Montes em Portugal (CARVALHO et al., 2005). Nenhum artigo, entretanto estudou a capacidade fermentativa desta levedura para produção de etanol.

Por fim, as leveduras da espécie *Candida apicola* também conhecidas como *Candida (Torulopsis) apicola*, fazem parte das espécies *non-Saccharomyces* associadas à produção de vinho para formação de aromas diversificados (REID et al., 2012). Estas leveduras são associadas às espécies *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) e *Melipona rufiventris* (Uruçú-amarela). Por isso, poderiam ser utilizadas na produção de bebidas como agentes de produção de aromas.

Devido ao baixo e-value encontrado nas linhagens IM8 e IP12, bem como a baixa porcentagem de identificação observada em JM13 e IP9, estas deverão ser novamente sequenciadas para confirmação dos

resultados. O e-value indica o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de score iguais ou melhores que o encontrado por acaso.

3.3. Seleção preliminar das linhagens

Em meio contendo etanol 4%, 10 linhagens (IP5, M1 – *C.a.*; JM4, JM10, JM11 – *S.m.*; JM13, IP12, JP14 – *S.c.*; IP6, JP12 – *R. m.*) apresentaram número de colônias maior ou semelhante ao padrão S (Figura 1A), das quais apenas sete (M1 – *C.a.*; JM4, JM10 – *S.m.*; JM13, JP14, IP12 – *S.*; e IP6 – *R. m.*) mantiveram resistência quando submetidas ao meio de alta osmolaridade (Figura 1B). Entretanto, quando as condições de estresse foram simultaneamente impostas, nenhuma levedura apresentou crescimento similar ou superior ao padrão (Figura 1C). Seis linhagens apresentaram desempenho de pelo menos 50% do potencial da *S. cerevisiae* comercial, sendo eles pertencentes às espécies *Candida apicola* (M1 e IP5), *Saccharomyces cerevisiae* (JM13, JP14 e IP9) e *Rhodotorula mucilaginosa* (IP6). Devido a isso, essas leveduras foram selecionadas para os testes posteriores. Além disso, as fontes de isolamento não foram determinantes para a resistência da levedura, já que foram selecionadas representantes de cada uma delas.

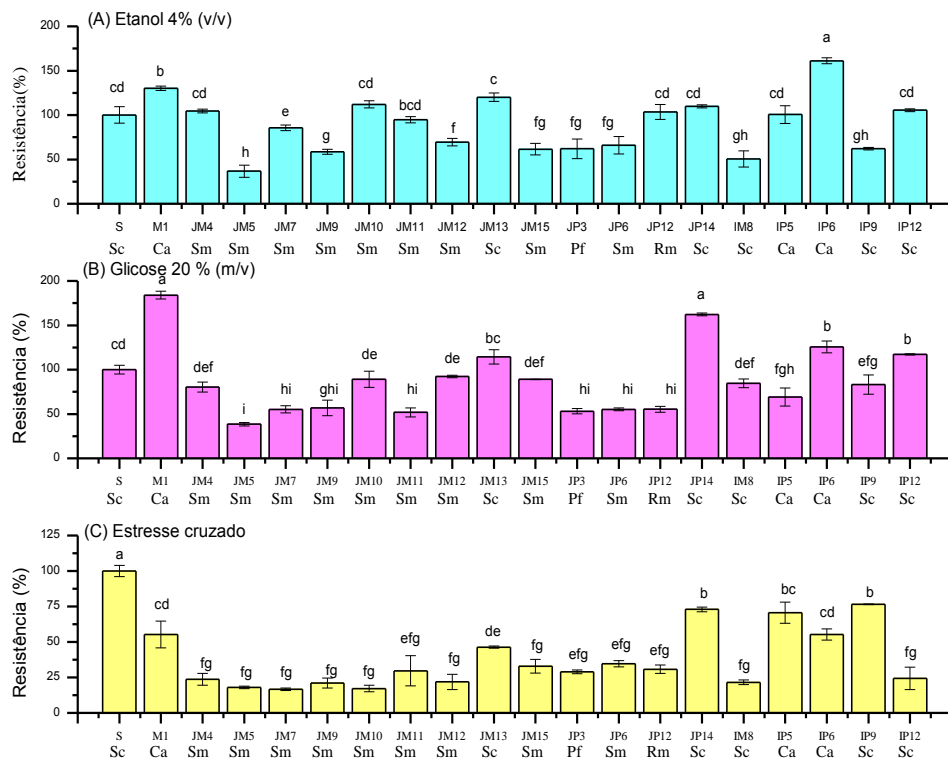


Figura 1. População final relativa das linhagens em relação à levedura padrão (S). O resultado foi obtido mediante a média das três repetições. As barras representam desvios-padrão de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra em um mesmo gráfico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Mostos usados nos processos de produção de bebidas alcoólicas apresentam concentrações de açúcares variando de 10 a 25% (m/v), sendo os açúcares glicose, frutose e sacarose os mais comumente utilizados. Nessas condições, o etanol é produzido, alcançando teores de 4 até 14% (v/v), afetando a fluidez da membrana celular de microrganismos, a estabilidade das proteínas e a produção de energia inibindo a multiplicação celular (LEWIS et al., 2010). Ao longo do processo de produção de bebidas, o fermento é submetido simultaneamente em ambas as condições de estresse, quando parte do etanol já foi produzido e os açúcares ainda não foram completamente consumidos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). De forma geral, todas as linhagens apresentaram maior dificuldade de desenvolvimento no estresse cruzado de etanol e açúcar em comparação à linhagem comercial. O etanol aumenta a porosidade da membrana celular pela

solubilização dos lipídeos, enquanto a glicose induz a perda de água da célula (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Por isso, no estresse cruzado o processo de desidratação é ainda mais elevado. Leveduras são consideradas pouco resistentes quando não são capazes de crescer em concentrações de 20% (m/v) de hexoses, enquanto as mais resistentes crescem em até 70% (m/v) (TORRE-GONZÁLEZA et al., 2016). Linhagens de *S. cerevisiae* são relatadas como capazes de crescer em até 15% (v/v) de etanol, enquanto as *não-Saccharomyces* o valor máximo foi de 10% (v/v) em meios contendo 20% (m/v) de glicose (TORRE-GONZÁLEZA et al., 2016). Assim, foram selecionadas para os testes posteriores as linhagens mais resistentes (M1, IP5- *C.a*; JM13, JP14, IP9 – *S. c.*; e IP6 *R. m.*) e também a IM8, escolhida arbitrariamente por ser a única pertencente ao mel de abelha Iraí e apresentar aromar agradáveis durante a fermentação em meio ideal para leveduras.

3.4. Testes de tolerância

A adição de 10% (v/v) de glicose ao meio de cultivo não causou desvios significativos no padrão cinético de crescimento das leveduras em comparação ao meio com 2% de glicose (Figura 2A), embora estes tenham diferido da linhagem padrão, que apresentou maior tempo para adaptação. Nas demais concentrações de glicose, a levedura JM13 (*S. c.*) apresentou dificuldades de crescimento, enquanto a JP14 e IP9 pertencentes à mesma espécie (*S. cerevisiae*), apresentaram as maiores taxas de crescimento frente às demais leveduras e ao padrão (Figuras 2A-F; Tabela 3).

Tabela 3: Velocidade específica de crescimento (h^{-1}) das linhagens em diferentes concentrações de glicose.

Linhagens	Concentrações de glicose (m/v)					
	2%	10%	20%	30%	40%	50%
S (S. c.)	0,26 ± 0,03 cd	0,22 ± 0,05 bc	0,21 ± 0,13 ab	0,34 ± 0,06 ab	0,30 ± 0,13 ab	0,22 ± 0,01 bc
M1 (C. a.)	0,50 ± 0,03 e	0,12 ± 0,06 c	0,41 ± 0,05 a	0,24 ± 0,01 bc	0,14 ± 0,07 b	0,16 ± 0,01 cd
IM8 (S. c.)	0,37 ± 0,04 bc	0,23 ± 0,01 bc	0,22 ± 0,01 ab	0,37 ± 0,10 ab	0,22 ± 0,09 ab	0,22 ± 0,10 bc
IP5 (C. a.)	0,37 ± 0,09 abc	0,14 ± 0,01 bc	0,14 ± 0,03 b	0,16 ± 0,03 c	0,23 ± 0,04 ab	0,20 ± 0,01 bcd
IP6 (R. m.)	0,52 ± 0,02 a	0,24 ± 0,02 ab	0,29 ± 0,10 ab	0,45 ± 0,01 a	0,41 ± 0,13 a	0,21 ± 0,05 bcd
IP9 (S. c.)	0,52 ± 0,01 ab	0,19 ± 0,08 bc	0,26 ± 0,06 ab	0,40 ± 0,10 a	0,34 ± 0,01 ab	0,31 ± 0,04 ab
JM13 (S. c.)	0,12 ± 0,01 de	0,20 ± 0,02 bc	0,20 ± 0,02 b	0,13 ± 0,07 c	0,16 ± 0,05 b	0,09 ± 0,00 d
JP14 (S. c.)	0,40 ± 0,01 abc	0,35 ± 0,01 a	0,26 ± 0,07 ab	0,34 ± 0,06 ab	0,28 ± 0,03 ab	0,32 ± 0,01 a

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

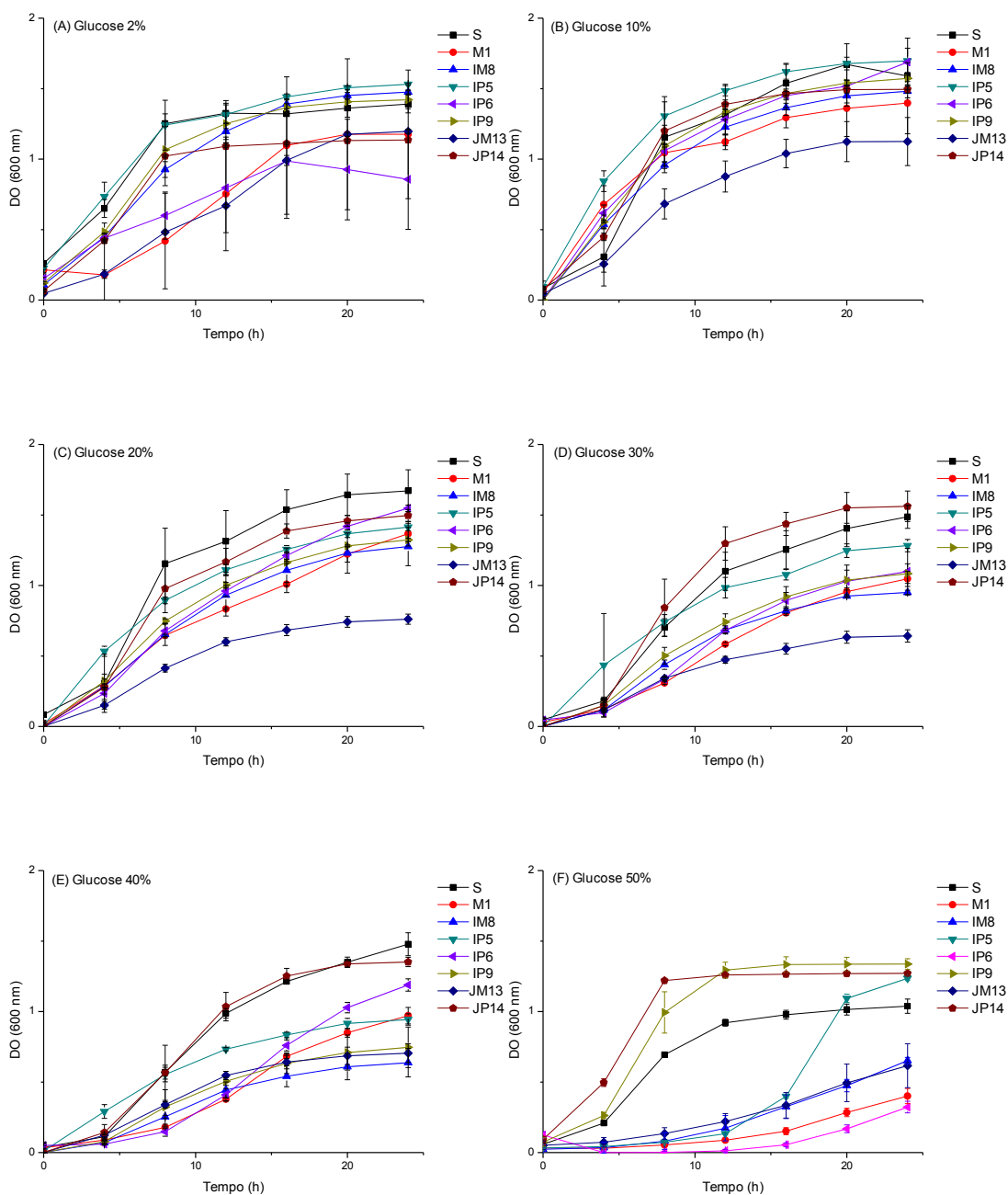


Figura 2. Curva de crescimento das linhagens em meio YEP com diferentes concentrações de glicose. Os resultados foram obtidos mediante a média de três repetições. As barras representam os desvios-padrão das médias de S, M1, IM8, IP5, IP6, IP9, JM13 e JP14.

As linhagens foram capazes de resistir até 10% de etanol, enquanto a levedura padrão resistiu até 15%, porém com maior tempo de adaptação. A concentração de 20% foi limitante para todas as leveduras

analisadas. Nas concentrações de 5 e 10% as leveduras IP6 (*R. m.*), JM13 (*S. c.*) e M1 (*C. a.*) apresentaram baixa velocidade de crescimento, sendo assim menos indicadas para produção de bebidas. As leveduras S, IP5 (*C. a.*), JP14 (*S. c.*), IM8 (*S. c.*) e IP9 (*S. c.*) apresentaram a maior resistência (Figura 3; Tabela 4).

Tabela 4: Velocidade específica de crescimento (h^{-1}) das linhagens em diferentes concentrações de etanol.

Isolado	Concentrações de etanol (v/v)			
	5%	10%	15%	20%
S (<i>S. c.</i>)	0,23 ± 0,02 a	0,30 ± 0,07 a	0,13 ± 0,06	-
M1 (<i>C. a.</i>)	0,07 ± 0,01b	0,07 ± 0,03 c	-	-
IM8 (<i>S. c.</i>)	0,24 ± 0,02 a	0,22 ± 0,05 b	-	-
IP5 (<i>C. a.</i>)	0,20 ± 0,03 a	0,14 ± 0,03 bc	-	-
IP6 (<i>R. m.</i>)	0,08 ± 0,01 b	-	-	-
IP9 (<i>S. c.</i>)	0,22 ± 0,04 a	0,26 ± 0,03 ab	-	-
JM13 (<i>S. c.</i>)	0,05 ± 0,01 b	-	-	-
JP14 (<i>S. c.</i>)	0,27 ± 0,06 a	0,23 ± 0,03 ab	-	-

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

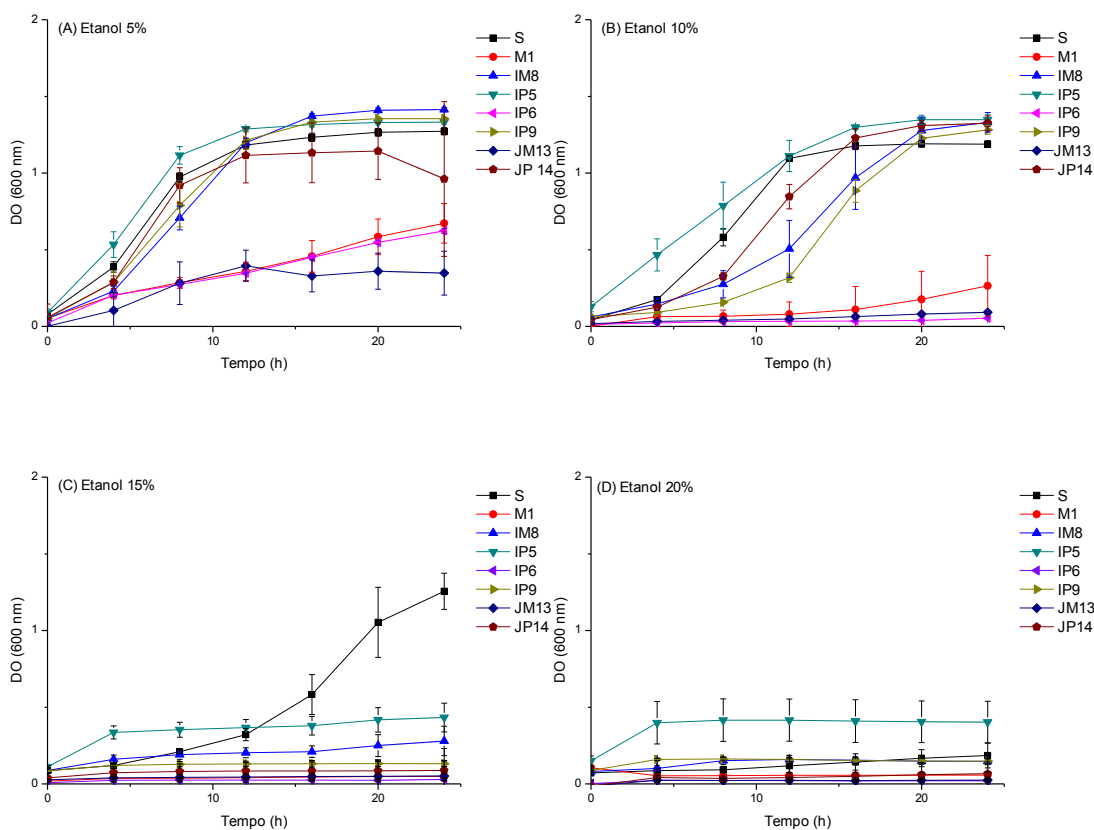


Figura 3. Curvas de crescimento das linhagens em YEPG com diferentes concentrações de etanol. Os resultados foram obtidos mediante a média de três repetições. As barras representam o desvio-padrão das médias de S, M1, IM8, IP5, IP6, IP9, JM13 e JP14.

O etanol é um importante produto da fermentação que pode agir como inibidor do crescimento das células de leveduras (STANLEY et al., 2010). Inicialmente, o etanol aumenta a fluidez da membrana plasmática destruindo sua integridade, o que é seguido por uma redução da disponibilidade de água, induzindo a desnaturação e inativação de enzimas (DA SILVA; BATISTOTE; CEREDA, 2013). As bebidas fermentadas não destiladas possuem teores alcoólicos variando de 0,5% (v/v) a 20% (v/v) (BRASIL, 2009). Entretanto, para produção de bioetanol e bebidas destiladas, quanto maior a resistência das leveduras menor será a perda de rendimentos causada pela inibição celular pelo produto de fermentação.

Em geral, leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam tolerância a meios contendo etanol, sendo a espécie, *S. cerevisiae*, aquela normalmente com maior tolerância, seguida por *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii* (ARROYO-LÓPEZ et al., 2010; BELLOCH et al., 2008). A tolerância a 10% de etanol é considerada satisfatória para produção de bebidas fermentadas cuja concentração de etanol pode variar entre 4 e 18% (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983).

Quando submetidas a concentrações crescentes de seu produto de fermentação, algumas células de leveduras podem responder ao estresse por etanol aumentando a sua tolerância (DING et al., 2009). Várias células desenvolvem sistemas de defesa ante o efeito do etanol, como por exemplo, a mudança na composição da membrana plasmática, aumentando os níveis de ácidos graxos insaturados e ergosterol, ou ainda a expressão de fatores que ajudam no reparo das proteínas desnaturadas (DING et al., 2009). A composição do meio (aminoácidos, lipídeos, etc.) pode também influenciar a resistência da levedura ao etanol (DING et al., 2009). Nas condições testadas, as linhagens IM8 (*S. c.*), IP5 (*C. a.*), IP9 (*S. c.*) e JP14 (*S. c.*) foram capazes de se adaptar e multiplicar-se nas concentrações de 5 e 10% de etanol, o que os torna candidatos em potencial para processos fermentativos em mostos com maiores concentrações de glicose. Destaque deve ser dado as linhagens IP9 (*S. c.*) e JP14 (*S. c.*), os quais apresentaram características de osmotolerância e maior velocidade de crescimento na concentração de 10% de etanol.

As linhagens JM13 (*S. c.*), M1 (*C. a.*) e IP6 (*R. m.*) apresentaram tolerância inferior às demais com relação à presença de metabissulfito de sódio no meio. Com o aumento da concentração, estas linhagens demonstraram capacidade de adaptação e por isso ao final das 24 h foi observada a fase de crescimento exponencial (Figura 4; Tabela 5).

Tabela 5: Velocidade específica de crescimento das linhagens em diferentes concentrações de metabissulfito de sódio.

Linhagens	Concentração de metabissulfito de sódio (mg.L ⁻¹)		
	100	250	500
S (<i>S. c.</i>)	0,30 ± 0,02 a	0,36 ± 0,05 a	0,42 ± 0,09 b
M1 (<i>C. a.</i>)	0,05 ± 0,01c	0,13 ± 0,01 d	0,25 ± 0,12 cd
IM8 (<i>S. c.</i>)	0,33 ± 0,04 a	0,21 ± 0,07 bcd	0,22 ± 0,00 cd
IP5 (<i>C. a.</i>)	0,12 ± 0,04 bc	0,15 ± 0,02 cd	0,21 ± 0,02 cd
IP6 (<i>R. m.</i>)	0,13 ± 0,01bc	0,19 ± 0,03 cd	0,60 ± 0,03 a
IP9 (<i>S. c.</i>)	0,20 ± 0,01 b	0,18 ± 0,01 bc	0,21 ± 0,03cd
JM13 (<i>S. c.</i>)	0,15 ± 0,04 b	0,11 ± 0,02 d	0,14 ± 0,01 d
JP14 (<i>S. c.</i>)	0,27 ± 0,03 a	0,30 ± 0,03 ab	0,37 ± 0,06 bc

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

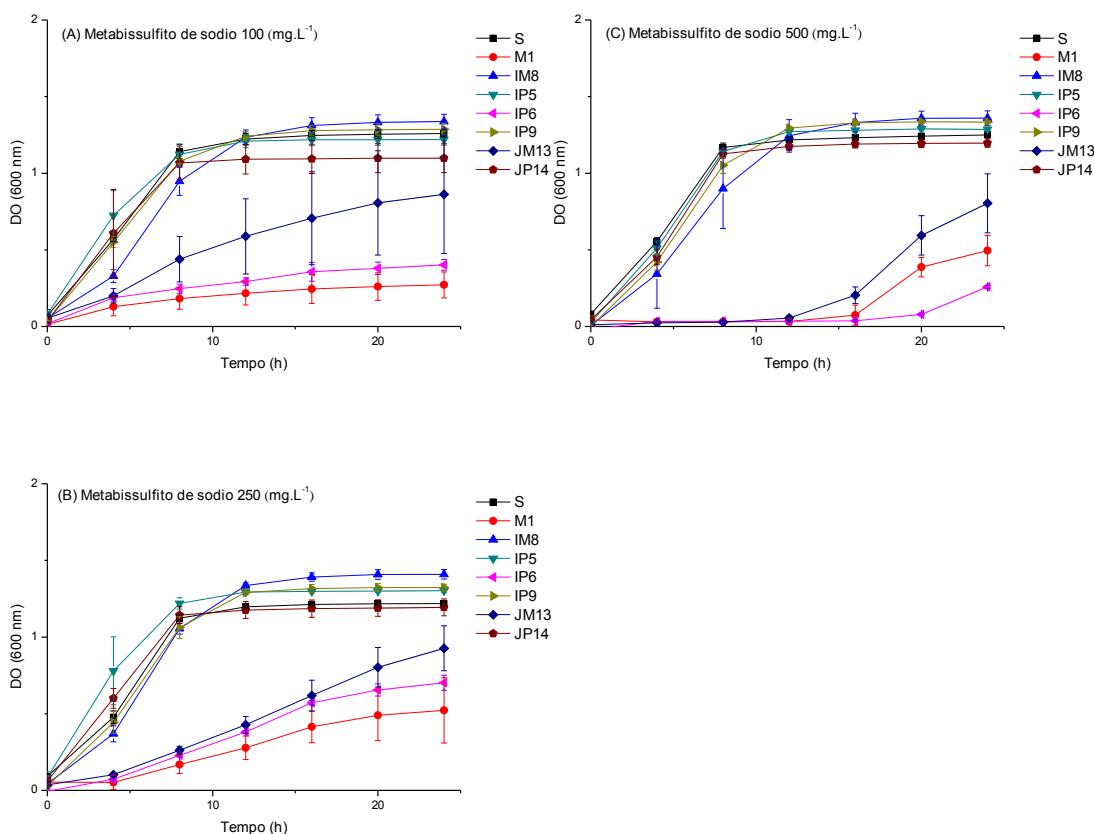


Figura 4. Curvas de crescimento das linhagens em YEPG com diferentes concentrações de metabissulfito de sódio. Os resultados foram obtidos mediante a média de três repetições. As barras representam os desvios-padrão das médias de S, M1, IM8, IP5, IP6, IP9, JM13 e JP14.

As linhagens S, JP14 (S. c.), IM8 (S. c.) e IP9 (S. c.) apresentaram os maiores valores nas concentrações de 100 e 250 mg·L⁻¹ de metabissulfito de sódio. À 500 mg·L⁻¹ a levedura IP6 apresentou o maior crescimento, entretanto após um tempo de adaptação que durou cerca de 20 h, sendo por isso considerada inviável para processos fermentativos.

O metabissulfito de sódio ou potássio é um importante aditivo usado na conservação e no preparo de bebidas fermentadas. O principal efeito do sulfito está ligado à diminuição da produção de ATP na célula (HINZE; HOLZER, 1985). Além disso, quando as células são submetidas a elevadas concentrações de sulfito ocorre um grande acúmulo desse composto na célula e sua dissociação em ácido sulfuroso, induzindo a morte celular (HINZE; HOLZER, 1985). A resistência a compostos sulfurosos é uma importante etapa na seleção de leveduras para produção de bebidas fermentadas, já que este é um conservante utilizado para inibição de bactéria e leveduras contaminantes no mosto (SCHIMZ; HOLZER, 1979). Como mecanismo de defesa as leveduras desenvolveram uma enzima, a sulfito redutase, que transforma o sulfito, dando a essas leveduras a característica de resistência (SCHIMZ; HOLZER, 1979).

O metabissulfito de potássio possui 50% de dióxido de enxofre (SO₂) em sua composição (ENATIS, 2006). A aplicação do SO₂ é realizada quase que exclusivamente para produção de vinhos, hidroméis e fermentados de frutas, durante a vinificação, onde recomenda-se a adição de 80 a 140 mg·L⁻¹ de metabissulfito no mosto (RIZZON; ZANUZ; MANFREDINI, 1994). As concentrações máximas de SO₂ livre indicado pela União Europeia são de 160 mg·L⁻¹ para vinhos tintos, 210 mg·L⁻¹ para vinhos brancos e roses e 235 mg·L⁻¹ para vinhos espumantes (EUROPEIA, 2009), e a concentração máxima permitida pela legislação brasileira é de 200 mg·L⁻¹ de SO₂ que corresponde a 400 mg·L⁻¹ de metabissulfito de potássio ou sódio. Além dos vinhos, a legislação brasileira prevê o uso do metabissulfito como conservante em bebidas por

mistura, bebidas compostas, cooler (ANVISA, 2012, 2013). As bebidas destiladas, bem como bioetanol, não possuem especificações para uso deste aditivo, já que os altos teores de etanol evitam naturalmente o desenvolvimento de possíveis contaminantes.

Em estudos de isolamento de leveduras para produção de hidromel, Pereira et al (2009) descreveram que a velocidade específica de crescimento das estirpes não foi afetada por concentrações de até 250 mg·L⁻¹ de SO₂ livre, entretanto a fase de crescimento exponencial foi retardada com o aumento da concentração de SO₂. Nesse estudo, comportamento semelhante foi observado nas leveduras JM13 (*S. c.*), IP6 (*R. m.*) e M1 (*C. a.*) à 500 mg·L⁻¹, que corresponde a 250 mg·L⁻¹ de SO₂ livre. Por outro lado, as leveduras S, IM8 (*S. c.*), IP5 (*C. a.*), IP9 (*S. c.*) e JP14 (*S. c.*) não apresentaram aumento na fase de adaptação em resposta ao aumento da concentração.

Levando em consideração a resistência das leveduras IM8 (*S. c.*), JP14 (*S. c.*) e IP9 (*S. c.*) em concentrações de 50% de glicose, 10% de etanol e até 500 mg·L⁻¹ de metabissulfito de sódio, além de sua identificação como *S. cerevisiae* infere-se que estes são os candidatos ideais para produção de vinhos, hidroméis e espumantes, e por isso foram selecionados para caracterização tecnológica visando o uso destes na produção de bebidas alcoólicas.

3.5. Caracterização tecnológica das linhagens

A levedura *S. cerevisiae* possui a capacidade de assimilar sacarose, galactose, glicose e manose, mas não assimila lactose e xilose (KURTZMAN et al., 2011a), o que foi confirmado pelo o padrão de utilização de açúcares apresentado pela levedura comercial e para as linhagens JP14, IM8 e IP9 (Tabela 6).

Tabela 6: Capacidade de utilização de diferentes substratos como fonte de carbono pelas linhagens.

Linhagens	Fontes de carbono						
	Sacar.	Glic.	Frut.	Lact.	Galact.	Man.	Xil.
S	+	+	+	-	+	+	-
JP14	+	+	+	-	+	+	-
IM8	+	+	+	-	+	+	-
IP9	+	+	+	-	+	+	-

Fontes de carbono: sacar – sacarose; glic – glicose; frut. – frutose; lact – lactose; galac – galactose; man – manose; xil – xilose.

A sacarose é facilmente encontrada em mostos de cana de açúcar, sorgo doce, em concentrações de até 90% e 60%, respectivamente (KIM; DAY, 2011). De modo semelhante, o mosto de beterraba apresenta concentrações de sacarose de até 90% em base seca (ZABED et al., 2014). Este açúcar, assim como os monômeros derivados da glicose e frutose, são também os principais componentes do mel, chegando a comporem 80% dos sólidos presentes nesse alimento (BUBA; GIDADO; SHUGABA, 2012). O uso desses substratos importante para que a linhagem seja utilizada como fermento para processos industriais. A lactose é um dissacarídeo composto por galactose e glicose, sendo encontrada em leite e subprodutos tais como o soro do leite em concentrações de até 5% (p/v) (ANDRADE et al., 2015). Este dissacarídeo é utilizado por espécies de leveduras como *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis* (DOMINGUES; GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2010; SOFIA; JOSHI; POLETTO, 2013), os quais possuem a β -galactosidase, responsável pela hidrólise desse dissacarídeo. Microrganismos que possuem esta enzima são capazes, portanto, de fermentar o leite, o que não ocorre com as linhagens JP14, IM8 ou IP9. Entretanto, o uso das linhagens como fermentadores em mostos à base de leite é possível por meio de hidrólise prévia da lactose. A xilose é encontrada em mostos de biomassa lignocelulósica em concentrações de 7 a 15% de xilose (PANG et al., 2016). Em menor proporção, a manose também é parte do componente hemicelulolítico desses vegetais. Devido a isto, microrganismos capazes de converter esses açúcares têm sido prospectados. Algumas leveduras

capazes de utilizar a xilose incluem *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Spathaspora passalidarum* e *Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO et al., 2006; LIU et al., 2012; TANIMURA et al., 2012). Nenhuma das leveduras isoladas apresentou capacidade de fermentar xilose, sendo inadequadas para o processo de produção de bioetanol a partir de hemicelulose.

O potencial das leveduras para processos fermentativos também foi confirmado quando foram avaliados seu crescimento e produção de compostos em diferentes condições de pH e temperatura. A levedura *S. cerevisiae* IM8, por exemplo, manteve a velocidade específica de crescimento em todos os pHs testados, exceto o pH 2,5 (Tabela 7; Figura 5).

Tabela 7: Velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) e Rendimento real em etanol ($Y_{(et/gli)}$) das linhagens em meio com diferentes valores de pH.

linhagens		pH				
		4	5,5	7	8	9
S	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,13 ± 0,01 b	0,13 ± 0,02 b	0,25 ± 0,03 a	0,11 ± 0,06 b	0,04 ± 0,03 c
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	12,53 ± 0,08 ab	10,90 ± 2,58 b	15,80 ± 0,03 a	12,89 ± 1,80 ab	12,10 ± 2,29 ab
IM8	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,10 ± 0,03 a	0,17 ± 0,02 a	0,12 ± 0,00 a	0,12 ± 0,05 a	0,16 ± 0,10 b
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	39,44 ± 6,17 a	23,00 ± 0,43 b	23,72 ± 3,91 b	24,32 ± 2,84 b	17,39 ± 1,73 b
IP9	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,17 ± 0,01 ab	0,19 ± 0,07 a	0,26 ± 0,07 a	0,04 ± 0,01 c	0,05 ± 0,00 bc
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	34,45 ± 3,58 ab	40,44 ± 8,62 a	21,65 ± 1,61 abc	19,21 ± 5,61 bc	14,20 ± 3,33 c
JP14	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,03 ± 0,01 b	0,07 ± 0,01 b	0,20 ± 0,10 a	0,08 ± 0,01 b	0,08 ± 0,01 ab
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	36,18 ± 6,15 a	22,03 ± 0,23 b	23,92 ± 1,10 b	24,09 ± 0,13 b	18,01 ± 2,04 b

Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). As barras representam os desvios-padrão das médias de S, IM8, IP9 e JP14.

As leveduras padrão e JP14 apresentaram crescimento máximo em pH 7,0, embora ainda tenham mantido o potencial replicativo em meios ácidos, comuns a mostos de bebidas à base de frutas, vegetais e mel, cujos valores de pH giram em torno de 4,0 (BELLOCH et al., 2008).

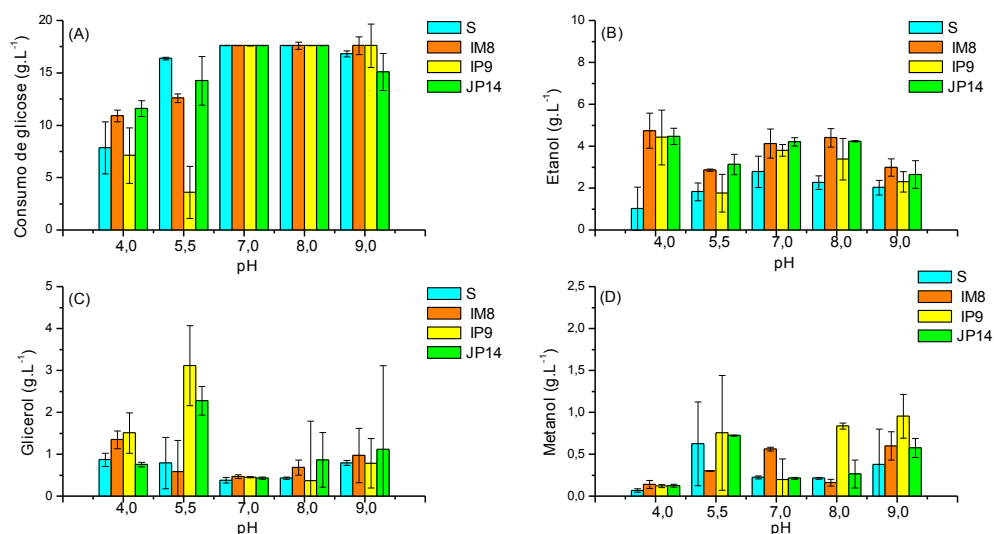


Figura 5. Consumo de glicose (A) e produção de etanol (B), glicerol (C) e metanol (D) em mostos com diferentes valores de pH a 28 °C. Os resultados foram obtidos após 24 h de fermentação. As barras representam os desvios-padrão das médias de S, IM8, IP9 e JP14.

A levedura padrão apresentou maior rendimento em etanol em pH 7,0, mas potencial para produção de etanol foi inferior ao das leveduras isoladas de abelhas sem ferrão. As leveduras IM8 e JP14 apresentaram maior rendimento em pH 4,0, e a levedura IP9 em pH 5,0, sendo este o maior valor de rendimento registrado. Assim recomenda-se que a fermentação das leveduras ocorra em mosto ácido. A levedura IM8 apresenta alta produção de etanol também em pH 8,0, entretanto em pH 9,0 todos as linhagens apresentaram menor rendimento (Tabela 7; Figura 5).

Em nenhum dos tratamentos testados, tanto para diferentes condições de pH ou temperatura, houve produção significativa de ácido acético ($< 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A presença deste composto em bebidas é um dos indicativos de contaminação por outros fungos ou bactérias. Por exemplo, as leveduras das espécies *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* são os contaminantes mais relevantes causadores de *off-flavors* em vinhos, assim como bactérias do gênero *Acetobacter spp* (MALFEITO-FERREIRA, 2014).

Embora tenha havido menor consumo de substrato, foram obtidos teores alcoólicos semelhantes em pH 7 e 8, o que indica que este pH é ideal para fermentações visando maior eficiência de conversão. Considerando os mostos tradicionalmente usados na fabricação de bebidas (pH 3,5 - 4,5), os açúcares presentes poderão ser convertidos de forma eficiente por todos as linhagens. Neste pH houve baixa produção de glicerol e ausência de metanol, o que potencializa o uso dessas linhagens para produção de bebidas sensorialmente agradáveis e seguras.

Em pH 5,5 foi observada produção dos maiores teores de glicerol registrados. Este produto confere à bebida maior suavidade e aumento de viscosidade, quando em proporções entre 1-15 g·L⁻¹ (SCANES; HOHMANN; PRIOR, 1998), assim as concentrações produzidas em pH de 4,0 e 5,0 foram ideais para produção de bebidas pois apresentaram variações de 0,8-4,0 g·L⁻¹.

Em pH 8,0, as linhagens em geral consumiram praticamente toda a glicose presente no meio (Figura 5A). Entretanto, esse elevado consumo não foi convertido em maiores rendimentos em etanol (Figura 5B), o que também foi observado nos tratamentos em pH 9,0. Esses açúcares possivelmente foram convertidos em componentes celulares. Nestes meios também foi gerado metanol na concentração entre 0,1 a 0,5 g·L⁻¹ (Figura 5C). O metanol é formado principalmente pela degradação de pectina existente nos mostos à base de frutas e vegetais a partir da enzima pectina-metil esterase (BARNETT, 2003; GEROYIANNAKI et al., 2007; L'ENFANT et al., 2015). Como o meio utilizado não apresenta pectina em sua composição, a produção deste composto apresentou-se baixa e em níveis de pH alcalinos, e isso leva a indicação destas leveduras para produção de bebidas.

As linhagens obtidas das fontes apícolas apresentaram maiores rendimentos de conversão em comparação à levedura comercial a 25 °C.

Em geral, as leveduras exibiram as maiores velocidades específicas de crescimento em temperatura de 20 °C e estabilidade cinética na faixa de temperatura testada. Este perfil foi distinto na levedura comercial, que possui temperatura ótima de crescimento a 25 °C e tem o crescimento afetado por menores variações de temperatura.

Tabela 8: Velocidade específica de crescimento (μ_{max}) e Rendimento real em etanol ($Y_{(et/gli)}$) das linhagens em meio com diferentes valores de temperaturas.

Linhagens		Temperatura				
		10	15	20	25	30
S	μ_{max} (h ⁻¹)	0,20 ± 0,01 b	0,20 ± 0,00 b	0,18 ± 0,00 b	0,25 ± 0,03 a	0,18 ± 0,01 b
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	21,03 ± 3,24 ab	19,44 ± 3,66 ab	25,38 ± 1,42 a	18,30 ± 4,28 ab	14,99 ± 3,99 b
IM8	μ_{max} (h ⁻¹)	0,18 ± 0,03 a	0,18 ± 0,03 a	0,20 ± 0,01 a	0,12 ± 0,01 b	0,11 ± 0,00 b
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	14,33 ± 4,70 b	19,69 ± 0,75 ab	18,72 ± 2,37 ab	23,79 ± 3,93 a	17,61 ± 2,81 ab
IP9	μ_{max} (h ⁻¹)	0,23 ± 0,14 a	0,29 ± 0,01 a	0,37 ± 0,12 a	0,23 ± 0,14 a	0,16 ± 0,10 a
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	15,47 ± 2,07 a	7,37 ± 1,58 b	17,60 ± 3,11 a	21,71 ± 1,62 a	8,36 ± 2,92 b
JP14	μ_{max} (h ⁻¹)	0,20 ± 0,16 a	0,14 ± 0,02 a	0,14 ± 0,02 a	0,29 ± 0,02 a	0,12 ± 0,01 a
	$Y_{(et/gli)}$ (%)	24,13 ± 3,31 a	21,51 ± 1,18 a	24,42 ± 2,51 a	23,99 ± 1,10 a	22,91 ± 3,88 a

Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). As barras representam desvios-padrão médias de S, IM8, IP9 e JP14.

Na linhagem padrão o maior rendimento ocorreu na temperatura de 20 °C, na IM8 o rendimento em etanol manteve-se constante entre 15 e 30 °C. Na IP9 as temperaturas de 10, 20 e 25 °C foram consideradas ideais, enquanto para JP14 não foi observada diferença com a variação de temperatura.

A maioria das leveduras utilizadas em processos fermentativos é mesófila, mas algumas se desenvolvem a baixas temperaturas (KURTZMAN et al., 2011b). Em geral, a fermentação para produção de bebidas dá-se a baixas temperaturas (7-20 °C), evitando assim o aparecimento de compostos aromáticos menos agradáveis (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

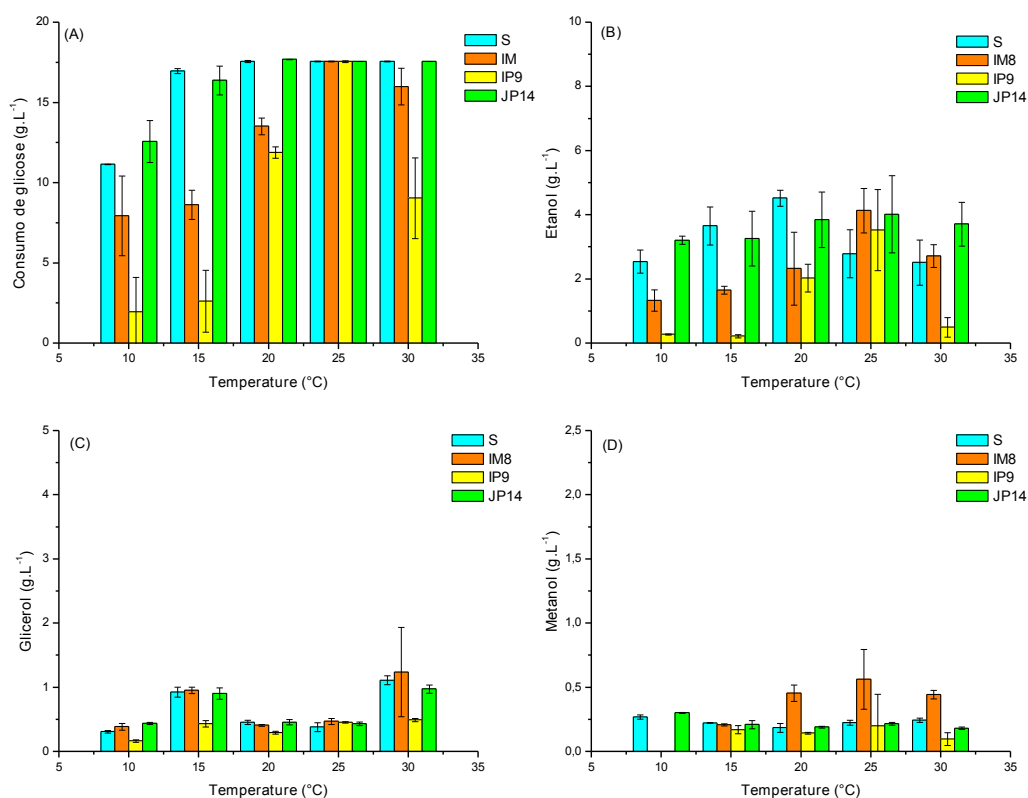


Figura 6. Consumo de glicose (A) e produção de etanol (B), glicerol (C) e metanol (D) em mostos submetido a diferentes temperaturas em pH de 7,0. Os resultados foram obtidos após 24 h de fermentação. As barras representam os desvios-padrão das médias de S, IM8, IP9 e JP14.

O maior consumo de glicose, em geral, foi observado quando as leveduras foram incubadas a 25 °C (Figura 6A), e isto se refletiu em um aumento na produção de etanol por eles (Figura 6B). Apenas nesta temperatura a produção de etanol foi superior à produção pela levedura padrão, em pH 7,0, a qual teve maiores rendimentos a 20 °C.

O consumo de glicose e a produção de etanol pela JP14 nas diferentes temperaturas seguiu perfil semelhante ao observado para a levedura padrão. Essa semelhança se repetiu ao longo dos testes de resistência e de caracterização tecnológica. Já a IP9 apresentou grande sensibilidade às variações de temperatura, praticamente sem produção de etanol a 10, 15 e 30 °C. A IM8, que apresentou altas velocidades específicas de crescimento nas menores temperaturas, ao contrário

produziu teores de etanol semelhantes ao padrão quando incubado a 25 e 30 °C.

A produção de etanol em temperatura ambiente é visada na produção de bioetanol, seja pela menor necessidade de resfriamento dos reatores ou ainda pela possibilidade de tornar simultâneos os processos de hidrólise de celulose e fermentação (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016). Para produção de bebidas, altas temperaturas implicam em maior probabilidade de desenvolvimento de contaminantes mesofílicos e também produção de álcoois superiores como o metanol pelas leveduras (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Entretanto, a baixas temperaturas o metabolismo das leveduras fica reduzido e pode levar a baixos rendimentos de produção de etanol (WALKER; DUNDEE, 2009). A levedura JP14 possui vantagens competitivas nesse aspecto pelos altos rendimentos em etanol obtidos a 10 e 15 °C.

Dentre as linhagens selecionados a IP9 apresentou maior sensibilidade ao metabissulfito de sódio e baixos rendimentos quando comparada às selecionadas em etanol nas temperaturas testadas. A linhagem IM8 apresentou características de resistência a 40% de glicose e 500 mg.L⁻¹ de metabissulfito de sódio, não teve sua multiplicação afetada pelo etanol nas concentrações testadas e apresentou altos rendimentos em etanol numa ampla faixa de pH. Por fim, a levedura JP14 apresentou perfis semelhantes ao da levedura padrão, e sua dinamicidade e alto rendimento em diferentes temperaturas faz deste isolado também um bom candidato a ser avaliado. Dessa forma, recomenda-se que as linhagens IM8, JP14 e IP9 sejam avaliadas quanto à sua capacidade de produção de bebidas com características sensoriais adequadas.

4. CONCLUSÕES

Os produtos apícolas consistem em fontes satisfatórias para o isolamento de microrganismos para fins fermentativos, todos as leveduras selecionadas foram da espécie *Sacharomyces cerevisiae*, porém

pertencentes à tres fontes distintas, as quais foram pólen apícola de abelha Jataí (JP14), pólen apícola de abelha Iraí (IP9) e mel de abelha Iraí (IM8). Estas são candidatas promissoras a produção de bebidas devido resistência a concentrações de até 50% (m/v) de glicose, 10% (v/v) de etanol e 500 mg·L⁻¹ de metabissulfito de sódio, além disso, apresentaram rendimento real de etanol superior ao padrão comparativo em diferentes pHs e temperaturas.

Dessa forma, foi possível isolar leveduras pertencentes a espécie *Sacharomyces cerevisiae* com potencial para produção de bebidas que evidenciaram características superiores quando comparada a levedura comercial.

ANEXOS

Anexo 1: Fórmulas de regressão com seus respectivos limites de linearidade por leveduras pré-selecionadas

Linhagem	Limite min de DO ₆₀₀	Limite min de cel.mL ⁻¹	Limite max de DO ₆₀₀	Limite max de cel.mL ⁻¹	Fórmula de regressão
S	0,162	5,40E+06	0,585	3,30E+07	$y = 5E+07x - 2E+06$ $R^2 = 0,951$
IM8	0,089	1,3E+06	0,718	1,6E+07	$y = 2E+07x - 2E+06$ $R^2 = 0,975$
JP14	0,122	1,2E+06	0,693	1,4E+07	$y = 3E+07x - 2E+06$ $R^2 = 0,9611$
IP6	0,136	2,7E+06	1,98	4,19E+07	$y = 2E+07x - 2E+06$ $R^2 = 0,9945$
IP5	0,136	2,7E+06	0,616	1,3E+07	$y = 2E+07x - 1E+06$ $R^2 = 0,9372$
IP9	0,113	1,6E+06	0,6	1,6E+07	$y = 3E+07x - 3E+06$ $R^2 = 0,9803$
JM12	0,127	3,8E+06	0,606	1,5E+07	$y = 2E+07x + 1E+06$ $R^2 = 0,9438$
M1	0,115	3,8E+06	0,622	3,0E+07	$y = 5E+07x + 550086$ $R^2 = 0,9588$

CAPÍTULO 3: TEMPERATURA IDEAL PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL COM LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS DE ABELHAS NATIVAS

RESUMO

Na produção de hidromel existem desafios relacionados à otimização e padronização do processo. Este trabalho teve como objetivo a determinação da temperatura ideal para fermentação de mosto de mel com uso de leveduras selecionadas a partir de produtos de abelhas sem ferrão. Para tanto as leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* (IM8, JP14, IP9) foram propagadas e inoculadas em mosto de mel a 25 °Brix em sólidos solúveis, suplementado com ativantes de fermentação B1 (Indupropil®) e metabissulfito de sódio (Indupropil®). Os mostos foram incubados nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e o processo fermentativo foi acompanhado por meio da contagem de células, açúcares totais, turbidez e acidez total a cada 24 h durante 7 dias e posteriormente a cada 7 dias até o 42º dia, tempo no qual os hidroméis foram destilados e analisados quanto ao pH, acidez volátil, acidez fixa e teor alcoólico. A temperatura recomendada para a produção de hidromel foi dependente da linhagem de levedura utilizada. Para as leveduras S (controle comercial) e IP9 a temperatura de fermentação ideal foi de 20-30 °C, pois na temperatura de 15 °C observou-se baixo consumo de açúcar e baixo crescimento de células. As leveduras IM8 e JP14 podem ser fermentadas de 15-30 °C, e à medida que a temperatura aumenta maior é a acidez total e o consumo de açúcares. Levando em conta o alto consumo de açúcares e o índice de acidez total intermediário recomenda-se que hidroméis produzidos sejam fermentados a 20 °C. Portanto, a temperatura ideal de fermentação, comum a todas as leveduras testadas, foi 20 °C, e as leveduras selecionadas apresentaram maior rendimento em etanol quando comparada *S. cerevisiae* controle.

Palavras-chave: Fermento, Fermentação, Controle de processo.

1. INTRODUÇÃO

O hidromel é caracterizado como uma bebida derivada do mel que contém de 4 a 14 % (v/v) de etanol a 20 °C, resultante da fermentação alcoólica de mosto de mel diluído e adicionado de sais minerais (GUPTA; SHARMA, 2009; MAPA, 2008). É uma bebida com progressiva importância econômica devido ao aumento da demanda nacional e mundial por produtos fermentados (AZEREDO et al., 2003), o que leva à necessidade de leveduras específicas e processos padronizados.

A temperatura tem influência direta sobre o rendimento fermentativo e no desenvolvimento de produtos secundários desejáveis ou não durante a fermentação (PANDA, 2011). Altas temperaturas podem inviabilizar o agente de fermentação ou induzir a produção de compostos indesejáveis, enquanto, temperaturas muito baixas levam à reduzida multiplicação das leveduras, interferindo no rendimento e na velocidade do processo. Assim, as temperaturas ideais para um processo fermentativo devem considerar menor atividade de leveduras e bactérias contaminantes, menor perda de compostos aromáticos, maior rendimento de etanol e menor acidez total, características estas que dão ao produto maior qualidade (PANDA, 2011).

Em 2014, três leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de produtos apícolas foram selecionadas devido a suas características de osmotolerância, e de resistência a sulfito e etanol para produção de bebidas. Neste trabalho estas linhagens foram aplicadas a produção de hidromel objetivando a determinação da melhor temperatura de fermentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo do pré-inóculo e inoculação no mosto

As leveduras selecionadas e a levedura comercial *S. cerevisiae* r.f. *bayanus* E491 (Perdomini/Blastosel Delta[®]) foram propagadas em meio YEPG [0,5% (m/v) de extrato de levedura - KASVI[®], 1% (m/v) de peptona - lmedia[®] e 2% (m/v) de glicose - Neon[®]] a 28 °C até atingir uma contagem de 10⁷ células·mL⁻¹. O material inoculado foi centrifugado a 3.370 xg por 10 min e ressuscitado em mosto de mel contendo 25 °Brix, 0,025% (m/v) de ativante de fermentação B1 (Indupropil[®]) e 0,015% (m/v) de metabissulfito de sódio (Indupropil[®]). As linhagens foram pré-inoculadas em 500 mL de mosto em frascos de plástico munidos de *airlock* de modo que o número final de células fosse de aproximadamente 10⁶ células·mL⁻¹. Os mostos foram armazenados a 15, 20, 25 e 30 °C. Foram realizadas três repetições com fermentações independentes (GUPTA; SHARMA, 2009; MATTIETTO et al., 2006).

2.2. Acompanhamento do processo fermentativo

Nos sete primeiros dias (fermentação tumultuosa), análises de contagem de células viáveis em câmara de Neubauer tendo azul de metileno como corante vital, turbidez, acidez total e açúcares totais foram realizadas a cada 24 h. Após essa primeira semana, as análises foram realizadas a cada sete dias até o 35º dia, momento no qual foi observada a floculação e o hidromel foi refrigerado para clarificação por sete dias. Assim no 42º dia aplicou-se as análises finais de pH, teor alcoólico, acidez fixa e acidez volátil além das análises anteriores (AOAC, 2000; OIV, 2015).

O teor de açúcares foi determinado com refratômetro analógico (ATC[®]) e a turbidez por D.O a 560 nm do mosto sobrenadante, comprimento de onda indicado para análise de coloração do mel, utilizando o mosto não inoculado como branco. A acidez total foi acompanhada pelo método titulométrico utilizando solução hidróxido de

sódio 0,1N e os resultados indicados como meq.L⁻¹ (AOAC, 2000; OIV, 2015).

Para o grau alcoólico real em % (v/v) as amostras foram ajustadas a temperatura de 20 °C e a densidade foi analisada com auxílio de um picnômetro. Posteriormente, a densidade foi convertida em teor alcoólico por meio da tabela padrão (OIV, 2015).

A acidez volátil foi analisada na solução hidroalcoólica por titulometria utilizando 10 mL do destilado, enquanto a acidez fixa foi obtida pela diferença entre acidez total e acidez volátil, os resultados foram expressos em mEq.L⁻¹ (OIV, 2015).

2.3. Delineamento estatístico

O experimento foi realizado em três repetições independentes para comparar as médias finais dos dados de contagem de células viáveis, turbidez, acidez total, açúcares totais, pH, teor alcoólico, acidez fixa e acidez volátil. O comparativo foi realizado mediante esquema fatorial onde o fator 1 foi determinado pela variação das leveduras e o fator 2 pela variação das temperaturas. Ao final, quando a interação foi significativa o teste de médias foi aplicado, considerando o cruzamento dos fatores como tratamentos. Quando a interação foi não significativa, aplicou-se teste de médias em cada fator individualmente considerando o fator oposto como repetição (SILVA, 1996). Para análise de variância foi utilizado uma ANOVA e o teste de Tukey ao nível de 5% de para comparação entre médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Acompanhamento do processo fermentativo

O acompanhamento do processo fermentativo dá indícios de como cada levedura se comporta com relação aos atributos em diferentes temperaturas.

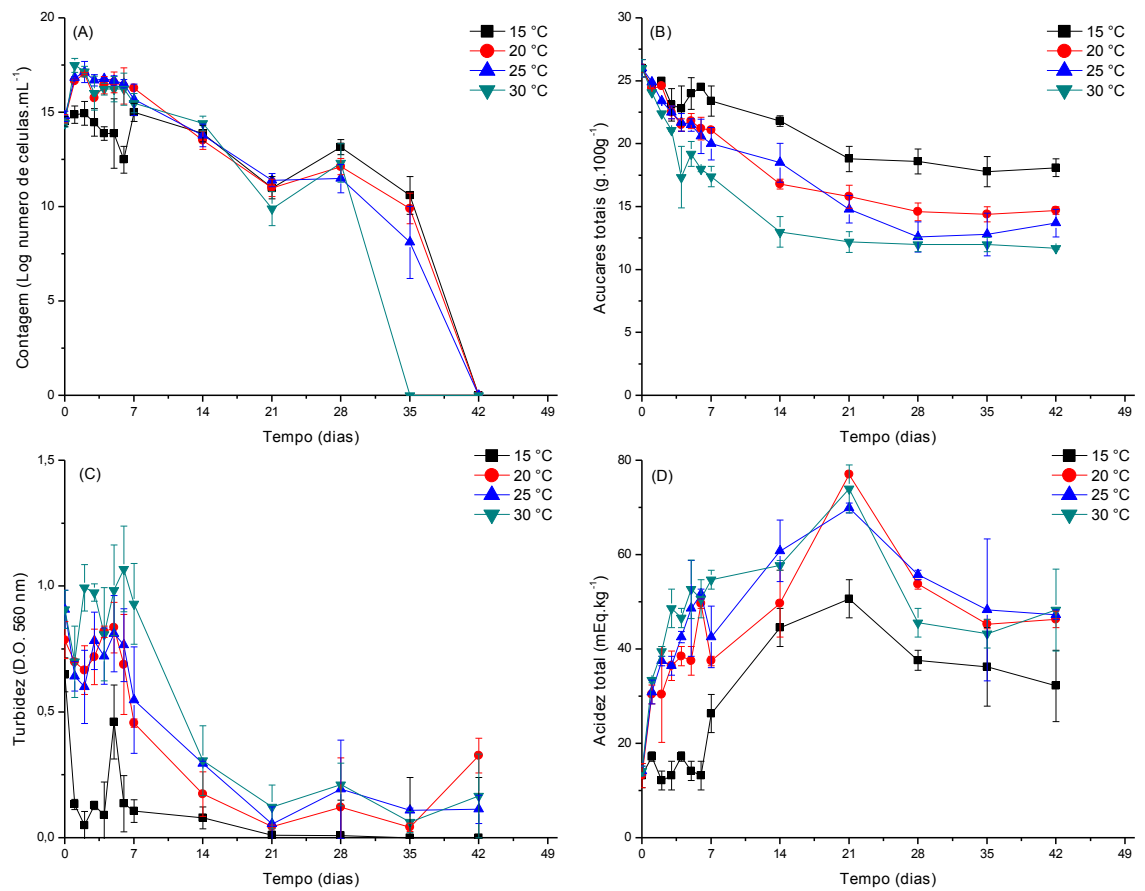


Figura 1: Comportamento da levedura padrão (S) durante 42 dias de fermentação. (A) Contagem de células viáveis do sobrenadante; (B) Açúcares totais; (C) Turbidez do sobrenadante e (D) Acidez total dos hidromeis nas diferentes temperaturas.

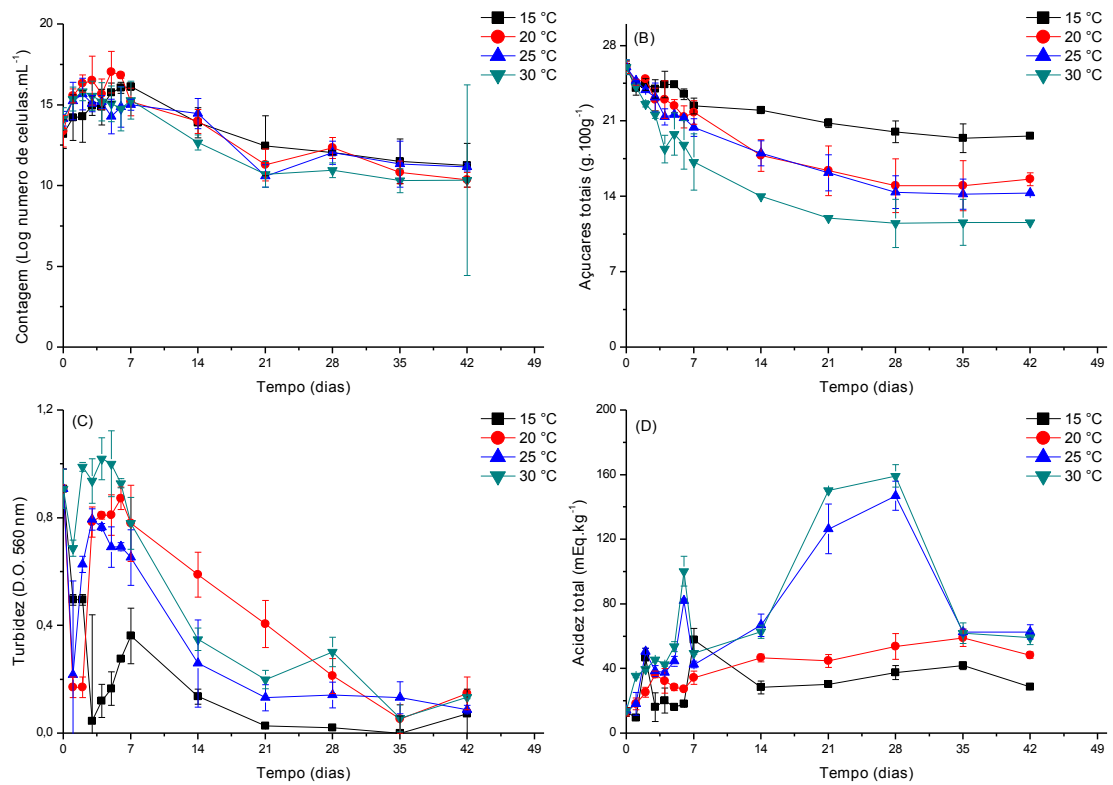


Figura 2: Comportamento da levedura IM8 durante 42 dias de fermentação. (A) Contagem de células viáveis do sobrenadante; (B) Açúcares totais; (C) Turbidez e (D) Acidez total dos hidromeis produzidos nas diferentes temperaturas.

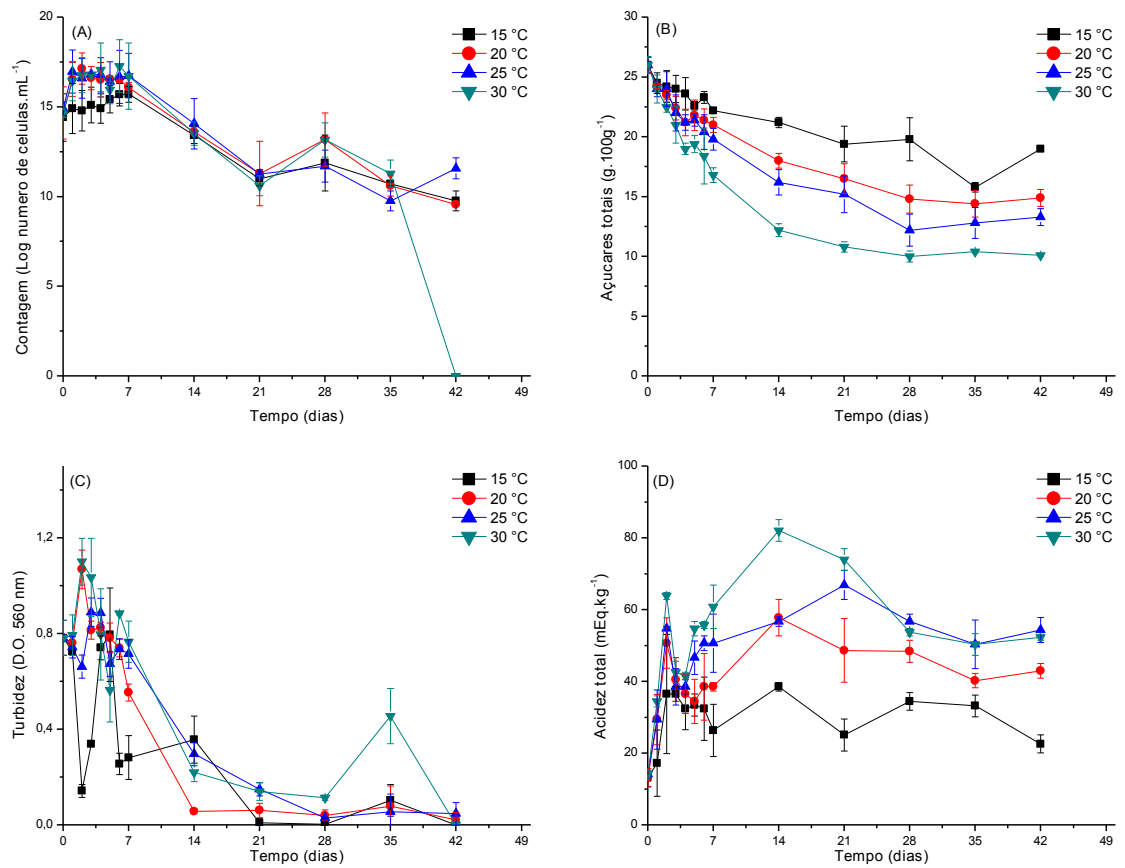


Figura 3: Comportamento da levedura JP14 durante 42 dias de fermentação. (A) Contagem de células viáveis do sobrenadante; (B) Açúcares totais; (C) Turbidez e (D) Acidez total dos hidromeis produzidos nas diferentes temperaturas.

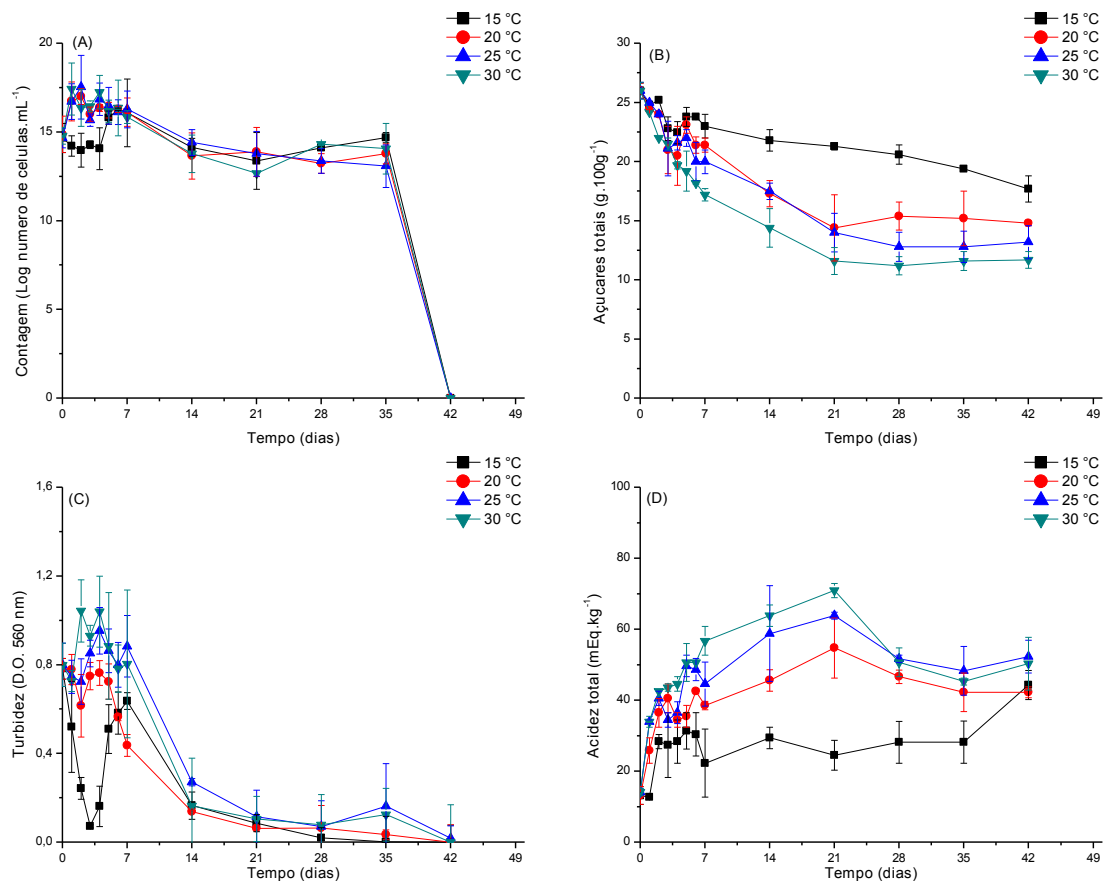


Figura 4: Comportamento da levedura IP9 durante 42 dias de fermentação. (A) Contagem de células viáveis do sobrenadante; (B) Açúcares totais; (C) Turbidez e (D) Acidez total dos hidromeis produzidos nas diferentes temperaturas.

Todas as linhagens apresentaram crescimento logarítmico nos 7 primeiros dias de fermentação. Na linhagem padrão (S) a decantação ocorreu no 35° dia na temperatura de 30 °C, nas demais temperaturas a levedura atingiu contagens imperceptíveis à técnica no 42° dia. A linhagem IM8 não decantou completamente em nenhuma das temperaturas, a JP14 apenas na temperatura de 20 °C no 42° dia e a IP9 decantou em todas as temperaturas testadas também no 42° dia.

As linhagens consumiram mais açúcares nos 7 primeiros dias da fermentação, onde o melhor resultado foi observado no hidromel da JP14 a 30 °C sem diferença entre 20 e 25 °C, comportamento similar encontrado no hidromel da IM8. As linhagens padrão (S) e IP9 mostraram comportamento semelhante, não sendo encontradas diferenças entre as

temperaturas de 20 a 30 °C. O menor consumo de açúcares para as 4 linhagens foi encontrado a 15 °C, esta foi considerada uma temperatura inadequada para fermentação dos hidroméis nas condições testadas, devido a baixa atividade metabólica das leveduras e baixa acidez no hidromel final. Entretanto dentre a levedura avaliada JP14 sobressaiu-se com melhor desempenho no consumo de açúcares podendo ser utilizada para fermentações nessas condições.

Para maioria dos vinhos a temperatura ideal é de 22-27 °C, temperatura esta que garante um bom rendimento fermentativo sem, entretanto, interferir na evaporação de etanol e compostos voláteis (PANDA, 2011). Em 2009, Gupta e Sharma descreveram técnicas aplicadas visando à obtenção de hidromel e recomendaram temperaturas que variavam entre 24-32 °C. (GUPTA; SHARMA, 2009). No presente estudo as temperaturas ótimas de fermentação foram de 20-30° C, encontrando-se dentro daquelas sugeridas pelos autores.

A temperatura de fermentação na produção de vinhos pode ser classificada da seguinte forma: temperaturas ótimas (20-25 °C), normais (25-30 °C) e temperaturas perigosas (acima de 33 °C). Abaixo de 20 °C observa-se uma fermentação lenta decorrente da redução do metabolismo celular. Acima de 33 °C podem se desenvolver bactérias capazes de degradar o etanol em ácido acético, reduzindo o rendimento e depreciando o produto final (GÓES; ZANGIROLAMI, 2005). Assim, cada uma das linhagens testadas (JP14, IM8 e IP9) tiveram a melhor atividade nas temperaturas ótimas descritas de 20-25 °C, dentre as quais, 20 °C foi ideal em relação ao crescimento, consumo de açúcar e acidez total, já que se observou um comportamento semelhante dentre as linhagens avaliados.

A temperatura de 26,6 °C iduziu a produção de vinhos considerados de baixa qualidade, por outro lado a 10 °C os vinhos apresentaram aroma frutado e fresco. As leveduras a serem utilizadas nesta temperatura devem ser previamente adaptadas garantindo assim o

alto rendimento (PANDA, 2011). A linhagem JP14 espessou potencial para adaptação a baixas temperaturas.

3.2. Características do produto final

Ao final da fermentação foram analisados os produtos em relação a turbidez, consumo de açúcares, teor alcoólico, acidez volátil, acidez fixa e acidez total, após análise estatística fatorial observou-se que com relação ao pH, turbidez e acidez volátil o comportamento das leveduras avaliadas não mostrou interação significativa com relação às diferentes temperaturas testadas.

Tabela 1: Atributos determinados no final da fermentação com interações não significativas

Fatores	Atributos analisados			
	pH	Turbidez (D.O. 560 nm)	Acidez volátil (mEq·L ⁻¹)	
Leveduras	S	3.99 b	0.187 a	6.33967 a
	IM8	4.71 a	0.111 ab	7.39833 a
	JP14	3.54 b	0.020 b	7.98000 a
	IP6	3.90 b	0.057 b	7.51450 a
	dms	0,65	0.11	3,6560
Temperaturas	15	4.22125 a	0.06408 a	7.49233 a
	20	3.86292 a	0.13842 a	8.46767 a
	25	4.03042 a	0.07238 a	7.47017 a
	30	4.02125 a	0.09946 a	5.80233 a
	dms	0.68455	0.10717	365.641

* Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). dms – diferença mínima significativa. Os dados são médias dos hidroméis produzidos pelas leveduras S, IM8, IP9 e JP14.

O hidromel produzido pela IM8 apresentou os maiores valores de pH. Com relação à turbidez, o maior valor foi associado à linhagem padrão, seguida pela IM8. Assim, as leveduras isoladas mostraram um maior poder de floculação e clarificação quando comparada ao padrão. Em relação à acidez volátil dos hidroméis produzidos por cada uma das linhagens, não houve diferenças estatísticas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

O limite de acidez volátil recomendado para hidroméis é de 20 mEq·L⁻¹ segundo o recomendado pela legislação brasileira (MAPA, 2008), entretanto pesquisas exibem valores de até 102,6 mEq·L⁻¹ (MENDES-FERREIRA et al., 2010; PANDA, 2011). Dessa forma, todas as leveduras apresentaram valores de acidez volátil abaixo do limite máximo permitido pela legislação.

Tabela 2: Atributos determinados no final da fermentação com interações significativas

Teor alcoólico (% v/v)				
linhagens	Temperaturas (°C)			
	15	20	25	30
S	1,73 ± 0,45 bB	7,53 ± 1,60 aA	6,80 ± 1,2 aA	8,00 ± 1,8 aA
IM8	1,73 ± 0,2 bB	6,57 ± 1,83 aAB	4,45 ± 1,05 aB	11,57 ± 0,64 aA
JP14	7,92 ± 1,38 aA	5,37 ± 0,40 aA	5,98 ± 1,28 aA	10,10 ± 0,2 aA
IP9	2,17 ± 1,03 bB	3,38 ± 0,58 aB	4,67 ± 2,24 aB	10,85 ± 0,75 aA
Açúcares totais (g·100g⁻¹)				
S	18,10 ± 0,70 bA	14,70 ± 0,30 aB	13,70 ± 1,10 aB	11,70 ± 0,10 aC
IM8	19,60 ± 0,00 aA	15,60 ± 0,60 aB	14,30 ± 0,10 aB	11,60 ± 0,00 aC
JP14	19,00 ± 0,00 abA	14,90 ± 0,70 aB	13,30 ± 0,70 aC	10,10 ± 0,10 bD
IP9	17,70 ± 1,10 bA	14,80 ± 0,20 aB	13,20 ± 1,10 aC	11,70 ± 0,70 aD
Acidez total (mEq·L⁻¹)				
S	35,65 ± 0,87 abB	46,47 ± 1,76 aA	47,30 ± 1,01 bA	51,17 ± 2,01 bA
IM8	22,61 ± 1,22 cC	42,52 ± 1,86 aB	55,27 ± 4,46 bA	52,81 ± 4,21 abA
JP14	22,61 ± 2,48 cC	42,52 ± 2,06 aB	55,27 ± 3,49 bA	52,81 ± 0,82 abA
IP9	44,32 ± 4,06 aB	42,59 ± 1,56 aB	53,93 ± 4,62 bA	51,25 ± 4,41 bAB
Acidez fixa (mEq·L⁻¹)				
S	28,20 ± 1,03 abB	38,67 ± 3,02 aA	43,04 ± 1,01 bA	45,32 ± 0,65 bA
IM8	20,55 ± 1,61 bcC	40,63 ± 2,32 aB	57,49 ± 2,54 aA	55,91 ± 4,52 aA
JP14	15,52 ± 3,35 cC	31,52 ± 2,46 aB	47,29 ± 4,96 abA	46,66 ± 4,86 abA
IP9	37,23 ± 4,35 aA	35,32 ± 1,28 aA	44,09 ± 4,86 bA	45,39 ± 5,39 bA

* Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05). Sendo que as letras maiúsculas devem ser comparadas por coluna, enquanto as letras minúsculas devem ser comparadas por linha. Os dados são médias seguidos pelos desvios dos hidroméis produzidos pelas leveduras S, IM8, IP9 e JP14.

Na temperatura de 15 °C, o teor alcoólico mais alto foi obtido com a linhagem JP14, que não apresentou diferença para este atributo quando as demais temperaturas foram comparadas.

Enologistas europeus consideram que altas temperaturas de fermentação influenciam diretamente na perda de etanol por evaporação, os resultados preliminares limitam esta temperatura em 32 °C, sendo que

estudos registram perdas de 0,65 % quando a fermentação ocorre a 20 °C (PANDA, 2011). Entretanto, devido ao baixo volume utilizado para fermentação neste trabalho, não foi observado efeito negativo da temperatura sobre o teor de etanol. Artigos científicos recomendam que a concentração de etanol para hidromel varie entre 8-18 % (v/v) (MENDES-FERREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2009), assim sobre estas condições apenas a temperatura de 30 °C foi capaz de propiciar um hidromel nesta faixa para todas as leveduras. No Brasil estes valores variam entre 4-14 % (v/v) (BRASIL, 2012), dentro desta concentração na temperatura de 15 °C apenas o hidromel da JP14 atingiu esta exigência. A partir de 20 °C, S e IM8 apresentaram valores de etanol satisfatórios, enquanto que a IP9 só atingiu o padrão a 25 °C.

Em pesquisa realizada com otimização de processo fermentativo de hidromel, testando diferentes temperaturas e diferentes concentrações de nutrientes observou-se que a temperatura teve maior influência sobre a produção de etanol quando comparada a suplementação, onde em mosto de aproximadamente 31 % (m/v) de açúcares, o teor alcoólico alcançado foi de 9,7-10,7 para 20 °C e 11,3-11,5 para 30 °C (GOMES et al., 2013).

Gomes et. al descreveram comportamento semelhante ao observado neste estudo onde o consumo de açúcares foi maior nas temperaturas de 25 e 30 °C, e a temperatura de 20 °C foi considerada inapropriada para um mosto com cerca de 30 % (m/v) de açúcar (GOMES et al., 2013). No presente trabalho a concentração final de açúcares apresentou-se dentro dos padrões pré-determinados pela legislação brasileira para hidromel suave ($> 0,3 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) (BRASIL, 2012).

Analisando os hidroméis produzidos pelas linhagens testadas em diferentes temperaturas, observou-se que com o hidromel produzido pela linhagem padrão (S) obteve-se o maior teor de acidez total a 20 °C, enquanto os das IM8 e JP14 tiveram teores similares de acidez total a 20

e 30 °C. Finalmente, a IP9 produziu um hidromel com os teores mais altos de acidez a 15 e 20 °C.

Pereira et al (2013) constataram um valor de acidez total de 90,86 mEq·L⁻¹ de um hidromel produzido com diversas concentrações iniciais de *S. cerevisiae* comercial a partir de um mosto a 37 % (m/v) (PEREIRA et al., 2013). Este valor está bem acima dos valores encontrados neste trabalho cujo máximo foi de 55,27 mEq·L⁻¹, o qual encontra-se dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira que determina um limite máximo de 130 mEq·L⁻¹ (BRASIL, 2012).

Resultados similares aos obtidos nas análises de acidez total foram observados com acidez fixa. Os maiores valores da temperatura de 15 °C foram encontrados no hidromel da linhagem IP9, com a qual também foram obtidos os maiores teores de acidez fixa a 20 °C, tendo o hidromel da linhagem padrão valores semelhantes nesta temperatura. Os hidroméis produzidos pelas leveduras JP14 e IM8 mantiveram-se com os teores mais baixos de acidez fixa, não diferindo de forma significativa dentre eles. Nas temperaturas de 25 e 30 °C não foi observada diferença dentre os teores de acidez fixa dos hidroméis produzidos.

Pereira et al (2013), determinaram para hidromel um valor de 83,2 mEq·L⁻¹ para acidez fixa, onde normalmente os ácidos presentes são quantificados em ácido tartárico e refere-se aos ácidos produzidos durante a fermentação que podem ser consumidos na maturação (PEREIRA et al., 2013; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Os valores encontrados no presente trabalho representaram um máximo de 55,91 mEq·L⁻¹, e a legislação brasileira exige o mínimo de 30 mEq·L⁻¹ (BRASIL, 2012), assim pode-se concluir que a temperatura de 15 °C, sobre as condições testadas não desenvolveu um hidromel com características dentro da legislação vigente, sendo inapropriada para produção de hidromel de qualidade. Nas demais temperaturas os hidroméis apresentaram características dentro dos padrões legais (BRASIL, 2012).

4. CONCLUSÕES

A temperatura de 15 °C não foi ideal para nenhuma das leveduras testadas, esta temperatura foi associada aos menores valores de acidez fixa, estando abaixo dos limites legais. Apesar disso, a levedura JP14 apresentou bom rendimento em etanol podendo ser adaptada para o desenvolvimento de fermentações a esta temperatura. Já a temperatura de 30 °C, apesar de ser a ideal para o desenvolvimento das leveduras, apresentou alto teor de acidez o que leva ao desenvolvimento de um produto de menor qualidade.

Portanto selecionou-se a temperatura de 20 °C como apropriada para produção de hidromel com as linhagens testadas por propiciar um desenvolvimento celular intermediário e semelhante a temperaturas superiores, com baixos teores de acidez total e bom rendimento de etanol.

CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DE HIDROMEL SUAVE COM LEVEDURAS SELECIONADAS DE PRODUTOS DE ABELHAS NATIVAS

RESUMO

A produção de hidromel é uma alternativa para agregar valor aos méis, mas a falta de fermentos apropriados e processos padronizados é um obstáculo à sua produção e consumo em massa. Três linhagens de leveduras, cuja temperatura apropriada de fermentação definida em outro trabalho como 20 °C, foram isoladas de mel e pólen de abelhas Iraí e Jataí e selecionadas quanto as características para produção de bebidas. Elas foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e usadas para a produção de hidromel. Para isso, as linhagens foram inoculadas em mosto de mel a 25 °Brix, o qual foi fermentado durante 35 dias a 20 °C e maturado durante 35 dias a 10 °C. Foram avaliados a produção de etanol e pelas leveduras, assim como a aceitação sensorial do produto final. O tempo ideal de maturação para o hidromel nas condições estudadas foi de 28 dias, momento no qual o teor de acidez fixa encontrava-se em 20 mEq·L⁻¹, e a concentração de aldeído acético mantinha-se abaixo do limite de detecção (100 mg·L⁻¹). A levedura JP14 gerou um produto com menor concentração de açúcares totais e maior concentração de álcool etílico, acetato de etila, álcool isobutílico e álcool isoamílico. A levedura IP9 gerou hidroméis com maior concentração de açúcar, e menor teor de aldeído acético, acetato de etila e álcool 1-propílico. Os hidroméis produzidos pela levedura IM8 apresentaram menor acidez fixa, álcool isobutílico e álcool isoamílico, e maior teor de aldeído acético e álcool 1-propílico, sendo selecionados como o de melhor aceitação. A análise sensorial não detectou diferença entre os hidroméis analisados, por isso as três leveduras isoladas de produtos das abelhas foram apropriadas para produção de hidroméis.

Palavras-chave: Fermentação, Compostos aromáticos, Aceitação

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mel, entretanto a falta de cuidado durante a colheita e armazenamento do produto pode leva-lo a perda de valor comercial (MOREIRA et al., 2010). A valorização deste produto pode ocorrer por meio da transformação do mel em produtos de maior valor agregado, como o hidromel.

O hidromel é considerado a bebida alcoólica mais antiga que se tem conhecimento (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983), sendo obtido pela fermentação de mel diluído em água potável adicionado de sais minerais. Além desta formulação básica pode-se adicionar ervas, cereais e/ou frutas, variando assim na coloração e sabores (VARGAS; GULLING, 1999; SCHWEITZER, 2001).

O processo de produção de hidromel é pouco difundido e por isso nele são aplicadas técnicas empíricas que dificultam a padronização do produto (IGLESIAS et al., 2014). Corriqueiramente são aplicadas leveduras destinadas à produção de cerveja, vinho e champanhe, mas diferentes linhagens de leveduras produzem diferentes perfis de compostos voláteis e aromáticos, ainda que pertençam a mesma espécie, e devido a isto são apontadas como uma das principais responsáveis pelas características finais desses produtos (PEREIRA et al., 2009).

Em estudos anteriores foram isoladas linhagens de leveduras em produtos das abelhas sem ferrão, as quais passaram por testes de resistência às condições geralmente encontradas em bebidas (Artigo 1). Dentre 19 leveduras, três foram selecionadas com maior resistência pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*: IM8 e IP9, leveduras de mel e pólen de abelha *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí); e JP14, levedura isolada de pólen de abelha *Tetragonisca angustula* (Jataí). Neste trabalho, estas leveduras foram aplicadas visando o aperfeiçoamento das técnicas de produção e o desenvolvimento de fermentos próprios para a produção de hidromel. Este trabalho teve como objetivo acompanhar o

processo fermentativo destas leveduras identificando as características desenvolvidas no produto final.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima

O mel utilizado como matéria-prima na produção dos hidromeis foi gentilmente cedido pelo apiário central da Universidade Federal de Viçosa e analisado quanto à umidade, teor de açúcares totais, açúcares redutores, acidez total e teor de sólidos insolúveis em água (AOAC, 2000; MILLER, 1959).

As determinações foram realizadas após três amostragens no volume total de mel, e os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguido de comparação entre médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do programa ASSISTAT 7.7 PT (SILVA, 1996).

2.2. Produção do hidromel

2.2.1. Pré-inóculo

As linhagens de leveduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos foram obtidas do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos da Universidade Federal de Viçosa (IM8, IP9 e JP14). Elas foram propagadas em 5 mL de meio YEPG [0,5% (m/v) de extrato de levedura - KASVI[®], 1% (m/v) de peptona - IMEDIA[®] e 2% (m/v) de glicose - NEON[®]] em estufa a 28 °C até atingir a contagem de 10^7 cel·mL⁻¹. A levedura comercial liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* r.f. bayanus E491 (Perdomini/Blastosel Delta[®]) recomendada para vinho branco foi propagada e utilizada como controle comparativo na produção de hidromel.

Cada pré-inóculo em YEPG foi centrifugado a 3.370 *xg* por 10 min e ressuspenso em 5 mL de mosto a 5% (m/v) de mel; 0,025% (m/v) de

ativante de fermentação B1 (Indupropil®) e 0,015% (m/v) de metabissulfito de sódio (Indupropil®). Os pré-inóculos passaram por 12 h de adaptação a 28 °C, sem agitação, e foram transferidos para erlenmeyers contendo 50 mL de mosto a 25 °Brix. O pré-inóculo foi incubado por 24 h a 28 °C com agitação de 150 rpm até atingir contagem de 10^7 cel·mL⁻¹. Fez-se uma nova propagação por 48 h até obter 1500 mL de pré-inóculo ativado, contendo 10^7 cel·mL⁻¹ para cada levedura, o qual foi utilizado para inoculação do mosto.

2.2.2. Preparo do mosto e inoculação

Com o objetivo de desenvolver um hidromel do tipo doce com uma concentração de açúcares mínima de 3 g·L⁻¹, preparou-se o mosto contendo 25 °Brix, 0,025% (m/v) de ativante de fermentação B1 e 0,015% (m/v) de metabissulfito de sódio.

O mosto foi distribuído em 12 balões de 4 L cada, os quais foram inoculados com as linhagens S (padrão), IM8, IP9 e JP14 na contagem final de 10^6 cel·mL⁻¹. Em seguida, o sistema foi homogeneizado e aos balões foram acoplados *airlocks*, permitindo a saída de gases e coleta de amostras sem, contudo, permitir a entrada de oxigênio. Os mostos inoculados foram armazenados a 20 °C (GUPTA; SHARMA, 2009; MATTIETTO et al., 2006).

2.2.3. Acompanhamento do processo fermentativo

Nos sete primeiros dias de fermentação (fermentação tumultuosa), a cada 24 h foi feita a contagem de células viáveis assim como análises do teor de açúcares, acidez titulável e turbidez. Após os sete primeiros dias, as análises foram realizadas a cada sete dias até o 35º dia, no qual foi observada a floculação das leveduras. Neste momento os líquidos foram transferidos para novos recipientes e resfriados a 10 °C para estabilização do produto, e as análises foram realizadas a cada sete dias. A partir do 49º dia foram recolhidas amostras de 50 mL dos hidromeis

contagem, consumo de açúcares, turbidez, teor alcoólico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa e teor de compostos voláteis. No 56° dia, adicionou-se clarificante bentonita (Indupropil®) na concentração de 50 g·100 L⁻¹. Finalmente, no 63° dia foi realizada nova transferência do líquido para um novo recipiente esterilizado. A fermentação foi concluída no 70° dia, as amostras foram então envasadas em frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração até análise sensorial (Tabela 1).

Tabela 1: Cronograma das etapas e acompanhamento fermentativo

Análises	Temperatura/Dias																
	Fermentação (20 °C)												Maturação (10 °C)				
	0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Início da fermentação	X																
Células viáveis (celulas·mL ⁻¹)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Turbidez (D.O 560 nm)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidez total (mEq·L ⁻¹)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Açúcares totais (°Brix)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Início da maturação												X					
Grau alcoólico real (% v/v)														X	X	X	X
Acidez fixa (mEq·L ⁻¹)														X	X	X	X
Acidez volátil (mEq·L ⁻¹)														X	X	X	X
Compostos voláteis (mg·100 L ⁻¹)														X	X	X	X
Trasfegas												X					X
Adição do clarificante															X		
pH																	X
Fim do processo																	X
Análise sensorial																	X

2.2.4 Métodos Analíticos

O teor de açúcares foi determinado com refratômetro analógico (ATC®) e a turbidez por D.O. 560 nm, comprimento de onda indicado para análise de coloração do mel, utilizando o mosto não inoculado como branco. A acidez total foi acompanhada pelo método titulométrico utilizando solução hidróxido de sódio 0,1N e os resultados indicados como mEq·L⁻¹(AOAC, 2000).

Para determinação do teor alcoólico, acidez volátil, acidez fixa e compostos voláteis, 50 mL da amostra foram destilados até a recuperação de 75% (v/v) de seu volume inicial e reconstituído com água destilada.

O teor alcoólico a 20 °C foi obtido pela conversão da densidade do líquido com auxílio de picnômetro (OIV, 2015).

A acidez volátil foi analisada na solução hidroalcoólica por titulometria utilizando 10 mL do destilado, enquanto a acidez fixa foi obtida pela diferença entre acidez total e acidez volátil, sendo todos os cálculos de acidez expressos em mEq·kg⁻¹ (OIV, 2015).

Para os compostos voláteis, a análise foi realizada segundo a metodologia descrita para vinhos pelo “Office International de la Vigne et du Vin” em cromatógrafo a gás (Shimadzu® GC-17A, modelo QP5050) com detector de ionização de chama (FID), equipado com uma coluna capilar Supelco PAG de dimensões 30 m x 0,25 mm de espessura do filme x 0,25 µm de diâmetro interno. O hélio foi utilizado como gás de arraste, o ar sintético como gás de ignição e manutenção da chama e o gás hidrogênio como fonte de combustível para chama do detector FID. As condições utilizadas foram: o Split de 2,0; Temperatura inicial de 35 °C; Temperatura do injetor de 180 °C; Temperatura do detector de 200 °C; Vazão do gás de arraste (He) de 1 mL·min⁻¹; Vazão do ar sintético de 175 mL·min⁻¹; Vazão da chama (H₂) de 20 mL·min⁻¹. Durante a corrida a temperatura inicial foi mantida por 5 minutos e depois elevada a uma taxa de 10 °C·min⁻¹ até atingir 120 °C, permanecendo nessa temperatura por 10 min. Em seguida foi novamente elevada a uma taxa de 10 °C·min⁻¹ até atingir 180 °C, permanecendo nessa temperatura por 10 min. Novamente foi elevada a uma taxa de 10 °C·min⁻¹ até atingir 200 °C (SOUZA, 2014).

Para comparação da área dos picos com a concentração dos componentes avaliados utilizou-se a técnica do padrão interno, onde uma substância ausente na amostra é injetada (padrão interno) com os demais

padrões a serem avaliados (acetato de etila, aldeído acético, álcool 1-propílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico). O padrão interno utilizado foi o 4-metil-2-pentanol ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (OIV, 2015).

As médias finais das três repetições de cada atributo foram submetidos a uma ANOVA pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com o auxílio do programa ASSISTAT 7.7 PT (SILVA, 1996). O objetivo foi avaliar se havia diferença estatística entre as leveduras para cada atributo individualmente e qual a linhagem a apresentou os valores mais expressivos.

2.3. Teste afetivo de aceitação por escala hedônica

O teste sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), nº 56275116.9.0000.5153. Assim, provadores voluntários não treinados (dentre homens e mulheres acima de 18 anos que não apresentavam nenhuma restrição quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, mel, pólen ou levedura) avaliaram quatro amostras de hidroméis. Cada amostra foi entregue individualmente e avaliada, quanto aos atributos de aroma, sabor e impressão global. A escala hedônica variou de 1 a 9, onde 1 corresponde a “desgostei extremamente” e 9 a “gostei extremamente” (Anexo 1, p 88) (MINIM, 2010).

Os dados foram submetidos a uma análise de variância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com o auxílio do programa ASSISTAT 7.7 PT (SILVA, 1996) com o objetivo de determinar qual o hidromel que apresentou maior aceitação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise físico-química da matéria-prima

Os parâmetros físico-químicos do mel são essenciais para sua comercialização, mas a produção de hidroméis pode ser realizada utilizando matérias-primas de menor valor comercial, decorrente do mal armazenamento e envelhecimento do mel.

Tabela 2: Características da matéria-prima utilizada na confecção do mosto para produção dos hidromeis

Parâmetros	*Média	Limite da legislação (CODEX STANDARD FOR HONEY, 2001)
Umidade (g·100g ⁻¹)	19±1	20 (max)
Açúcares totais (°Brix)	79±1	-
Açúcares redutores (g·100g ⁻¹)	75±1	65 (min)
Açúcares não-redutores (g·100g ⁻¹)	5±1	6 (max)
Sólidos insolúveis em água (g·100g ⁻¹)	0,1±0,03	0,1 (max)
Acidez total (mEq·kg ⁻¹)	36±2	50(max)

* Médias obtidas a partir de três repetições

O alto índice de umidade do mel pode indicar que foi colhido antes do período apropriado, aumentando a possibilidade de ocorrência de reações de fermentação ou produção de HMF possibilitando a degradação (ESCUREDO et al., 2013). Os açúcares redutores e não redutores também indicam maturidade do produto, mas podem revelar adulteração mediante adição de açúcar comercial (sacarose) (SCHLABITZ; SILVA; SOUZA, 2010). Os índices de acidez e sólidos insolúveis em água indicam se o mel foi colhido e armazenado de maneira adequada (MOREIRA et al., 2007). Para os parâmetros de açúcares, o produto apresentou valores além do limite mínimo, sendo portanto um mel de alta qualidade para produção de hidromel (GUPTA; SHARMA, 2009).

3.2. Produção do hidromel

De modo geral, todas as leveduras se comportaram de maneira semelhante conforme pode-se observar nas figuras 1 e 2.

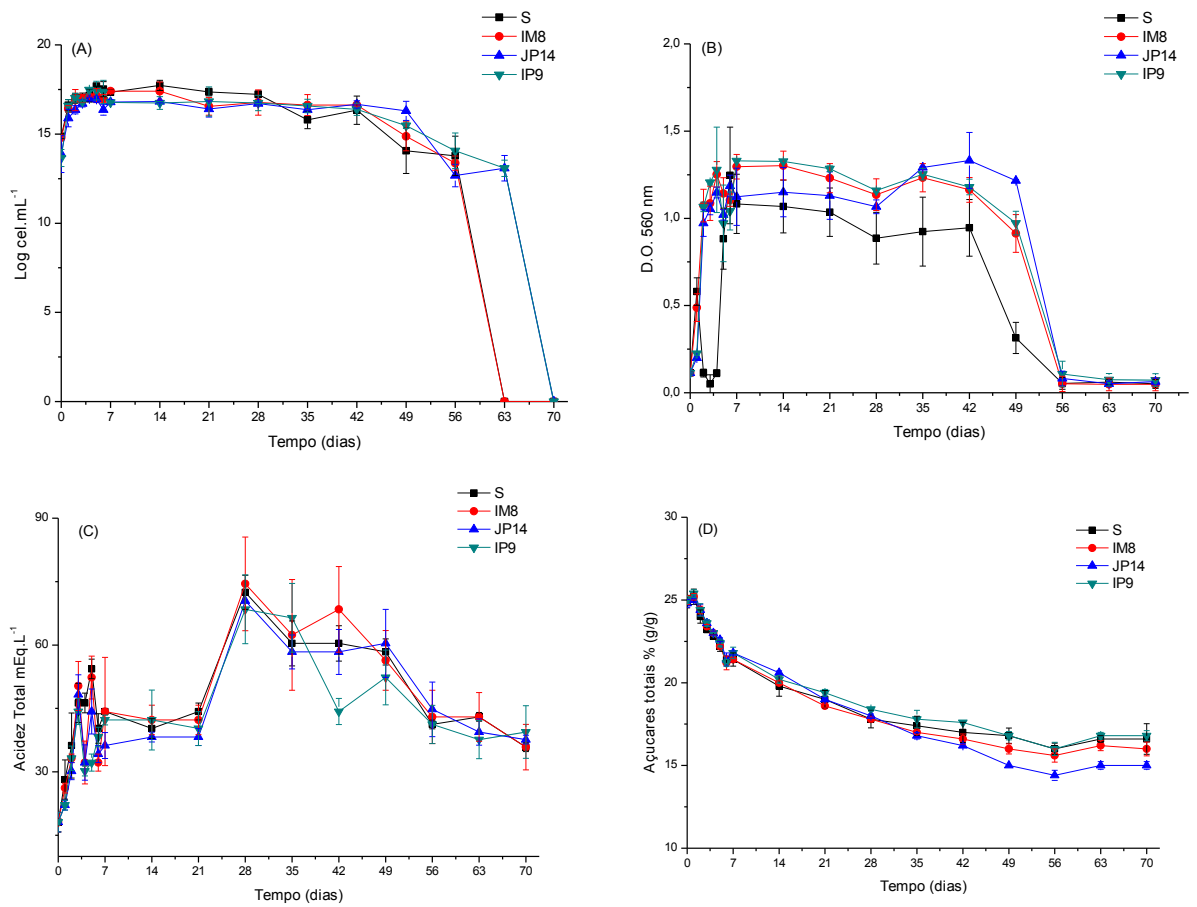


Figura 1: Comportamento do hidroméis ao longo do processo fermentativo: (A) Número de células, (B) Turbidez, (C) Acidez total, (D) Açúcares totais. As barras representam os desvios-padrão das médias dos hidroméis produzidos por S, IM8, IP9 e JP14.

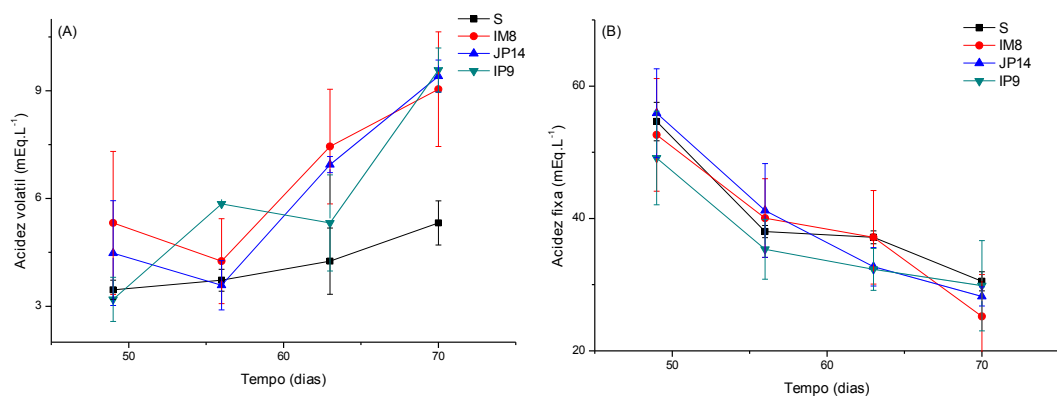


Figura 2: Comportamento dos hidroméis ao longo da maturação (A) Acidez volátil e (B) Acidez fixa dos hidroméis ao longo da maturação. As barras representam os desvios-padrão das médias dos hidroméis produzidos por S, IM8, IP9 e JP14.

Os hidroméis produzidos a partir das linhagens de levedura padrão (S) e IM8 decantaram 7 dias antes dos hidroméis fermentado com JP14 e IP9. O hidromel produzido por S mostrou-se sempre menos turvo, enquanto a maior turbidez foi associada aos hidroméis produzidos pela levedura JP14 do 35 ao 49º dia (Figura 1B). A turbidez de uma bebida está associada à capacidade de floculação das leveduras, fator importante nas etapas finais de clarificação. Entretanto é possível que uma levedura floculante exiba dificuldades de fermentação ao final do processo, devido a redução da superfície de contato com o mosto que ocorre após a decantação das células (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Os valores de acidez fixa e volátil, obtidos após a destilação das amostras, foram computados apenas após o 49º dia, tempo no qual as leveduras já haviam passado pela trasfega. A acidez volátil é calculada em ácido sulfúrico ou ácido acético, o ácido sulfúrico é produzido pelas leveduras durante a fermentação, enquanto o ácido acético é gerado ao longo do processo provavelmente devido a escassez de nutrientes ou devido a possível contaminação por bactérias acéticas (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Porém a ausência destas foi observada com os baixos teores de acidez volátil, indicando a não contaminação do processo. A baixa acidez fixa era esperada para este produto, já que não houve adição de ácidos orgânicos no processo e o mel possui menor teor de acidez quando comparado às frutas. Assim os produtos obtidos por essas matérias-primas diferem nos valores de acidez fixa, como o mostrado por CASTILHOS et al., 2013 em mosto de uvas que atingiram valores de até 110 mEq·L⁻¹(CASTILHOS et al., 2013), enquanto hidroméis alcançaram dentre 40 e 102,6 mEq·L⁻¹ (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

Tabela 3: Parâmetros químicos dos hidroméis produzidos com as linhagens de leveduras Padrão (S), IM8, JP14 e IP9.

Parâmetro avaliado	Linhagens			
	S	IM8	JP14	IP9
pH	4,44 ± 0,04 a	4,46 ± 0,02 a	4,43 ± 0,04 a	4,43 ± 0,02 a
Açúcares totais (°Brix)	16,07 ± 0,92 ab	15,87 ± 0,42 ab	14,87 ± 0,23 b	16,73 ± 0,31 a
Acidez total (mEq·L ⁻¹)	35,24 ± 1,03 a	35,84 ± 5,38 a	38,23 ± 1,03 a	35,84 ± 6,20 a
Acidez volátil (mEq·L ⁻¹)	4,97 ± 0,61 b	9,25 ± 3,15 ab	9,41 ± 0,45 a	9,93 ± 0,61 a
Acidez fixa (mEq·L ⁻¹)	30,28 ± 1,44 a	25,2 ± 1,60 b	28,82 ± 1,44 a	25,90 ± 6,09 a

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados são médias seguidas pelos desvios dos hidroméis produzidos pelas leveduras S, IM8, IP9 e JP14.

A levedura JP14 produziu os hidromeis com os menores teores de açúcares ao final da fermentação (Tabela 3), demonstrando capacidade fermentativa superior às demais nas condições submetidas. As linhagens S e IM8 tiveram comportamento semelhante com relação a este parâmetro e a IP9 mostrou o menor consumo de açúcares ao final da fermentação. Teores de açúcares superiores a 3 g·L⁻¹ caracterizam o hidromel como bebida doce segundo a legislação brasileira (MAPA, 2008). O alto teor de açúcares totais em hidroméis é associado a boas pontuações em análises sensoriais do produto com provadores não treinados (GOMES et al., 2015).

Com as linhagens IP9 e JP14 foram obtidos os hidromeis com maior acidez, e o produzido pela linhagem padrão (S) exibiu a menor acidez volátil. Estes valores demonstram a sanidade apresentada pelo produto final, como exemplo hidroméis produzidos na África do Sul apresentaram valores de 12,5 e 13,2 mEq·L⁻¹ e em hidroméis da Eslováquia foram encontrados valores de 16,5 e 24,8 mEq·L⁻¹, todos adquiridos comercialmente e considerados produtos de qualidade, e com teores acima daqueles encontrados neste trabalho (ŠMOGROVIČOVÁ et al., 2012).

Os valores apresentaram-se próximos ao pré-estabelecido pela legislação de 30 mEq·L⁻¹(MAPA, 2008) para acidez fixa. A linhagem IM8 apresentou o menor valor, já as demais leveduras não apresentaram diferença estatística. Os hidroméis da África do Sul apresentaram 91,06-93,6 mEq·L⁻¹ enquanto que os hidroméis da Eslováquia apresentaram 42,26-62,13 mEq·L⁻¹ (ŠMOGROVIČOVÁ et al., 2012), estes dados demonstram que os hidroméis produzidos neste trabalho apresentaram baixa acidez fixa, que foi degradada durante a maturação, assim, sobre as condições de fermentação acima citadas, recomenda-se que o final da maturação ocorra no 28º dia, onde o teor de acidez fixa mantém-se dentro dos padrões legais conforme observado na figura 2.

3.3. Análise de compostos voláteis no produto final

Nas quatro ultimas semanas de maturação (49-70º dia do processo) a cada 7 dias foram acompanhados a evolução do teor alcoólico e dos compostos voláteis formados e degradados. A figura 3 apresenta os valores referentes a este comportamento.

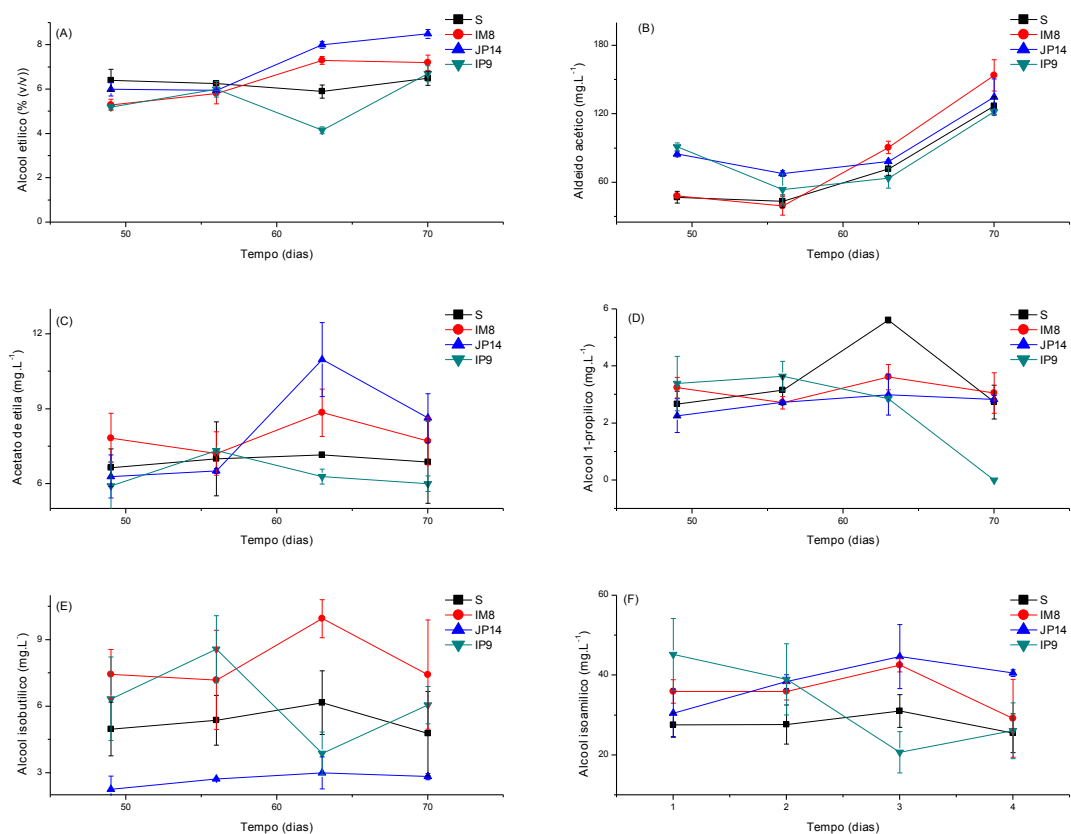


Figura 3: Teores de (A) Álcool etílico, (B) Aldeído acético, (C) Acetato de etila, (D) Álcool 1-propílico, (E) Álcool isobutílico e (F) Álcool isoamílico ao longo da maturação dos hidroméis. As barras representam os desvios-padrão das médias dos hidroméis produzidos por S, IM8, IP9 e JP14.

Nas linhagens JP14 e IM8, observou-se um aumento do etanol até o último dia de maturação, enquanto o hidromel da linhagem padrão (S) manteve-se constante, semelhante à IP9 que chegou a apresentar uma queda na concentração de etanol. O aumento do teor de etanol é um parâmetro que induz a formação de compostos voláteis importantes para maturação da bebida. A degradação e a formação de compostos voláteis estão diretamente relacionadas com a ação enzimática. Alguns autores afirmaram que ésteres e álcoois superiores são produzidos como forma de desintoxicação da célula (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010).

O hidromel da linhagem IM8, apesar de iniciar com o menor valor de aldeído acético, apresentou a maior concentração ao final da fermentação. A levedura JP14 apresentou-se como segunda na sucessão

de valores. Durante a maturação, o acetaldeído é formado mediante oxidação do álcool etílico, sendo o intermediário na conversão de etanol em ácido acético (KATO; MIWA, 2016). Em excesso seu aroma assemelha-se a frutas vermelhas estragadas, ou vegetais fermentados. A presença de antioxidantes como metabissulfito de sódio e potássio inibe sua formação (OSBORNE et al., 2000).

A linhagem S, apresentou hidroméis com valores constantes para acetato de etila, já o hidromel produzido pela levedura IP9 apresentou os menores valores, com comportamento decrescente, enquanto as leveduras JP14 e IM8 desenvolveram maiores valores para este composto.

O acetato de etila é um dos compostos mais importantes no sabor da bebida, pois em pequenas concentrações é reconhecido como fonte primária do aroma frutado. Este pode ser formado pela reação entre ácido carboxílico e álcool etílico durante a fermentação, ou pela esterificação do etanol em meio ácido (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010). O álcool etílico apresentou-se em valores mais elevados no hidromel das leveduras IM8 e JP14, por este motivo estes hidroméis apresentaram maior teor de acetato de etila e por isso aroma frutado mais intenso, seguido pela linhagem S e por último a IP9.

Também foram determinados álcoois superiores que são aqueles que apresentam mais de dois carbonos, sendo produzidos durante a fermentação em uma concentração que varia entre 150-550 mg.L⁻¹ (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Estes álcoois e seus ésteres são importantes componentes na formação do aroma característico de bebidas fermentadas como vinhos e hidroméis, quando produzidos em baixas concentrações (máx de 300 mg.L⁻¹) de álcool anidro. Em altas concentrações podem chegar a mascarar os aromas característicos da bebida (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

As leveduras IM8 e JP14 tiveram comportamento semelhante e constante com relação ao álcool 1-propílico, e ao final da fermentação não foi observada diferença entre elas e a linhagem padrão (S). Na IP9, o álcool 1-propílico reduziu no decorrer do tempo. No álcool isobutílico, o hidromel da levedura JP14 apresentou os maiores valores, estabilizando ao final dos 70 dias, esta linhagem foi seguida pela IM8, IP9 e S. O hidromel produzido pela IP6 apresentou os menores valores que decresceram no decorrer do tempo, enquanto a S, novamente, apresentou valores constantes.

Ao final da fermentação foi aplicado um teste de diferença de médias a fim de comparar os compostos voláteis apresentadas pelo produto final (Tabela 4).

Tabela 4: Compostos voláteis dos hidroméis ao final da fermentação

Parâmetros avaliados	Amostras			
	S	IM8	JP14	IP9
Álcool etílico % (v/v)	6,37 ± 0,32 b	7,00 ± 0,34 b	8,5 ± 0,2 a	6,6 ± 0,36 b
Aldeído acético (mg.L ⁻¹)	127,11 ± 7,96 ab	153,76 ± 13,77 a	134,96 ± 15,80 ab	121,95 ± 2,31 b
Acetato de etila (mg.L ⁻¹)	7,27 ± 1,65 ab	7,73 ± 0,95 ab	8,85 ± 0,98 a	5,99 ± 0,32 b
Alcool 1-propílico (mg.L ⁻¹)	2,84 ± 0,59 b	3,05 ± 0,71 a	2,85 ± 0,133 b	0,00 ± 0,00 c
Álcool isobutílico (mg.L ⁻¹)	5,58 ± 1,90 ab	3,05 ± 0,71 b	9,14 ± 1,62 a	6,01 ± 0,84 ab
Álcool isoamílico (mg.L ⁻¹)	27,74 ± 4,85 b	7,43 ± 2,47 c	40,55 ± 0,85 a	26,09 ± 6,98 b

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). Os dados são médias seguidas pelos desvios dos hidroméis produzidos pelas leveduras S, IM8, IP9 e JP14.

Conforme observado na tabela 4, todos os hidroméis obedeceram ao limite de etanol pré-determinado na legislação brasileira que varia de 4-14 % (v/v) (BRASIL, 2012), entretanto no que se refere a legislação internacional que preconiza valores de 8-18 % (v/v) (PEREIRA et al., 2009), apenas o hidromel produzido pela linhagem JP14 obedeceu ao requisito. Portanto, novamente a JP14 foi exibindo os maiores valores,

seguida pela IM8, IP9 e por último a padrão (S). Em hidroméis produzidos com aproximadamente 30 °Brix, leveduras comerciais foram capazes de produzir apenas 5,9% (v/v) de etanol (GOMES et al., 2015). Gupta & Sharma também relataram valores semelhantes aos encontrados neste trabalho variando entre 7 e 22% (v/v) de etanol (GUPTA; SHARMA, 2009). O alto percentual de açúcar encontrado no mosto foi capaz de reduzir a eficácia da levedura padrão, assim as linhagens isoladas apresentaram maior adaptação para este requisito sendo mais indicadas para produção de hidromel.

O hidromel da linhagem IM8 mostrou maior produção de aldeído acético ao final da fermentação seguida pela S e JP14, e por último a IP9. O resultado apresentado mostra que o hidromel da linhagem IM8 foi mais susceptível à oxidação, exigindo maior cuidado durante a maturação. Dentre os aldeídos formados durante a fermentação, o aldeído acético é o principal. O limite de detecção deste composto olfativa em bebidas fermentadas é de 100 mg·L⁻¹. Entretanto a legislação federal dos Estados Unidos estipula o limite máximo de 300 mg·L⁻¹ (ROLDÁN et al., 2011; SHERIDAN; ELIAS, 2015). Assim, pode-se concluir que todas as amostras encontravam-se no limite de percepção, sem no entanto ultrapassar o limite máximo aceitável. Vale ressaltar que até o 63º dia de processo, as amostras apresentavam-se abaixo deste limite. Assim um hidromel concluído neste tempo apresentaria teor de acetaldeído abaixo do perceptível, aumentando sua qualidade, já que este produto normalmente é associado a oxidação que pode ser decorrente da incorporação de oxigênio durante as trasfegas.

O acetato de etila em altas concentrações dá à bebida a característica de acidificada ou deteriorada (MORAES; LOCATELLI, 2010), enquanto em baixas concentrações traz aromas agradáveis. Acima de 160 mg·L⁻¹ ele torna-se desagradável (PEYNAUD, 1982). A percepção limite deste composto é de 0,012 mg·L⁻¹ (ROLDÁN et al., 2011). Assim todas as amostras testadas apresentaram-se dentro do limite de

percepção e abaixo do limite capaz de tornar a bebida desagradável. Sendo que o maior valor foi associado ao hidromel da levedura JP14, seguida pela IM8 e S, e por último IP9.

A levedura IM8 exibiu maior concentração de álcool 1-propílico, enquanto o hidromel referente à JP14 e S não apresentaram diferença estatística. O hidromel da levedura IP9 não apresentou pico de concentração, aparentemente este composto foi consumido no decorrer da maturação. Em vinhos, o álcool 1-propílico está associado a sanidade, uma vez que pode ser produzido por bactérias, proferindo aroma de frutos estragados (DIRNINGER; SCHAEFFER, 1990; PEINADO et al., 2004). Entretanto o seu valor limite detectável é de $306 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (PEINADO et al., 2004). Logo, a concentração encontrada nos hidroméis não foi suficiente para causar efeitos, sejam eles agradáveis ou desagradáveis.

Em vinhos, é possível encontrar valores entre $9,0$ e $148,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de álcool isobutílico (CABANIS; CABANIS, 2000). Os valores encontrados em hidromel foram inferiores ao limite máximo, e a levedura JP14 foi a única que exibiu valores dentro do limite de detecção, seguida pelas IP9 e S, e por último a IM8, assim é possível projetar que o sabor frutado decorrente deste composto foi perceptível apenas no hidromel proveniente da levedura JP14.

O limite de detecção olfativa para o álcool isoamílico é de $0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ROLDÁN et al., 2011). Em vinhos a concentração máxima aceitável é de $490 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, dando ao produto sabor picante (CABANIS; CABANIS, 2000). Para este composto, novamente, a JP14 exibiu os maiores valores, seguido pela S e IP9 e por último IM8. Assim, a levedura JP14 apresentou sabor mais picante.

Mediante aos compostos voláteis analisados, pode-se concluir que o hidromel produzido pela linhagem JP14 mostrou maior teor alcoólico com sabor ácido, frutado e picante. A linhagem IM8 foi a segunda na produção de álcool etílico sabor frutado e ácido.

A linhagem padrão (S) apresentou hidromel de baixo teor alcoólico, menos frutado que os anteriores, sabor ácido e menos picante, e o hidromel da linhagem IP9 teve o teor alcoólico mais baixo dentre as estudadas com sabor levemente frutado, ácido e menos picante, bem semelhante a linhagem padrão (S).

3.4. Análise sensorial dos hidroméis

Após os 70 dias, com o produto maturado e pronto para consumo foi aplicada uma análise sensorial de aceitação.

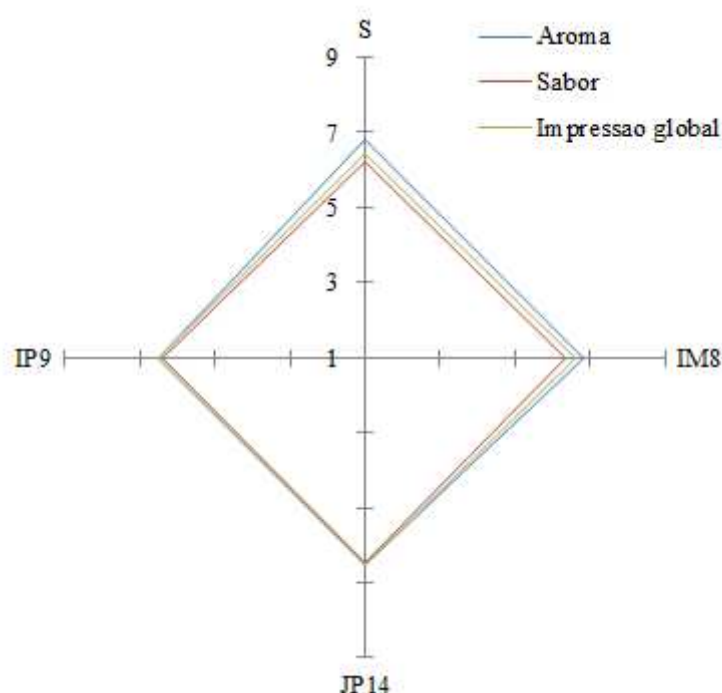


Figura 4: Análise sensorial de aceitação quando ao sabor, aroma e impressão global de hidroméis produzidos com linhagens de leveduras padrão (S), IM8, JP14 e IP9

Apesar de ser um produto pouco conhecido, os hidroméis apresentaram pontuação considerada satisfatória para todos os quesitos (médias entre 6,40-6,83 = Gostei ligeiramente – Gostei moderadamente). A análise estatística comparativa não revelou diferença significativa para os atributos testados nos hidroméis (Tabela 5). É possível que o teor de açúcar ali presente tenha mascarado diferenças marcantes.

Tabela 5: Análise sensorial comparativa entre os hidroméis produzidos

Amostra	Atributos		
	Aroma	Sabor	Impressao global
S	6,83 ± 1,34 a	6,24 ± 1,96 a	6,43 ± 1,65 a
IM8	6,81 ± 1,49 a	6,36 ± 1,74 a	6,60 ± 1,55 a
JP14	6,50 ± 1,54 a	6,45 ± 1,92 a	6,54 ± 1,62 a
IP9	6,51 ± 1,38 a	6,40 ± 1,86 a	6,52 ± 1,53 a

Resultados são médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O teor alcoólico não foi limitante para a aprovação das bebidas, pois a levedura JP14 que possuía maior conteúdo de etanol apresentou pontuação semelhante às demais. Em estudo com o objetivo de determinar a influência do teor alcoólico e do conteúdo de açúcares na aceitabilidade de hidroméis. Gomes et al. (2015) constataram que o teor alcoólico não foi limitante na pontuação entre os hidroméis analisados, porém hidroméis doces tiveram maior aceitação que os secos. Nesse estudo a maior nota dada foi de 5,4 para hidroméis suaves, no atributo impressão global impressão global. A escala utilizada apresentava variação de 0 (desgostei extremamente) – 10 (gostei extremamente) (GOMES et al., 2015).

Assim pode-se concluir que as três linhagem podem ser aplicadas na produção de hidromel tipo doce sem diferença na aceitação do público em geral. O teor de açúcares pode ter mascarado o aroma e sabor característico de cada hidromel, assim para um resultado mais preciso recomenda-se o preparo de hidromel tipo seco e análise sensorial com provadores treinados já que as características analisadas neste trabalho evidenciam a diferença existente em cada hidromel produzido.

4. CONCLUSÕES

A linhagem de levedura IM8 desenvolveu um hidromel com maior acidez fixa, aldeído acético e álcool 1-propílico. A linhagem padrão (S) destacou-se apenas com relação a acidez fixa. A linhagem JP14 apresentou os melhores resultados quanto ao teor alcoólico, acetato de

etílica, álcool isobutílico e álcool isoamílico, associada também a menor concentração de açúcares. E por último a linhagem IP6 desenvolveu um hidromel com maior concentração de açúcares totais, acidez volátil e aldeído acético. Apesar das diferenças encontradas, nenhum hidromel apresentou maior pontuação na análise sensorial quanto aos atributos de aroma, sabor e impressão global. O tempo ideal de maturação para o hidromel sob as condições estudadas seria 28 dias.

As linhagens selecionadas, apesar de pertencerem à mesma espécie, apresentaram comportamentos fermentativos diferentes, comprovando que a fonte de isolamento tem influência direta sobre as leveduras isoladas.

Ao final foi possível produzir hidroméis de boa aceitação (gostei moderadamente) com as linhagens de leveduras selecionadas, recomenda-se o preparo e avaliação de hidromel tipo seco para análises futuras.

ANEXOS

Anexo 1: Ficha disponibilizadas aos provadores para análise sensorial das amostras por meio de teste afetivo de aceitação por escala hedônica

Nome: _____	
Sexo: M() F()	Idade: _____ anos
Por favor, anote o código da amostra, prove-a e indique o quanto você gostou ou desgostou de cada atributo. Anote no espaço em branco o número referente à resposta que melhor reflita seu julgamento.	
Código da amostra: _____	
9 – Gostei extramente	Aroma: _____
8 – Gostei muito	Sabor: _____
7 – Gostei moderadamente	Impressão global: _____
6 – Gostei ligeiramente	
5 – Indiferente	
4 – Desgostei ligeiramente	
3 – Desgostei moderadamente	
2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	
Comentários: _____	

CONCLUSÕES GERAIS

O hidromel e sua produção é dependente de fatores como suplementação do mosto, conservação durante e após a fermentação, bem como disponibilização de cepas com características específicas passíveis de serem utilizadas para padronizar o produto final. Neste trabalho foram isoladas linhagens de leveduras de produtos apícolas para produção de hidromel. As fontes apícolas foram consideradas boas para obtenção de microrganismos, em especial as provenientes de abelhas sem ferrão. Das 19 linhagens obtidos as linhagens com maior resistência às condições de estresse impostas pertenciam à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estas apresetaram maior rendimento de etanol quando comparadas à levedura padrão comercial em diferentes valores de pH e temperaturas, sendo ideais para produção de bebidas alcoólicas.

A temperatura de 15 °C foi inapropriada por gerar hidroméis com acidez fixa abaixo dos limites legais, entretanto a linhagem JP14 apresentou maior resistência ao meio e por isso pode ser adaptada. A temperatura de 20 °C foi recomendada por ser comum às 4 linhagens, apresentando o hidromel de maior qualidade.

A produção de hidromel utilizando as linhagens selecionadas gerou um perfil de compostos aromáticos diversificado, em que a linhagem IP6 (pólen de Iraí) produziu um hidromel doce de sabor pouco acentuado, enquanto que a JP14 (pólen de Jataí) apresentou aromas e sabores fortes, e a IM8 (mel de Iraí) produziu um hidromel mais complexo e aromático.

Assim, as linhagens selecionadas pertencentes a mesma espécie do padrão (*Saccharomyces cerevisiae*) produziram o hidromel com maior rendimento em etanol. Estas leveduras são indicadas para produção de hidromel a uma temperatura de 20 °C durante 35 dias de fermentação e 28 dias de maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOGBO, F. K. et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333–2336, 2006.
- AKSU, Z.; TUĞBA EREN, A. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985–2991, 2005.
- ANDRADE, E. H. P. et al. Microbiological and physical-chemical characteristics of fermented milk beverages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1735–1742, 2015.
- ANGIOLLETO, E. **Isolamento e caracterização de leveduras para produção de sidra**. Santa Catarina, RS, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/107146>>
- ANVISA, A. N. DE V. S. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 41, DE 26 DE JULHO DE 2012** Brasil, 2012.
- ANVISA, A. N. DE V. S. **RDC Nº 5, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2013. Aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos permitidos para a subcategoria 16.1.1 Bebidas alcoólicas (Exceto as fermentadas)** Brasil, 2013.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, p. Method ce 2–66, 2000.
- AQUARONE, E. . et al. **Biotecnologia na produção de alimentos. Vol 4**. São Paulo: Blücher, 2001.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1983.
- ARROYO-LÓPEZ, F. et al. Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. **Yeast**, v. 27, n. 12, p. 1005–1015, 2010.
- AYALA, R.; GONZALEZ, V. H.; ENGEL, M. S. Mexican stingless bees (Himenoptera: Apidae): Diversity, distribution and indigenus knowledge. In: **Pot-honey: A legacy of stingless bees**. 1. ed. New York, USA: Springer, 2013. p. 135–152.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. **Yeast**, v. 20, n. 6, p. 509–543, 2003.
- BAYON, J. **Mead of the Celts: A celestial liquor**. ArMen, 1997.

BEGUM, S. B. et al. Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 743–750, 2015.

BELLOCH, C. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International journal of food microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 188–95, 2008.

BERTELLO, J. P. Hidromiel: De la miel, el vino. **Revista Inter-Forum. Edição electronica**, 2001.

BEUCHAT, L. R. Synergistic Effects of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate on Thermal Inactivation of Yeasts. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 3, p. 771–777, 1981.

BOGDANOV, S. **First World Conference on Organic Beekeeping Program and Abstracts Apimondia Apimondia. Anais...2010**

BRASIL. **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009**. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>

BRASIL. Instrução Normativa Nº 34, De 29 De Novembro De 2012. **Diário Oficial da União**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012.

BUBA, F.; GIDADO, A.; SHUGABA, A. Analysis of Biochemical Composition of Honey Samples from North-East Nigeria. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2012.

BUENO-COSTA, F. M. et al. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 333–340, 2016.

CABANIS, J. C. .; CABANIS, M. T. Tablas de composición. In: FLANZY, C. (Ed.). . **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 1. ed. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa, 2000. p. 783.

CARRETO, L. et al. Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. **BMC genomics**, v. 9, p. 524, 2008.

CARVALHEIRA, J. **Curso Intensivo de Conservação, Estabilização e Engarrafamento de Vinhos - Colagem dos vinhos** Bairrada - Portugal Estação Vitivinícola da Bairrada, , 2014.

CARVALHO, C. M. et al. Identification of honey yeast species based on rflp analysis of the its region. **Cienc. Tecnol. Aliment**, v. 5, n. 1, p. 11–17,

2005.

CASA DO HIDROMEL. **Relação dos “Mead Makers” pelo Brasil.** Disponível em: <<http://www.casadohidromel.com.br/lista-de-mead-makers.html>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

CASTANHA, R. F. et al. **Produção de lipídeos em culturas de leveduras utilizando resíduo de laticínios** 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...**Foz do Iguaçu - PR: 2011

CASTILHOS, M. B. M. DE et al. Influence of two different vinification procedures on the physicochemical and sensory properties of Brazilian non-*Vitis vinifera* red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 360–366, 2013.

CAVRAR, S.; YILDIZ, O.; ŞAHİN, H. Comparison of Physical and Biochemical Characteristics of Different Quality Of Turkish Honey. **Uludag Bee Journal**, v. 13, n. 2, p. 55–62, 2013.

CHOUHDARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2016.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical Profiles of Stingless Bee (*Apidae: Meliponini*) Honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2015.

CODEX STANDARD FOR HONEY. **Codex standard 12, revised Codex Standard for Honey Standards and Standard Methods** USA, 2001.

CUBA, G. **Setor Apícola Brasileiro em Números ABEMEL: Associação Brasileira dos Exportadores de Mel..** Disponível em: <http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_junho_2015.pdf>.

DA COSTA LEITE, J. M. et al. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 93–98, 2000.

DA SILVA, R. O.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 161–169, 2013.

DANIEL, H. M. et al. *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART10, p. 3896–3903, 2013.

DE ARRUDA, V. A. S. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, 2013.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.

DIRNINGER, N. .; SCHAEFFER, A. Évolution des alcools supérieurs et du méthanol dans les eaux-de-vie de fruits produits dans le Nord-Est de la France. **Cahier Scientifique**, v. 126, p. 7–15, 1990.

DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M. R.; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, 2010.

ENATIS. **Metabissulfito de potássio: Agentes Sulfactantes**. Italy, 2006.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 851–856, 2013.

EUROPEIA, U. Regulamento (CE) N 606/2009 de 10 de Julho de 2009 que estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições aplicáveis. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. L193/1, n. 6, p. 1–59, 2009.

FAEB. **O Brasil produz 45 mil toneladas de mel por ano e ocupa o oitavo lugar no ranking mundial de exportadores do produto**. Disponível em: <http://www.faeb.org.br/index.php?id=121&tx_ttnews%5Btt_news%5D=10718&cHash=26c1310c6bf556a38367a3bbdc9a8fc9>. Acesso em: 16 set. 2016.

GARLET, T. B. et al. **Hidromel Em Escala Industrial: Proposta De Processo Produtivo**. p. 1–11, 2015.

GEROYIANNAKI, M. et al. Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.). **Food Control**, v. 18, n. 8, p. 988–995, 2007.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. **Apidologie**, v. 10, p. 43–53, 1979.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microfora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters** v. 155, n.

1997, 2000.

GILLIAM, M.; PREST, D. B.; LORENZ, B. J. Original article Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds *. **Apidologie, Springer Verlag**, v. 20, p. 53–68, 1989.

GÓES, F. J.; ZANGIROLAMI, T. C. Otimização das Condições de Fermentação para a Produção de Vinho Proveniente da Uva Variedade “ Itália ”. **Brazilian Journal of food technology**, v. 5, p. 14–23, 2005.

GOMES, T. et al. Optimization of mead production using Response Surface Methodology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 680–686, 2013.

GOMES, T. et al. Influence of Sweetness and Ethanol Content on Mead Acceptability. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 137–142, 2015.

GUIMARÃES, D. P. **Avaliação de estresse e do potencial fermentativo de isolados de Saccharomyces na microvinificação da jabuticaba** Lavras, 2006.

GUIMARÃES, T. M. et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 2006.

GUPTA, J. K.; SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. **Natural Product Radiance**, v. 8, p. 345–355, 2009.

HERBERT, J.; HERBERT, J. Mead is the fastest growing segment of the US alcohol industry. **Mead News**, p. 28–31, 2014.

HINZE, H.; HOLZER, H. Effect of sulfite or nitrite on the ATP content and the carbohydrate metabolism in yeast. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 181, n. 2, p. 87–91, 1985.

IGLESIAS, A. et al. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12577–12590, 2014.

IKEDA, R.; MAEDA, T. Structural studies of the capsular polysaccharide of a non-neoformans *Cryptococcus* species identified as *C. laurentii*, which was reclassified as *Cryptococcus flavescens*, from a patient with AIDS. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 3, p. 503–509, 2004.

JAIBOON, K. et al. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in

Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. **Mycological Progress**, v. 15, n. 7, p. 755–770, 2016.

KATO, S.; MIWA, N. The hydrogen-storing microporous silica “*Microcluster*” reduces acetaldehyde contained in a distilled spirit. **Materials Science and Engineering**, v. 69, p. 117–121, 2016.

KEMPKA, A. P.; MANTOVANI, G. Z. Produção De Hidromel Utilizando Méis De Diferentes Qualidades. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 273–281, 2013.

KETTMANN, 'MATT. **America’s Mead Renaissance The ancient honey wine is back—in a big way.** Disponível em: <<http://www.winemag.com/listicle/americas-mead-renaissance/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803–807, 2011.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: ELSEVIER, B. . (Ed.). . **The Yeasts, taxonomic study**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, B.V, 2011a. v. 1p. 87–110.

KURTZMAN, C. P. et al. **The Yeasts, a Taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, B.V, 2011b. v. 1

L’ENFANT, M. et al. Substrate specificity of plant and fungi pectin methylesterases: Identification of novel inhibitors of PME. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 681–691, 2015.

LEWIS, J. A. et al. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. **Genetics**, v. 186, n. 4, p. 1197–1205, 2010.

LI, M. et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101–107, 2010.

LI, R. et al. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 151–156, 2011.

LIU, T. et al. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for

improved ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 72, 2012.

LIVRE, M. **Mercado livre: Hidromel**. Disponível em: <http://lista.mercadolivre.com.br/vinhos/hidromel_OrderId_PRICE>. Acesso em: 11 set. 2016.

LUIZ, M. T. et al. Physicochemical and microbiological aspects of honey produced in minas gerais state , brazil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 5, n. 1, p. 12–20, 2015.

MALFEITO-FERREIRA, M. WINES | Wine Spoilage Yeasts and Bacteria. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M.-L. (Eds.). . **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. 2. ed. New York, USA: Elsevier Ltd, 2014. p. 805–810.

MAPA, M. D. A. E. D. A. **REGULAMENTO TÉCNICO PARA A FIXAÇÃO DOS PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA HIDROMEL** Diário Oficial da União de 24/04/2008 Brasil, 2008.

MAPA, M. DA A. **Relação de estabelecimentos registrados**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro_de_produtos>. Acesso em: 8 set. 2016.

MATTIETTO, R. A. et al. Tecnologia para Obtenção Artesanal de Hidromel do Tipo Doce. **Comunicado técnico 170. EMBRAPA, Belém**, p. 1–5, 2006.

MCGOVERN, P. E. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 51, p. 17593–8, 2004.

MENDES-FERREIRA et al. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 193–198, 15 nov. 2010.

MEYER, T.; ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerek gen . nov .* and *Starmerella bombicola sp . nov .*, the teleomorph of *Candida bornbicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 48, p. 1413–1417, 1998.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos Com Consumidores**. 2. ed.

Viçosa, MG: UFV, 2010.

MONIKA, B. O. et al. 4 . Palynological analysis of Brazilian stingless bee pot-honey Scientific investigation of meliponine honey quality provides detailed information on where the bees go for food and also as pollinator agents . **Palynological analysis of 22 stingless bee hon.** p. 1–8, 2013.

MORAES, V. .; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, Joaçaba, v. 10, n. 1-2, p. 57–68, 2010.

MORAIS, P. B. et al. **Leveduras em flores de *Tabebuia aurea* e seus polinizadores em um transecto de paisagens de Cerrado do Tocantins** 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...**Natal-RN: 2013

MORAIS, P.; CALAÇA, P. S.; ROSA, C. Microorganisms Associated with Stingless Bees. In: VIT, P.; SILVIA, R. M. .; ROUBIK, P. D. (Eds.). . **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. 1. ed. Australia: Springer, 2013. p. 173–186.

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

MOREIRA, R. F. A. et al. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1236–1241, 2007.

MOREIRA, R. F. A. et al. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 697–704, ago. 2010.

NAVRÁTIL, M.; ŠTURDÍK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 12, p. 977–982, 2001.

NIKOLAOU, E. et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. **Food Microbiology**, v. 23, p. 205–211, 2006.

NOGUEIRA, A. et al. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 289–298, 2003.

OIV, O. I. DE LA V. ET DU V. Méthodes d'analyse: Analyses physiques. In: **Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des**

moûts. 2. ed. Paris, France: [s.n.].

OSBORNE, J. P. et al. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, n. 1, p. 51–55, 2000.

PANDA, H. **The Complete Book on Wine Production**. Índia: NIIR PROJECT CONSULTANCY SERVICES, 2011.

PANDO BEDRIÑANA, R.; QUEROL SIMÓN, A.; SUÁREZ VALLES, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 503–508, 2010.

PANG, Z. et al. High selective delignification using oxidative ionic liquid pretreatment at mild conditions for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 96–101, 2016.

PEINADO, R. A. et al. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. **Food Chemistry**, v. 84, p. 585–590, 2004.

PEREIRA, A. P. et al. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food microbiology**, v. 33, n. 1, p. 114–23, fev. 2013.

PEREIRA, A. P. et al. **Impact of inoculum size on mead aroma compounds formation by wine strains of *S. cerevisiae*** CEB - Resumos em Livros de Atas / Abstracts in Proceedings. **Anais...Bragança: 11º Encontro de Química dos Alimentos**, 2012

PEREIRA, A. P. et al. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2057–2063, ago. 2009.

PEREIRA, A. P. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 21–30, 2014.

PEREIRA, A. P. et al. Mead production: Effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 122–128, 2015.

PEREIRA, A. P. R. **Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel**. Instituto Politécnico, 2008.

PEYNAUD, E. **Conhecer e trabalhar o vinho**. Lisboa: LTC-Editora Portuguesa de Livros Técnicos e Científicos, Lda, 1982.

PIATZ, S. **The complete guide to making mead**. 1. ed. USA: Voyageur Press, 2014. v. 1

QURESHI, N.; TAMHANE, D. V. Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 280–281, 1985.

REID, V. J. et al. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 6838–6849, 2012.

RIBEREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications: Second Edition**. 2. ed. England: John Wiley & Sons, LTDA, 2006. v. 1

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. p. 52, 1994.

ROLDÁN, A. et al. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 126, p. 574–582, 2011.

ROSA, C. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, dez. 2003.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Lundiana**, v. 6, n. SUPPL., p. 27–29, 2005.

SCANES, K. T.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 19, n. 1, p. 17–24, 1998.

SCHIMZ, K.-L.; HOLZER, H. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. **Archives of Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 225–229, 1979.

SCHLABITZ, C.; SILVA, S. A. F.; SOUZA, C. F. V. Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos em mel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, p. 80–90, 2010.

SCHRAMM, K. The complete meadmaker: home production of honey wine from your first batch to award-winning fruit and herb variations. **United States: Brewers publications.**, p. 212, 2003.

SCHWEITZER, M. P. Qualidade do mel. **Revista Abeille de France**, 2001.

SCMIDELL, W. (COORD). et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

SHERIDAN, M. K.; ELIAS, R. J. Exogenous acetaldehyde as a tool for modulating wine color and astringency during fermentation. **Food Chemistry**, v. 177, p. 17–22, 2015.

SILVA, F. A. S. **ASSISTAT 7.7 PT** Campina Grande, PBUFCG - Universidade Federal de Campina Grande, , 1996. Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html>>

ŠMOGROVIČOVÁ, D. et al. Analytical and aroma profiles of Slovak and South African meads. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, n. 3, p. 241–246, 2012.

SOFIA, D.; JOSHI, Y. A.; POLETTO, M. **Kinetics of bioethanol production from lactose converted by kluyveromyces marxianus** Chemical Engineering Transactions. **Anais...2013**

SOUZA, M. I. L. DE. **Caracterização físico-química de vinhos de uvas viníferas e uvas americanas e avaliação do processo oxidativo por ozonização**. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

SOUZA, R. L. Cachaça, vinho, cerveja: da Colônia ao século XX. **Revista de Estudos Históricos**, v. 33, n. 33, p. 22, 2004.

SROKA, P.; TUSZYŃSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1250–1257, 2007.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**. 2010, p. 13–24.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 1–16, 2010.

SURUSSAWADEE, J. et al. *Papiliotrema siamense f.a., sp. nov.*, a yeast species isolated from plant leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2014, p. 3058–3062, 2014.

TANIMURA, A. et al. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p.

27, 2012.

TAPSOBA, F. et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from *Borassus akeassii* palm wines from Burkina Faso in comparison to other African beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 128–133, 2015.

TEIXEIRA, A. C. P. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 339–343, 1 jan. 2003.

TORRE-GONZÁLEZA, F. J. D. LA et al. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* yeasts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, n. April 2016, p. 1–7, 2016.

UKPABI, U. J. Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 6, p. 37–41, 2006.

VAN DER AA KÜHLE, A. et al. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. **Yeast (Chichester, England)**, v. 18, n. 11, p. 1069–79, 2001.

VARGAS, P.; GULLING, R. Making Wild Wines and Meads: 125 unusual recipes using herbs, fruits, flowers and more. **United States, Storey Publishing**, 1999.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 5-15, 2006.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: Wiley, 1998.

WALKER, G. M.; DUNDEE, A. Yeasts. **Fungi: Biology and Applications**, p. 1174–1187, 2009.

WINTERSTEEN, C. L.; ANDRAE, L. M.; ENGESETH, N. J. Effect of Heat Treatment on Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Mead. **JFS C: Food Chemistry and Toxicology Effect**, v. 70, n. 2, p. 119–126, 2005.

YURKOV, A. et al. Multigene Assessment of the Species Boundaries and Sexual Status of the Basidiomycetous Yeasts *Cryptococcus flavescens* and *C. terrestris* (*Tremellales*). **PLOS One**, v. 10, n. 3, 2015.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice **The Scientific World Journal**, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1: FINANCIAMENTOS E ATIVIDADES ACADÊMICAS ADICIONAIS VINCULADAS À TESE.

1. Projeto financiado pelo Programa FUNARBE de Apoio à Pesquisa para Jovens Docentes Pesquisadores (FUNARPEQ).
 - Projeto: Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel.
 - Período: 2015 a 2016
 - Convênio: 10613.

2. Bolsa de Iniciação científica fomentada pelo FUNARBIC/FUNARBE – Programa de Apoio a Iniciação Científica.
 - Título do projeto: Isolamento e seleção de leveduras provenientes de fontes apícolas para produção de bebidas.
 - Período de execução: 03/2015 a 03/2016.
 - Objetivo: Isolar e caracterizar leveduras para produção de hidromel..
 - Aluno: Pedro Lanna Xavier
 - Curso: Engenharia de alimentos

3. Bolsa de Iniciação científica fomentada pelo PROBIC/FAPEMIG – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.
 - Título do projeto: Isolamento e caracterização de leveduras para produção de hidroméis.
 - Período de execução: 03/2015 a 03/2016.
 - Objetivo: Isolar e caracterizar leveduras para produção de hidromel..
 - Aluno: Luciana Marina Arruda
 - Curso: Engenharia de alimentos

4. Bolsa de Iniciação científica fomentada pelo PROBIC/FAPEMIG – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.

- Título do projeto: Isolamento e caracterização de leveduras para produção de hidroméis.
- Período de execução: 03/2016 a 03/2017.
- Objetivo: Isolar e caracterizar leveduras para produção de hidromel..
- Bolsista: Luciana Marina Arruda
- Curso: Engenharia de alimentos

5. Trabalho de Conclusão de Curso pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

- Título do projeto: Liofilização e congelamento como métodos de conservação de leveduras selecionadas para produção de hidromel.
- Período de execução: 01/2016 a 06/2016.
- Objetivo: Avaliar a viabilidade de células de levedura submetidas aos tratamentos de liofilização e congelamento
- Aluno: Arthur Ferreira dos Santos Delgado
- Curso: Bacharelado em Bioquímica.

ANEXO 2: RESUMOS SIMPLES APRESENTADOS NO SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA (SIA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA EM 2016.

RESUMO 1: ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE FONTES APÍCOLAS E SELEÇÃO VISANDO A PRODUÇÃO DE HIDROMEL

AUTORES: XAVIER, P..L; ELLER, M..R.; SILVA, M..S; ARRUDA, L.M.; RAMIREZ, M.X.D; SANTANA, W.C.

Para o desenvolvimento de bebidas fermentadas de alta qualidade faz-se necessária a obtenção de leveduras apropriadas, com características como tolerância a etanol, açúcar e sulfito, atividade fermentativa nas condições de fermentação, produção de glicerol, entre outros. Este trabalho teve como objetivo isolar leveduras de fontes apícolas e selecioná-las com base em suas características para produção de hidromel. Vinte linhagens fenotipicamente distintos foram obtidos, sendo dez de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) (JM), quatro de seu pólen (JP), uma de mel de abelha Iraí (*Tetragonisca angustula*) (IM), quatro de seu pólen (IP) e uma de mel de abelha com ferrão (*Apis melífera*) (M). Após o isolamento, foi feita a caracterização morfológica das colônias e células, assim como calculada a cinética de crescimento de cada isolado. As linhagens foram então submetidos a condições mínimas de estresse em processos fermentativos para produção de bebidas etanólicas (4% (v/v) de etanol e 20% (m/v) de glicose). As seis linhagens mais resistentes foram caracterizados quanto à osmotolerância em meios contendo 10, 20, 30, 40 e 50% m/v de glicose; tolerância ao etanol em meios a 5, 10, 15 e 20% (v/v); e tolerância ao sulfito em meios contendo 100, 250 e 500 mg.L⁻¹ de metabissulfito de sódio. As três leveduras selecionadas foram submetidas a um teste de capacidade fermentativa em diferentes fontes de carbono (sacarose, frutose, lactose, galactose, manose e xilose) a 5% m/v, em diferentes valores de pH (2,5; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0 e 9,5) e de temperatura (10, 15, 25 e 30 °C). As concentrações de glicose, etanol, ácido acético e glicerol presentes ao

final da fermentação foram calculadas após as amostras serem submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. Três leveduras (JP14, IM8 e IP6) apresentaram aptidão e resistência para o processo de fermentação na produção de bebidas. Elas possuem resistência a etanol e altas concentrações de açúcar. Constatou-se que o isolado IM8 possui desenvolvimento satisfatório em meios com valores de pH abrangentes variando de 4,0 a 9,0 em temperaturas de 10 a 20 °C. IP6 em valores de pH entre 4,0 e 7,0 e temperaturas de 10 a 30 °C sem diferença significativa no seu desenvolvimento. Já JP14 apresenta crescimento em condições menos abrangentes, com pH de 7,0 a 9,0 e em temperaturas variando de 10 a 25 °C. As linhagens são capazes de fermentar o mosto com rendimento satisfatório em etanol sob variadas condições de processo, o que abre perspectivas para a possibilidade de seu uso na produção de hidromel e outras bebidas.

RESUMO 2: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM PRODUTOS APÍCOLAS.

AUTORES: ARRUDA, L.M.; ELLER, M..R.; SILVA, M..S.; XAVIER, P..L.; RAMIREZ, M.X.D.; MEDEIROS, LUANDA.

O processo de produção de hidromel é pouco conhecido e, devido à baixa oferta de linhagens de leveduras específicas, na sua produção são aplicadas as técnicas e linhagens destinadas à produção de vinho. O desenvolvimento de fermentos específicos é essencial à padronização deste produto. Para isso foram isoladas leveduras a partir de mel e pólen de abelhas sem ferrão Jataí (*Tetragonisca angustula*) e Iraí (*Nannotrigona testaceicornis*), sendo selecionados 18 linhagens com características morfológicas distintas entre si. As linhagens foram cultivados e recuperados do meio por centrifugação para realizar a extração do DNA. As células foram lisadas utilizando proteínase K a

50,0 mg.L⁻¹ a 37 °C por 1 h, seguida pelo acréscimo de beta-mercaptoetanol a 0,617 g.L⁻¹. A enzima foi inativada e o material centrifugado. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado com isopropanol e ressuspendido em água. As amostras de DNA foram utilizadas como moldes para uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para a espécie *S. cerevisiae* (SC1 e SC2). A PCR foi padronizada utilizando diferentes temperaturas de anelamento: 42, 44, 45, 46, 47, 49, 50 e 51 °C até que a condição ideal fosse determinada. A programação final de amplificação foi 92 °C para desnaturação, 47 °C para anelamento e 72 °C para extensão, por 30 ciclos. O material de PCR foi submetido a eletroforese e a presença de uma banda de DNA correspondente a 1.170 pb indicou a ocorrência de amplificação específica do DNA e, portanto, a confirmação da identidade do isolado. O isolado JM5 (isolado de mel de abelha Jataí) teve parte de seu genoma amplificado pela PCR espécie-específica, gerando um fragmento semelhante ao fragmento gerado da levedura comercial. Isso significa que este isolado pertence a espécie *S. cerevisiae*. Um fragmento de tamanho semelhante foi amplificado nas amostras das leveduras IP6, JM9 e JM13, porém a presença de um segundo fragmento superior tornou o resultado inconclusivo. As demais leveduras isoladas dos produtos apícolas não pertencem às espécies *S. cerevisiae*. Microrganismos pertencentes à espécie *S. cerevisiae* são classificados como seguros (GRAS) para produção de bebidas, produtos de panificação, enzimas e vitaminas. Outras leveduras também podem ser associadas à produção de bebidas para induzir sabores diferenciados, entretanto a identificação das mesmas é essencial para garantia da segurança em seu uso. O sequenciamento de parte de genes dessas linhagens permitirá sua identificação, o que é essencial para continuidade das pesquisas visando o desenvolvimento de um fermento para produção de hidromel.

ANEXO 3: RESUMOS SIMPLES SUBMETIDOS AO III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA (SIMB)

ABSTRACT 1: KINETIC OF YEASTS ISOLATED FROM PRODUCTS OF JATAÍ (*Tetragonisca angustula angustula*) AND MOCINHA BRANCA (*Frieseomelita tricocerata*) BEES.

Autores: ARRUDA, L. M.; XAVIER, P. L.; STANGE, W. S. B.; DE ALMEIDA, E. L. M.; ELERATE, J; RAMIREZ, M. X. D¹; CAMPOS, V. J.; SILVA, M. S; SANTANA, W. C.; ELLER, M. R

Yeasts isolated from products of stingless bees present technological and biological characteristics ideal for their use in bioprocesses and the development of new fermented products. In this work we have calculated parameters of specific growth rate, yield of ethanol and glycerol of yeasts isolated from Jataí bees's honey and pollen (*Tetragonisca angustula angustula*) and Mocinha Branca's pollen (*Frieseomelita tricocerata*). Both pollen and honey were collected directly from hive and inoculated on acidified (pH 3.5) PDA (Potato Dextrose Agar) medium for isolation. The isolated colonies were inoculated in YEPG and incubated at 25 °C. The number of viable cells was monitored using in a Neubauer chamber and Optical density (OD) at every three hours until reaches the stationary phase. The correlation between number of viable cells and O.D. was established for each single yeast, as well as its specific growth rate. Ethanol, glucose and glycerol concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an ion exchange column Aminex HPX - 87p. Nine isolates from Jataí's honey (JM), 3 from Jataí's pollen (JP) and 1 from Mocinha Branca's pollen (MBP) were obtained. Their specific growth rates ranged from 0.19 to 0.09 h⁻¹. JM15 showed higher growth rate and JM6 the lower one. JM5, JM7, JM12 and JP14 presented no significant difference. The isolates produced ethanol at yields between 0.75 (JP3) and 0.05 g/g. JM5 and JP12 did not differ significantly and presented lower yields. Glycerol yields varied from 0.09476 to 0.02172 g/g, with no significant difference between samples. Samples derived from Mocinha Branca products showed low count of

microorganisms. JP14 and JM7 have shown high speed growth and so were able to produce highest levels of ethanol from glucose, and low yields of glycerol. Thus the JP14 and JM7 yeasts can be applied to biofuels production and alcoholic beverages due to ethanol high-performance.

ABSTRACT 2: FERMENTATIVE CHARACTERISTICS OF YEASTS ISOLATED FROM IRAÍ BEE (*Nannotrigona testaceicornis*) PRODUCTS

AUTORES: ALMEIDA, E. L. M.; ARRUDA, L. M.; XAVIER, P. L.; RAMÍREZ, M. X. D.; SILVA, M. S; SILVEIRA, D. A. F.; FIETTO, L. G.; SANTANA, W. C.; SILVA, P. H. A.; ELLER, M. R.

Bees incorporate in their products microorganisms for transformation of their feed. Native bee products are promising sources of yeasts for fermentative processes. In this work we had studied the kinetics for fermentative potential of yeasts isolated from honey and pollen of Iraí bee (*Nannotrigona testaceicornis*). The microorganisms were isolated in acidified BDA medium (pH 3,5) and morphologically distinct colonies were selected. The isolates were activated and cultivated in YEPG medium at 28 °C and 250 rpm for growth kinetics studies. At each 3 hours, during 24 h, cellular growth was monitored. Glucose consumption, ethanol and glycerol production were determined at 24 h by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Six isolates were selected, one from honey (M8) and five from pollen (P5, P6, P7, P9 e P12). Isolates IM8 and IP6 presented slow growth, but high ethanol income and so are indicated for production of beverages and biofuel. IP5 presented slow growth and low ethanol production, while IP7 presented fast development with low ethanol production, being indicated for cell production. IP9 and IP12 produced high amounts of glycerol. Glycerol is a metabolite that could be produced to preserve the cell osmotic control or to preserve redox balance. Their use could provide peculiar characteristics in beverages. In general, honey and pollen from Iraí bee were proved as promising sources for the isolation of novel microorganisms of technological and scientific interest.