

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPGCB

Tese

**Seleção de leveduras de
frutos e folhas nativos do
Cerrado para fabricação de
cachaça e cerveja**

Ouro Preto
2022



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Marcos de Oliveira

Seleção de leveduras de frutos e folhas nativos do Cerrado para
fabricação de cachaça e cerveja

Tese de Doutorado

Ouro Preto
2022

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPCBIOL

Marcos de Oliveira

Seleção de leveduras de frutos e folhas nativos do Cerrado para
fabricação de cachaça e cerveja

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Co-orientador: Prof. Dr. Aureliano Claret Cunha

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração em Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.

Ouro Preto-MG
Dezembro de 2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

O48s Oliveira, Marcos De.
Seleção de leveduras de frutos e folhas nativos do Cerrado para fabricação de cachaça e cerveja. [manuscrito] / Marcos De Oliveira. - 2022.
143 f.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.
Coorientador: Prof. Dr. Aureliano Claret Cunha.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Cerrado. 2. Leveduras. 3. Cachaça. 4. Cerveja. I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Cunha, Aureliano Claret. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcos de Oliveira

Seleção de leveduras de frutos e folhas nativos do Cerrado para fabricação de cachaça e cerveja

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Aprovada em 20 de dezembro de 2023

Membros da banca

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Antonio Helvecio Totola - Universidade Federal de São João del Rei
Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto - Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Monica Cristina Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto
Profª Drª Silvana de Queiroz Silva - Universidade Federal de Ouro Preto

Rogelio Lopes Brandão, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 13/03/2023



Documento assinado eletronicamente por **Rogelio Lopes Brandao, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/03/2023, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0489860** e o código CRC **FEC64AA1**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as três mulheres da minha vida: minha amada mãe Dilene (*in memoriam*) que sempre foi e será minha estrela guia e meu maior exemplo de vida.

A Mariana de Laia e Maria da Penha de Laia (minha sogra e esposa). Vocês sempre estiveram comigo em todos os momentos e nunca largaram minha mão. Grandes mulheres incentivadoras que Deus colocou na minha vida como anjos da guarda. Não seria a metade do homem que sou sem seus exemplos e suas presenças na minha vida.

Aos meus filhos Mateus e Lucas que além de serem filhos maravilhosos são os meus melhores amigos! Muitas vezes quando a escuridão se aproximava e a esperança se exauria vocês foram meus norteadores no mar caótica que se chama vida.

A família Laia por serem amigos em horas que não acreditava mais no significado dessa palavra!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

“Acredite em si próprio e chegará um dia em que os outros não terão outra escolha senão acreditar com você”.

Cynthia Kersey

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFOP por ter viabilizado as condições para conclusão do doutorado e aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, FAPEMIG E CNPQ.

Ao prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão pela oportunidade de compartilhar sua experiência e orientação, sempre com uma palavra certa no momento correto sendo um farol nos momentos de dificuldade.

Ao prof. Dr. Aureliano Claret Cunha por ter o trabalho árduo de retirar sempre o meu melhor além de ser um ser humano e profissional digno de referência.

Aos professores Dr. Ieso Castro e Dra. Izinara Cruz pela grande contribuição intelectual ao trabalho e por serem fonte de inspiração.

A Dra. Débora que muitas vezes pegou nas minhas mãos (no sentido exato das palavras) e as guiou nos procedimentos de bancada. Uma mulher forte que me ensinou que a sabedoria vem sim acompanhada da simplicidade.

A equipe do LBCM: Patrícia, Ana, Zezé, Ludmila, Bianca por toda parceria dispensada! Vocês deixaram meus dias mais leves com sorrisos e companheirismo.

A Dra. Ananda, Dr. Robson e Dr. Bruno do Laboratório de Massas que com muita paciência ajudaram nas análises do CG e CLAE.

Ao corpo docente do CBIOL pelas disciplinas ministradas que contribuíram para melhorar minha formação.

A Dra. Edilene Barbosa por ter me ajudado nas análises da cachaça além de ser uma colega incentivadora do desenvolvimento do meu trabalho.

Ao IFNMG por ter dado todo apoio necessário ao desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

A cachaça é o genuíno destilado nacional. A cerveja, de origem mais tardia, tornou-se a bebida mais consumida tanto pelos brasileiros quanto pela população mundial. Ambas são bebidas derivadas de processos fermentativos, realizados pelas leveduras, microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica. Ademais, novas cepas têm sido estudadas e testadas objetivando a produção de bebidas com características sensoriais singulares. O Cerrado é um bioma que possui grande diversidade de plantas endêmicas e frutíferas, com características relevantes que possibilitem desenvolvimento de leveduras. O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras dos frutos e folhas do Cerrado Mineiro que possuíssem características importantes para produção de cachaça e cerveja. Desta forma, foram isoladas um total de 37 leveduras de 6 frutos e folhas do Cerrado mineiro com características morfológicas diferentes. Posteriormente de acordo com as respostas bioquímicas relacionadas a produção de cachaça e cerveja 4 foram selecionadas, a JUR11, JUR16, ERC10B e JEN11, nas quais todas pertencem ao mesmo gênero, *Meyerozyma*. Na produção da cachaça, os parâmetros fermentativos apresentados pelas leveduras não se diferenciaram estatisticamente umas das outras. Os parâmetros de teores alcoólicos, acidez volátil e metabólitos voláteis secundários estão dentro dos valores encontrados em cachaças elaboradas por meios tradicionais de produção e dentro dos parâmetros aceitos da legislação vigente (IN 13/2005). Adiante, as análises sensoriais mostraram uma aceitação acima de 58% entre os degustadores, sem diferença significativa nos atributos avaliados. Nos testes bioquímicos de seleção, foi verificado que as 4 leveduras selecionadas não foram capazes de metabolizarem maltose, característica importante para fabricação de cerveja com baixo teor alcoólico. Nesse sentido, elas foram submetidas a testes em diferentes condições fermentativas sendo estimados e quantificados os principais metabólitos voláteis relacionados ao sabor e aroma e o seu teor alcóolico produzido. A levedura ERC10B foi a selecionada para produção da cerveja produzindo cervejas do tipo zero álcool. O perfil de produção dos metabólitos secundários é compatível com as cervejas com álcool, tradicionalmente produzidas. Os resultados mostram que a presença do lúpulo pode influenciar o processo fermentativo da levedura ERC10B havendo necessidades de testes mais apurados.

Palavras-chave: Cerrado; leveduras não convencionais; produção de cachaça e cerveja; zero teor alcoólico

ABSTRACT

Cachaça is the genuine national distillate. Beer, of later origin, has become the most consumed drink by both Brazilians and the world population. Both are beverages derived from fermentation processes carried out by yeasts, microorganisms responsible for alcoholic fermentation. Furthermore, new strains have been studied and tested with the aim of producing drinks with unique sensory characteristics. The Cerrado is a biome that has a great diversity of endemic and fruit plants, with relevant characteristics that allow the development of yeasts. The objective of this work was to select yeasts from the fruits and leaves of the Cerrado Mineiro that possess important characteristics for the production of cachaça and beer. In this way, a total of 37 yeasts from 6 fruits and leaves from Cerrado mineiro with different morphological characteristics were isolated. Subsequently, according to the biochemical responses related to the production of cachaça and beer, 4 were selected, JUR11, JUR16, ERC10B and JEN11, in which all belong to the same genus, *Meyerozyma*. In the production of cachaça, the fermentative parameters presented by the yeasts did not statistically differ from each other. The parameters of alcohol content, volatile acidity and secondary volatile metabolites are within the values found in cachaça produced by traditional means of production and within the accepted parameters of current legislation (IN 13/2005). Further, sensory analyzes showed acceptance above 58% among tasters, with no significant difference in the evaluated attributes. In the biochemical selection tests, it was verified that the 4 selected yeasts were not able to metabolize maltose, an important characteristic for the manufacture of beer with low alcohol content. In this sense, they were submitted to tests in different fermentation conditions, estimating and quantifying the main volatile metabolites related to flavor and aroma and their produced alcohol content. The yeast ERC10B was selected for beer production, producing zero alcohol beers. The production profile of secondary metabolites is compatible with traditionally produced beers with alcohol. The results show that the presence of hops can influence the fermentation process of the ERC10B yeast, requiring more accurate tests.

Keywords: Cerrado; unconventional yeasts; production of cachaça and beer; zero alcohol content

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Seleção e identificação de leveduras isolados de frutos nativos do Cerrado Mineiro para produção de cachaça e cerveja

1 - INTRODUÇÃO	2
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Cerrado e sua biodiversidade	3
2.2 - Leveduras	4
2.3 - Identificação de leveduras	5
2.4 - Produção de bebidas no Brasil	8
2.5 - Produção de compostos secundários relacionados à produção de sabores e aromas em cervejas e cachaças	9
3 - OBJETIVOS	12
3.1 - Objetivo geral	12
3.2 - Objetivos específicos	12
4 - METODOLOGIA	13
4.1 - Isolamento das leveduras de frutos do Cerrado	13
4.2 - Caracterização morfológica das leveduras isoladas	14
4.3 - Testes fisiológicos e bioquímicos para seleção de leveduras	14
4.3.1 - Crescimento em diferentes fontes de carboidratos	14
4.3.2 - Testes de capacidade de produção de compostos aromatizantes	15
4.3.2.1 - Teste de produção de H ₂ S	15
4.3.2.2 - Teste de resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL)	15
4.3.2.3 - Teste de resistência a Cerulenina	16
4.3.2.4 - Teste de resistência ao fluoro-DL-fenilalanina (PFP)	16
4.3.3 - Teste de tolerância ao etanol	16
4.3.4 - Teste de resistência a estresse múltiplo (osmótico, alcoólico e térmico)	17
4.3.5 - Teste qualitativo de floculação	17
4.3.6 - Testes de fermentação	17
4.3.6.1 - Tubo de Durham invertido	17

4.3.6.2 -Teste fermentativo na presença de antimicina	18
4.4.7 - Teste de crescimento em diferentes temperaturas	18
4.5 - Identificação molecular das leveduras selecionadas	19
4.5.1 - Extração de DNA.....	19
4.5.2 - Protocolo de amplificação da região 28S do DNAr.	19
4.5.3 - Sequenciamento e construção da árvore filogenética	20
4.5.4 - Polimorfismo molecular das cepas selecionadas por amplificação COX1	21
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 - Caracterização morfológica das leveduras isoladas dos frutos e folhas do cerrado .	22
5.2 - Crescimento nas fontes de carboidratos	24
5.3 - Teste relacionados a produção de aromas (teste de resistência ao TFL, cerulenina, PFP e produção de H ₂ S)	25
5.4 - Teste de tolerância ao etanol em diferentes fontes de carboidrato	25
5.5 - Teste de resistência ao estresse osmótico	26
5.6 - Teste qualitativo de floculação	27
5.7 - Resultados de testes fermentativos.....	27
5.7.1 - Fermentação com tubos de Durham	27
5.7.2 - Testes fermentativos na presença de antimicina	29
5.8 - Teste de crescimento em diferentes temperaturas	30
5.9 - Seleção das leveduras para produção de cerveja e cachaça.	30
5.10 - Identificação das leveduras selecionadas por sequenciamento.....	33
5.11- Análise do polimorfismo molecular das leveduras selecionadas.....	36
6 - CONCLUSÃO	38
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8- ANEXOS.....	51
Anexo 8.1: Quadro com características macromorfológicas das leveduras isoladas	51

CAPÍTULO 2: Produção e análise de cachaças em escala piloto por leveduras isoladas dos frutos e folhas do Cerrado Mineiro

1 - INTRODUÇÃO	54
2 - REVISÃO DE LITERATURA	56
2.1 - Cachaça.....	56
3 - OBJETIVOS	59
3.1 - Objetivo geral	59
3.2 - Objetivos específicos	59
4 - METODOLOGIA	60
4.1- Produção das cachaças em escala piloto.....	60
4.1.2 - Propagação das leveduras.....	60
4.1.3 - Preparação do pé de cuba	60
4.1.4 - Fermentação em escala piloto.....	61
4.1.5 - Destilação	62
4.2 - Parâmetros fermentativos	63
4.2.1 - Acidez do mosto.....	63
4.2.2 - Consumo de açúcares.....	63
4.2.3 - Teor alcoólico do vinho.....	63
4.3 - Parâmetros físico-químicos da cachaça	63
4.3.1 - Teor alcoólico real da cachaça (% v/v).....	63
4.3.2 - Acidez volátil da cachaça	64
4.4 - Análise sensorial	64
4.5 - Análise quantitativa de compostos voláteis secundários em cachaças.....	66
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1 - Parâmetros fermentativos	67
5.1.1 - Capacidade de consumo de carboidratos (Brix/h)	67

5.1.2 - Produção de álcool no vinho	68
5.1.3 - Acidez no fermentado, acidez volátil e teor alcoólico nas cachaças	68
5.2 - Análise sensorial	69
5.3 - Perfil de voláteis das cachaças	71
6 - CONCLUSÃO	76
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8- ANEXOS.....	83
8.1- Parecer da CEP	83
8.2 - Curva padrão das análise de voláteis	85
CAPÍTULO 3: Produção de cervejas em escala laboratorial com leveduras selecionadas de frutos e folhas do cerrado	
1 - INTRODUÇÃO.....	87
2 - REVISÃO DE LITERATURA	89
2.1 - Histórico e produção das cervejas.....	89
2.2 - Cervejas de baixo teor alcoólico	92
3 - OBJETIVOS.....	95
3.1 - Objetivo geral	95
4 - METODOLOGIA	96
4.1 - Desempenho fermentativo estimado por perda de peso em meios laboratoriais	96
4.2 - Desempenho fermentativo por perda de peso com mosto cervejeiro	96
4.3 - Análise de voláteis secundários produzidos em fermentado cervejeiro	97
4.4 - Preparação do mosto	98
4.5 - Quantificação do teor alcoólico em cervejas produzidas com diferentes mosturações.....	99
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	100

5.1 - Testes de desempenho fermentativo.....	100
5.2 - Produção estimada de álcool em mosto cervejeiro.....	103
5.3 - Metabólitos voláteis secundários.....	105
5.4 - Seleção da levedura para produção de cerveja de baixo teor alcoólico.....	108
5.5 - Teor alcoólico estimado com a levedura selecionada.....	109
5.5 - Quantificação do teor alcoólico.....	110
6 - CONCLUSÃO	114
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
8 - ANEXOS.....	123
8.1 - Coeficiente da reta para construção da curva padrão na análise de voláteis.....	123
8.2 - Pontos da curva CLAE etanol.....	124
.....	125

**CAPÍTULO 1: Seleção e identificação de leveduras isolados de frutos
nativos do Cerrado Mineiro para produção de cachaça e cerveja**

1- INTRODUÇÃO

O mercado de bebidas no Brasil gera um significativo aporte financeiro para a economia nacional, com destaque para a venda e produção de cerveja e cachaça. O consumidor hodierno possui novos hábitos de compra e avalia com mais exigência a qualidade de seu produto, criando assim, uma necessidade de utilização de novas leveduras que possam contribuir na formação de novos sabores e aromas, agregando individualidade ao produto. O Cerrado é um bioma pouco explorado e amplo em diversidade de flora e fauna. Dentro disso, destacam-se suas frutas, muitas delas endêmicas, nas quais possuem características físico-químicas como: pH ácido, ricas em carboidratos e temperaturas por volta de 22 a 27 °C (MENDES *et al.*, 2012; ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014). Essas condições são favoráveis ao crescimento de leveduras. Nessa perspectiva, o objetivo desse trabalho foi buscar, dentro da diversidade do Cerrado Mineiro e singularidade dos seus frutos e folhas, leveduras que sejam capazes de produzir cachaça e cerveja. A metodologia de seleção foi desenvolvida pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) que verificaram nas leveduras isoladas características positivas para produção de cachaça e cerveja. Com isso, os critérios de escolha se basearam em um conjunto de respostas bioquímicas relacionadas ao processo de produção dessas bebidas, como condições de fermentação (concentração do mosto, temperatura, tempo), crescimento em carboidratos encontrados no mosto de cachaça e cerveja, capacidade de floculação, resistência a drogas relativas ao aroma e sabor (como trifluoro-D-L-leucina, cerulenina e fluoro-D-L-fenilalanina), produção de ácido sulfídrico, testes de estresse (presença de etanol, osmolaridade, temperatura de crescimento) e testes fermentativos (Durham invertido e resistência a antimicina) (DE ARAÚJO VICENTE *et al.*, 2006). Essa metodologia vem se mostrando muito eficiente, visto que o laboratório conta com uma grande coleção de isolados de várias condições e regiões do país. Ademais, leveduras dessa coleção já foram aplicadas em estudos de biotecnologia, a exemplo das leveduras isoladas de dornas de cachaça que se mostraram eficientes na produção de cachaças e cervejas (ARAUJO *et al.*, 2018, BARBOSA *et al.*, 2018).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Cerrado e sua biodiversidade

O Cerrado está entre os principais biomas mundiais, ocupando uma área de 2.036.448 km². Sendo assim, é o segundo maior bioma brasileiro, com cerca de 22% de área nacional, sua localização se concentra nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí e o Distrito Federal (MMA, 2018). Em virtude de sua grande extensão territorial, o bioma possui formações edafoclimáticas particulares. Outrossim, seu clima é tropical com índice pluviométrico anual médio de 1500 mm e períodos bem demarcados de chuvas (que vão desde outubro ao início de março, sendo o restante do ano de estiagem). As temperaturas médias são variam entre 22 e 27 °C, com a umidade relativa do ar em torno de 38 a 40%, enquanto no período chuvoso ela é elevada para cerca de 97% (MENDES *et al.*, 2012; ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Esse bioma é considerado um dos grandes *hotspots* mundiais, abrigando 1.200 espécies de peixes, 180 de répteis e 150 de anfíbios, 199 de mamíferos e uma avifauna de 837 espécies. Possui uma grande variedade de plantas nativas, por volta de 11.627 espécies catalogadas (MMA, 2018). Sua vegetação pode apresentar grande variedade de fitoformas dentro do próprio bioma, podendo chegar a 44% de flora endêmica (caracterizado por gramíneas, arbustos e árvores distantes). Suas árvores são caracterizadas por um baixo a médio porte, com caules retorcidos e raízes mais profundas que permitem absorver água encontrada a 2 metros de profundidade, características de adaptação ao período da estiagem (MENDES *et al.*, 2012; ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Dentre as riquezas do Cerrado, destacam-se suas espécies de plantas frutíferas e endêmicas, grande parte delas ainda desconhecidos pela população brasileira. Muitos destes frutos são consumidos apenas na alimentação local e possuem exploração extrativista (DAMIANI *et al.*, 2011). Ainda, possuem pH ácido (ALMEIDA, 1998) e são ricos em carboidratos, fibras, proteínas e lipídios como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores nutricionais e energéticos em porcentagem em frutos do Cerrado a cada 100 gramas

Fruto	Valor energético em Kcal	Umidade %	Proteínas %	Lipídios %	Carboidratos %
araçá	37,09	82,36	0,5	0,49	7,67
araticum	90,47	76,05	1,22	3,83	12,78
buriti	14,3	72,8	3	10,5	12,50
cagaita	20,01	94,34	0,82	0,44	3,08
caju do cerrado	38,27	86,57	1,18	0,63	6,97
coquinho azedo	52,56	89,8	0,57	6,27	8,00
coco guariroba	47,36	87,31	0,5	0,12	10,57
curriola	—	70,68	2,08	0,84	17,16
mangaba	66,21	82,4	1,2	2,37	10,02
maracujá do cerrado	24,4	85,5	2,1	0,03	10,80
murici	—	70,9	1,94	2,31	18,85
pequi	35,84	41,5	3	33,9	11,45
pitomba	56,35	83,16	1,15	0,19	12,51

Fonte: OLIVEIRA, 2015

Atualmente, o Cerrado vem sofrendo grande intervenção antrópica, principalmente por causa do avanço do setor agroindustrial. A cobertura vegetal original apresentou uma perda de 47,84% dos 204 milhões de hectares de mata nativa (MMA, 2018) levando a extinção de animais e plantas desconhecidos da comunidade científica. Hoje, cerca de 8,1% do Cerrado está protegido por Unidades de Conservação. Dentro disso, 3,1% é de Proteção Integral e 5% é de uso sustentável (MMA, 2018).

2.2 - Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares, que possuem uma parede celular rígida com morfologia arredondada a ovoide, são imóveis e se reproduzem de forma assexuada por brotamento ou sexuada por esporulação (MADIGAN *et al.*, 2016). Para sobreviverem, as leveduras dependem de carbonos orgânicos como principal fonte de energia para seu metabolismo. Na presença de oxigênio, seu metabolismo energético é mais rentável e as leveduras utilizam a maior parte dessa energia para reprodução. Por outro lado, na ausência de O₂, em regra mais geral, ocorre a fermentação, outra via metabólica menos energética, que direciona a energia produzida para manutenção celular. Nesse processo, é liberado em grande parte em metabólitos primários como CO₂ e etanol e apenas 1% é convertida em uma baixa concentração de metabólitos secundários como

álcoois superiores, ésteres, carbonilas, ácidos entre outros (CARDOSO, 2013). Algumas leveduras possuem um sistema regulador interligado a essas duas vias energéticas, chamado de efeito *Crabtree*. Esse recurso permite que na presença de oxigênio e em altas concentrações de glicose, ocorra a diminuição da assimilação do oxigênio na produção de energia. Por consequência, a quantidade de ATP gerada na quebra da glicose na glicólise produz quantidades suficientes de energia reprimindo a respiração aeróbica (DE DEKEN, 1966).

As condições físico-químicas encontradas nos frutos do Cerrado como pH ácido, presença de diferentes fontes de carboidratos e a exposição média de temperaturas entre 20 a 30 °C são condições favoráveis para o desenvolvimento de leveduras. Os frutos podem abrigar leveduras tanto na região superficial dos frutos (epicarpo) como nas regiões internas (mesocarpo e endocarpo). Esses microrganismos podem desempenhar relações mutualísticas favoráveis a saúde das plantas, produzindo substâncias reguladoras de crescimento ou mesmo agindo na proteção dos tecidos, com a proteção de alcalóides contra predadores naturais (FERREIRA *et al.*, 2017). Ademais, outras potencialidades biotecnológicas exploradas por meio destes microrganismos são a extração de enzimas para utilização em diferentes setores (CARREIRO *et al.*, 2019), biocontrole natural (RORIGUEZ *et al.*, 2020), produção de etanol de segunda geração (MÜLLER, *et al.*, 2019) além de outras aplicações na área da saúde (CHANDRA, 2012).

As leveduras são responsáveis pela fermentação alcóolica, muito utilizada no setor de bebidas. Para serem eficazes nessa atividade, é importante que apresentem um conjunto de características como fermentação eficiente, resistência ao etanol, resistência a osmolaridade e baixa/nenhuma produção de H₂S (DE ARAÚJO VICENTE *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2012). O gênero mais conhecido e utilizado na produção de bebidas é o *Saccharomyces*, recebendo destaque a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente estudada e aplicada no setor (ARAÚJO, 2018; MCGOVERN *et al.*, 2009).

2.3 - Identificação de leveduras

Dentre os cinco reinos dos seres vivos, o Fungi ocupa a segunda posição com maior número de representantes dentro dos eucariotos, com cerca de 5 milhões de espécies (BLACKWELL *et al.*, 2011). Por ser um grupo tão grande e cosmopolita, apresenta uma variedade de condições relacionadas a nutrição, metabolismo, reprodução e adaptação. Devido a essa diversidade, as espécies podem sofrer alterações no seu fenótipo ou em

repostas fisiológicas, causando grande dificuldade de identificação por meio do uso de métodos tradicionais bioquímicos e morfológicos.

Atualmente, a biologia molecular tem sido uma ferramenta eficaz na identificação de espécies desse grupo. Em virtude dos avanços e popularização de técnicas moleculares, ocorreu um desenvolvimento no conhecimento das espécies de leveduras. Em 2011 haviam sido catalogadas cerca de 1500 novas espécies, dobrando as descobertas das últimas décadas que eram de aproximadamente 700 espécies (KURTZMAN *et al.*, 2011). Na identificação molecular são comumente utilizadas regiões conservadas do material genético, chamados DNA *barcodes* - “códigos de barra” (BLACKWELL *et al.*, 2011). Para isso, são utilizadas três regiões do DNA ribossômico (DNA_r): a subunidade maior do ribossomo (28S-LSU), a subunidade menor do ribossomo (18S-SSU) e a região dos espaçadores transcritos internos (ITS). Com isso, para ter acesso a essas regiões, são produzidas pequenas sequências de nucleotídeos que recebem o nome de iniciadores (*primers*). Esses iniciadores irão anelar as regiões específicas citadas anteriormente promovendo a sua amplificação pelo uso de técnicas de reação de cadeia polimerase (PCR) (SCHOCH *et al.*, 2012). A identificação das leveduras ocorre pelo sequenciamento dessas regiões e comparado com sequências depositadas em bancos de dados disponíveis na internet. A Figura 1 demonstra as regiões mais utilizadas e seus respectivos iniciadores.

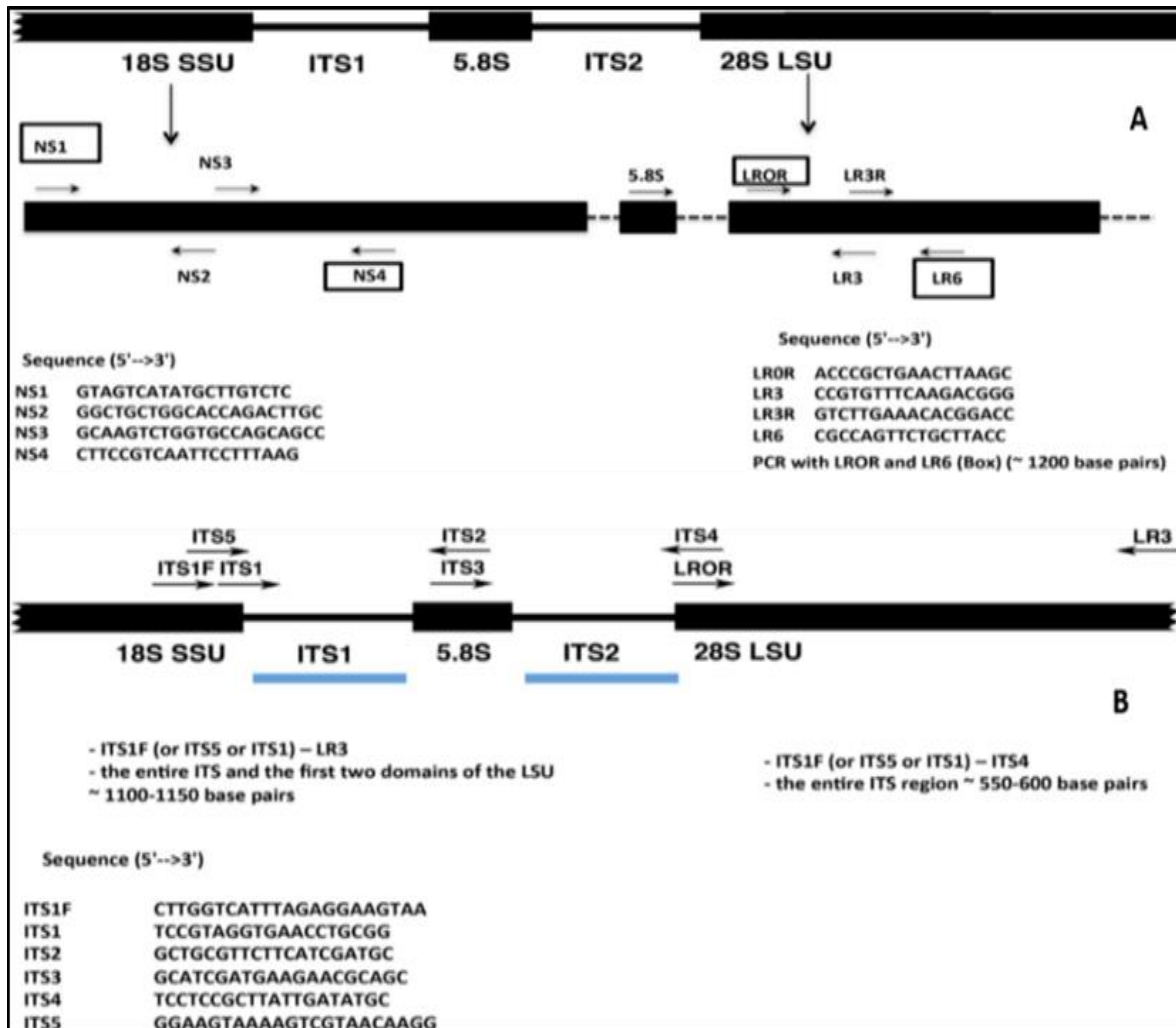


Figura 1: Principais regiões e iniciadores usados em identificações filogenéticas de fungos. Fonte: (RAJA *et al.*, 2017)

As regiões LSU, SSU e ITS apresentam as seguintes vantagens: são altamente conservadas, apresentam grande quantidade de sequências armazenadas em bancos de dados de acesso público e a soma delas representam mais de 50% de sequências depositadas em todos bancos de dados disponíveis, divididas em mais de 2.500 gêneros e 15.500 espécies (BEGEROW *et al.*, 2010). Outra característica é que elas possuem cópias em *tandem* nos ribossomos, facilitando a amplificação pelos iniciadores (O'BRIEN *et al.*, 2005).

Para distinguir diferentes perfis genéticos dentro da mesma espécie, várias técnicas moleculares derivadas da PCR são utilizadas, baseadas em diferenças de polimorfismo do DNA. Dentre essas opções, temos as técnicas de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e a amplificação do Citocromo Oxidase I (COX1) (BOLZAN, 2011).

2.4 - Produção de bebidas no Brasil

As bebidas são produzidas a partir do processo fermentativo. Sendo assim, a aplicação desse conhecimento vem acompanhando a humanidade desde o período Neolítico, por volta de 10.000 anos a.C (NAIR; PRAJAPATI, 2003). Segundo relatos, baseados em estudos arqueológicos, uma cerveja primitiva foi obtida pela fermentação de grãos e posteriormente utilizada na dieta humana, antes mesmo da descoberta do pão (BRAIDWOOD *et al.*, 1953).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA, 2020), as indústrias do setor de bebidas tiveram um faturamento ascendente (Figura 2) de 2014 a 2019. No último ano, a produção foi equivalente a 1,9% do PIB nacional e 4,8% do valor bruto de produção (ABIA, 2020). O setor cervejeiro arrecadou em 2019, US\$ 77 bilhões (SINDICERV, 2019) e o da cachaça, aproximadamente US\$ 14 milhões (ANUÁRIO DA CACHACA, 2019). Em 2020, a pandemia causada pela COVID-19 teve forte influência no mercado de bebidas. Pois, setores como bares, restaurantes e hotéis sofreram quedas bruscas de vendas devido as medidas de isolamento social. Por consequência gerou o menor acesso ao público e a queda de consumo. Estudos relacionados ao mercado de bebidas mostraram uma diminuição de 16,1% no consumo de cervejas e 22,3% nos destilados durante esse mesmo ano. No entanto, novas estimativas indicam recuperação a partir de 2022 para o setor cervejeiro e 2023 para o consumo de destilados (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2020a).

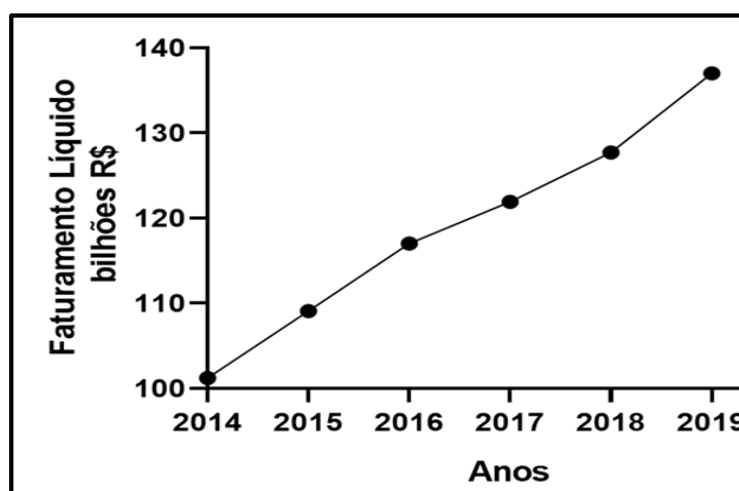


Figura 2: Evolução do faturamento em bilhões do setor de bebidas nos anos de 2014-2019. Fonte: ABIA, 2020

2.5 - Produção de compostos secundários relacionados à produção de sabores e aromas em cervejas e cachaças

O processo fermentativo na produção de bebidas além de produzirem compostos primários, como etanol e CO₂ (Figura 3), também gera uma conversão em índices menores de metabólitos secundários. Estas substâncias influenciam diretamente na formação do aroma e sabor da bebida. Assim, fatores como tempo de fermentação, temperatura, concentração dos componentes presentes no mosto, estado fisiológico, tipo de levedura, presença de oxigênio e contaminação são alguns influenciadores no resultado final da fermentação e conseqüentemente na bebida (ARAÚJO, 2018). Os metabólitos tanto primários como secundários produzidos no processo fermentativo têm como principal via de produção a degradação dos carboidratos absorvidos pelas células. Após a absorção dos carboidratos por transportadores específicos de membrana do tipo GLUT (MACHADO, 1998), ocorre uma sequência de 12 reações (glicólise), que apresentam um saldo energético de 2 moléculas de ATP e duas moléculas de ácido pirúvico. As moléculas de ATP são utilizadas no metabolismo celular e as do ácido pirúvico na ausência de oxigênio servem de substrato para fermentação alcoólica, produzindo etanol, CO₂ e cerca de 1% de metabólitos secundários (FARIA-OLIVEIRA *et al.*, 2013). A produção de etanol é muito importante para levedura pois inibe a proliferação de outros organismos, diminuindo assim, a competição de nutrientes no mosto. Nesse sentido, o álcool é um componente característico presente nas bebidas, principalmente nas cachaças e cervejas. O CO₂ é um importante elemento sensorial pois suas bolhas estimulam nosso palato, promovendo movimentação física de moléculas e retirando gorduras e outros sabores, potencializando os sabores e aromas encontrados nas bebidas (MOSHER, 2020).

A quantidade de metabólitos secundários produzidas se deve a dois fatores: as condições de fermentação e a levedura utilizada na fermentação. As concentrações produzidas dessas substâncias podem refletir de modo positivo ou negativo no produto final.

A presença de H₂S (sulfeto) em cervejas e cachaças não são recomendados pois essa substância, mesmo em baixas concentrações, remete ao consumidor um aroma de “ovo podre” (Tabela 2), depreciando a bebida. A produção de H₂S tem origem a partir de reações metabólicas relacionados a algumas espécies de leveduras. Elas degradam os aminoácidos metionina e cisteína, presentes no mosto, para obter nitrogênio. A partir de ação enzimática nos derivados nitrogenados produzidos, há liberação de enxofre na forma

H₂S (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995b). Quando as concentrações desses dois aminoácidos estão baixas no meio, as leveduras assimilam moléculas de enxofre inorgânico presentes no mosto. Assim, sofrem reações de redução formando sulfitos que ao combinar com compostos nitrogenados formam primeiramente a cisteína e depois a metionina sendo ambos utilizados na produção do enxofre (SWIEGERS *et al.*, 2005).

Tabela 2: Principais metabólitos secundários produzidos na fermentação e seus aromas e sabores equivalentes

COMPONENTES	VOLÁTEIS	DESCRIÇÃO DO AROMA
ÉSTERES	Acetato de etila	Solvente, frutado, adocicado
	Acetato de isoamila	Banana, maçã, solvente
	Acetato de fenil-etil	Flores, rosa, frutado
	Acetato de isobutila	Banana, frutado
	Hexanoato de etila.	Maça verde
	Octanoato de etila	Doce
	Decanoato de etilo	Floral
ALCÓOIS SUPERIORES	Propanol	Álcool
	Butanol	Álcool
	Isobutanol	Álcool
	Álcool isoamílico	Álcool, banana, adocicado, aromático
INTERMEDIÁRIOS DA FERMENTAÇÃO	Acetaldeído	Folhas verdes, frutado
	Diacetil	Amanteigado
SULFETOS	Sulfeto de hidrogênio	Ovo podre

Fonte: KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008; SWIEGERS *et al.*, 2005.

Outros dois compostos secundários não recomendados é o diacetil que remete um sabor “amanteigado” e o acetaldeído “aroma de folhas verdes” (Tabela 2) (KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008). O diacetil pode ser produzido por processos não enzimáticos, dentro da fermentação. Isso ocorre por meio da descaboxilação de intermediários produzidos nas vias metabólicas dos aminoácidos valina e isoleucina (VAN BERGEN *et al.*, 2016). O acetaldeído é uma molécula intermediária na fermentação alcoólica. Esta substância é produzida devido a ação da enzima piruvato descarboxilase no ácido pirúvico (VENTURINI FILHO, 2016; SWIEGERS *et al.*, 2005).

Dentre os compostos que contribuem para formação positiva de aromas e sabores estão os álcoois superiores (propanol, isobutanol e o álcool isoamílico), responsáveis pelo sabor característico de álcool da bebida e substrato para produção de ésteres de acetato.

(MOREIRA; NETTO; MARIA, 2012). Esse grupo de substâncias podem ser produzidas por duas vias: a catabólica e anabólica. A primeira também conhecida como via de Erlich ocorre quando os aminoácidos estão presentes em concentrações suficientes no meio e são produzidas por ação de enzimas. O n-propanol é derivado da treonina, o isobutanol tem origem da valina e o álcool isoamílico da leucina e isoleucina. Por outro lado, na via anabólica, a produção é feita pelo metabolismo do carboidrato produzindo o α -cetoácido (um intermediário da via de Erlich). Esta substância vai ser descarboxilada e reduzida, produzindo o álcool isoamílico, isobutanol e propanol. Esta via ocorre quando a concentração de aminoácidos é insuficiente antes do início do processo fermentativo (PIRES *et al.*, 2014; ASHIDA *et al.*, 1987). Os ésteres de acetato são produzidos por meio da enzima álcool acetil transferases (AATases). Essa enzima condensa um álcool superior com uma molécula de acetil coenzima A (SWIEGERS *et al.*, 2005, FUKUDA *et al.*, 1998). A partir os compostos são produzidos em baixas concentrações porem podem apresentar um efeito sinérgico ou efeito *matrix*, contribuindo para formar um buquê sensorial agradável que contribui no sabor e aroma na bebida (SAERENS *et al.*, 2008). As rotas metabólicas dos compostos acima estão representadas na Figura 3.

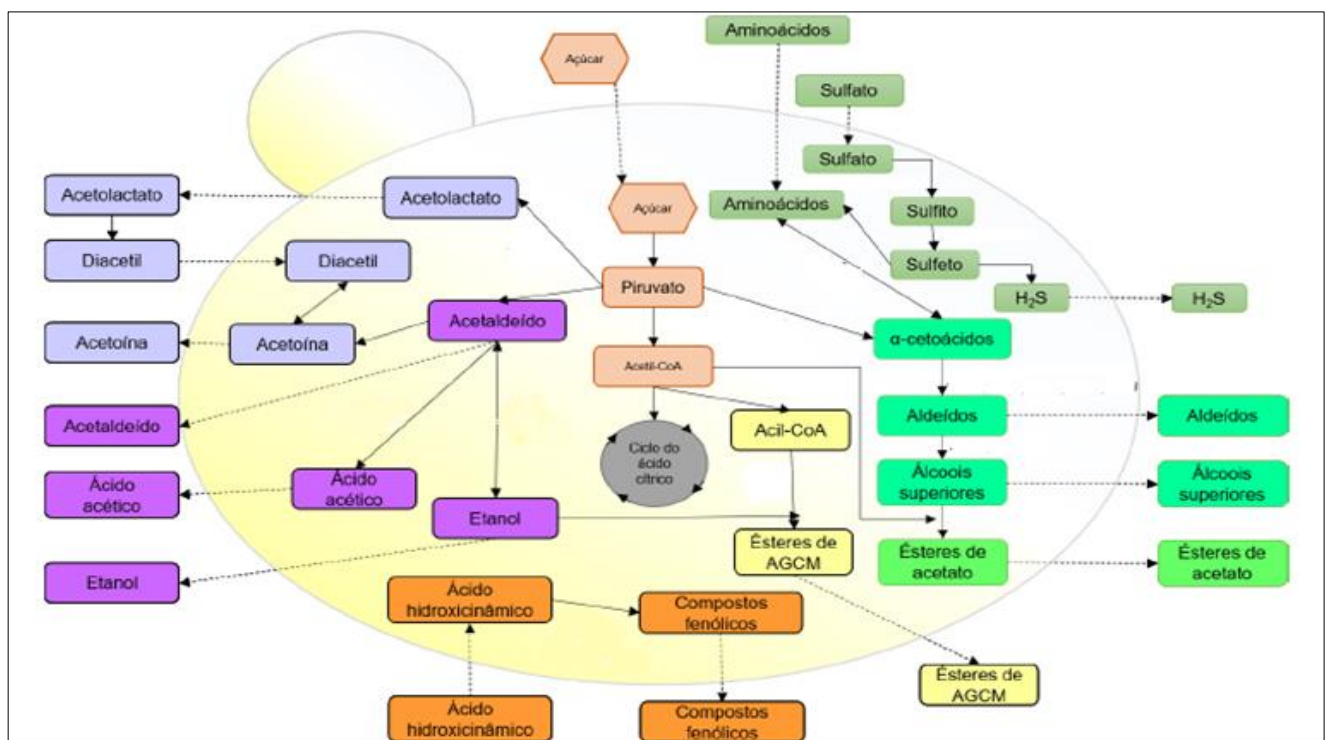


Figura 3: Rotas metabólicas simplificadas realizadas por leveduras na produção de metabólitos secundários responsáveis pelo sabor e aroma nas bebidas. Fonte: ARAUJO, 2018.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Selecionar leveduras de frutos e folhas nativos do Cerrado com capacidade de produção de cachaça e cerveja.

3.2 - Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente e selecionar leveduras isoladas dos frutos e folhas do Cerrado com potencial para produção de cachaça e cerveja com base em testes fisiológicos e bioquímicos
- Identificar as leveduras selecionadas por meio de sequenciamento do DNAr 28S;
- Diferenciar as cepas selecionadas por meio de polimorfismo molecular.

4- METODOLOGIA

4.1 - Isolamento das leveduras de frutos do Cerrado

As leveduras foram isoladas de 6 frutos: *Psidium firmum* (araçá); *Genipa americana* (jenipapo); *Passiflora setácea* (maracujá de veado); *Talisia esculenta* (pitomba); *Pouteria ramiflora* (curriola) e *Ananas comosus* (abacaxi do cerrado). Todas foram coletadas na zona rural da cidade de Grão Mogol, Minas Gerais. Também foram utilizadas como fonte de leveduras folhas da espécie *Stachytarpheta cassiae* S. Atkins (jurobão), colhidas no Parque Estadual Rio Pardo, localizado na cidade de Rio Pardo de Minas.

Os frutos e folhas estavam totalmente maduros, sem injúrias ou manchas e aptas para o consumo. Adiante, todo o material foi acondicionado em caixas de isopor, anotando suas respectivas coordenadas com auxílio de um Sistema de Posicionamento Global (GPS) e levados para o laboratório de Microbiologia do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - *Campus* Salinas. Esses materiais foram lavados superficialmente com água destilada para a retirada de impurezas e secos naturalmente. Após esse tratamento, foi retirado dos frutos uma fração 10 g, contendo casca e polpa e as folhas foram pesadas inteiras. Estas amostras de frutos e folhas foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo, depois transferidos para erlemeyers contendo 90 mL de água peptonada a 0,1% sob agitação de 1500 rpm por 30 min. O plaqueamento dessa solução foi realizada com diluição seriada até 10^{-3} em triplicata e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e dextrose a 2%), incubadas a 30° C por um período de 4 a 7 dias. As colônias crescidas nesses meios foram analisadas e selecionadas de acordo com suas características morfológicas. Por fim, os isolados foram incorporados a coleção do laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBCM) do Núcleo de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) que possui cadastro no sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético Tradicional Associado (SisGen).

4.2 - Caracterização morfológica das leveduras isoladas

As realizações das análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, *Campus* Salinas. Os isolados foram replicados e incubados em meio ágar YPD a 30 °C por 7 dias. As características macromorfológicas avaliadas foram: tamanho, forma, cor, superfície, borda, perfil e textura (DIAS *et al.*, 2010).

4.3 - Testes fisiológicos e bioquímicos para seleção de leveduras

Os testes fisiológicos e bioquímicos foram realizados no laboratório LBCM (UFOP). Esses testes têm a função de conhecer antecipadamente propriedades e comportamentos das leveduras selecionadas dentro do processo fermentativo.

4.3.1 - Crescimento em diferentes fontes de carboidratos

As leveduras isoladas foram incubadas em tubos de ensaio com o meio de cultura YPD, por 48 h, em incubadora (*New Brunswick Model G25*, USA), a 200 rpm a 30 °C. Após esse período, 200 µL de cada isolado foi transferido em triplicata para poços em placa de fundo chato. Essa placa foi denominada de “placa matriz”, servindo como fonte de leveduras para realizações dos testes. Para testar o crescimento das leveduras perante as fontes de carboidratos, foram preparados meios YP, complementados com 2% de cada carboidrato (glicose, maltose e sacarose). Diante disso, 200 µL de cada meio foram distribuídos, em triplicata, nos poços das placas do mesmo modelo da placa matriz. Um replicador de pontas com 96 pinos (Figura 4A) foi utilizado na transferência das leveduras entre a placa matriz para as placas com os meios testados. Na sequência, as placas com os distintos meios foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 24 a 72 h. O resultado do crescimento foi avaliado visualmente por turvação do meio (Figura 4B).

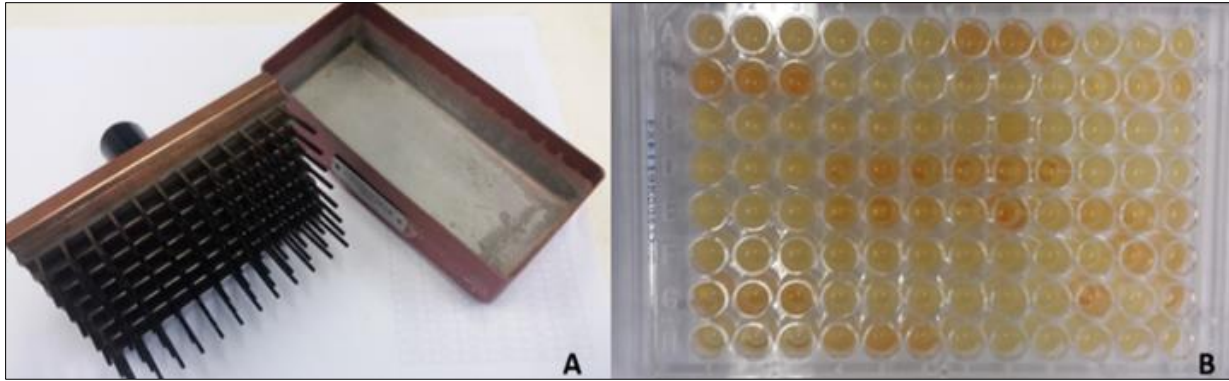


Figura 4: (A) replicador de pontas com 96 pinos, (B) placa com resultados após o crescimento nos meios testados com diferentes fontes de carboidratos

4.3.2 - Testes de capacidade de produção de compostos aromatizantes

Os testes relacionados a produção de compostos aromatizantes visam selecionar leveduras, que tenham potencial de produção de substâncias formadoras do aroma e sabor das bebidas. Com base nisso, os testes realizados foram: produção de H_2S , resistência as drogas 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL), cerulenina e fluoro-DL-fenilalanina (PFP).

4.3.2.1 - Teste de produção de H_2S

Os pré-inóculos foram incubadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de YPD a 200 rpm, 30 °C, por 48 h. Foram transferidos 10 μ L dessa suspensão, em triplicata, para as placas de Petri, contendo meio ágar sulfito de bismuto (Acumedia®). A metodologia utilizada foi *Spot-on-lawn*. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por 72 h. Como controle positivo foi utilizada a levedura *Candida albicans* ATCC18804 (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995 a; b). As leveduras que não produziram pigmentação escura são consideradas negativas.

4.3.2.2 - Teste de resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL)

Para realização deste teste, as leveduras foram incubadas em pré-inóculos em tubos de ensaio, contendo 3 mL de meio mínimo synthetic defined (SD), com 0,67% de yeast nitrogen base (YNB) e 2% glicose, a 30 °C, 200 rpm, por 48 a 72 h. Após o crescimento, 200 μ L de cada isolado foram transferidos, em triplicata, para os poços em placa de 96 furos de fundo chato sendo a placa matriz. Para verificar a resistência foi utilizado o mesmo meio SD, suplementando com 0,5 mM de 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL) Sigma®, distribuídos em triplicata, nas placas do mesmo modelo da placa matriz. A transferência

das leveduras foi realizada pelo replicador de 96 pinos. As placas foram para estufa a 30 °C por um período de 72 h. São consideradas resistentes as leveduras que cresceram no meio com o TFL (ASHIDA *et al.*, 1997).

4.3.2.3 - Teste de resistência a Cerulenina

Os pré-inóculos foram crescidos em tubos de ensaio com o meio YNB 0,17% sem aminoácidos com 1% de glicose. A transferência das leveduras seguiu os mesmos passos da metodologia anterior (4.4.2.2). A resistência foi verificada pelo crescimento das leveduras em meio suplementado com 25 µM de cerulenina (Sigma®) (ICHIKAWA *et al.*, 1991).

4.3.2.4 - Teste de resistência ao fluoro-DL-fenilalanina (PFP)

As leveduras foram incubadas em tubos de ensaio com o YPD, a 30 °C, a 200 rpm por 48 h. Após esse período, as cepas foram distribuídas em placas de Petri pelo método *Spot-on-lawn*, contendo o meio YNB 0,67% sem aminoácidos e sulfato de amônio (Sigma®), glicose 2%, ágar 2% e 1 mg/mL de fluoro-DL-fenilalanina (PFP) (Sigma®). Esse procedimento foi realizado em triplicata. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 30° C por 72 horas. São consideradas resistentes ao PFP as leveduras que se desenvolveram nesse meio de cultura (FUKUDA *et al.*, 1991).

4.3.3 - Teste de tolerância ao etanol

Os pré-inóculos foram incubados em tubos de ensaio com 3 mL do meio YPD, colocados em incubadora a 30 °C, a 200 rpm, por 48 h. Posteriormente, os isolados foram transferidos para os poços das placas de fundo chato, em triplicata, sendo esta a placa matriz. Dois meios testes YP foram preparados, distribuídos em triplicata e em placas do mesmo modelo da placa matriz, com diferentes fontes de carboidratos a 2% (um com sacarose o outro com maltose). Em cada fonte testada foram adicionadas diferentes porcentagens de etanol (PA), 10%, 15% e 20%. O processo de transferência ocorreu pelo replicador de 96 pinos da placa matriz para placa com meios testes. Após esse procedimento, as placas foram incubadas a temperatura de 30 °C por 72 h. Por fim, as leveduras que cresceram nessas condições foram consideradas tolerantes a porcentagem de etanol testada.

4.3.4 - Teste de resistência a estresse múltiplo (osmótico, alcoólico e térmico)

O pré-inóculo e a preparação da placa matriz seguiram a metodologia 4.3.3. O meio utilizado para verificar a resistência ao estresse foi YP com sacarose a 20% e suplementado com 10% de etanol (PA). As transferências das leveduras da placa matriz para as placas com o meio teste foram realizadas pelo replicador de 96 pinos. Depois as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por um período de 48 a 72 h. As leveduras que cresceram nesses poços foram consideradas resistentes ao estresse múltiplo (PATARO *et al.*, 2000).

4.3.5 - Teste qualitativo de floculação

As leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio com 4 mL de meio YPD, incubadas a 30 °C, a 200 rpm por 48 h. Após esse período, as leveduras foram homogeneizadas com auxílio de um vortex, à baixa rotação, por 5 segundos. A floculação foi observada visualmente após serem deixados em pé, em uma superfície plana e repouso, marcando o tempo com um auxílio de um cronômetro. Foi usado como parâmetro de referência levedura Nottingham (Lallemand®). O teste foi realizado em triplicata.

4.3.6 - Testes de fermentação

4.3.6.1 - Tubo de Durham invertido

Os pré-inóculos foram crescidos em tubos de ensaio com 3 mL de YPD, incubados a 30 °C, a 200 rpm, por 48 h. 10 µL do pré-inóculo. Após isso, foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo em seu interior 1 tubo de Durham invertido, 4 mL de meio YP com 2% de fonte de carbono a ser testado (glicose, sacarose, maltose). Esse procedimento foi realizado em triplicata. Os tubos foram incubados a 30 °C por 48 a 72 h. O resultado, deriva da observação da turvação do meio e formação de gás. A levedura W34/70 Foi utilizada como controle positivo. O resultado foi classificado em: (+++) ótima, quando o tubo de Durham estiver mais de dois terços vazio, (++) bom, quando o tubo de Durham estiver dois terços vazios, (+) regular, quando o tubo de Durham estiver com um terço vazio e negativo quando o tubo de Durham estiver totalmente preenchido pelo meio, como representado na Figura 5.

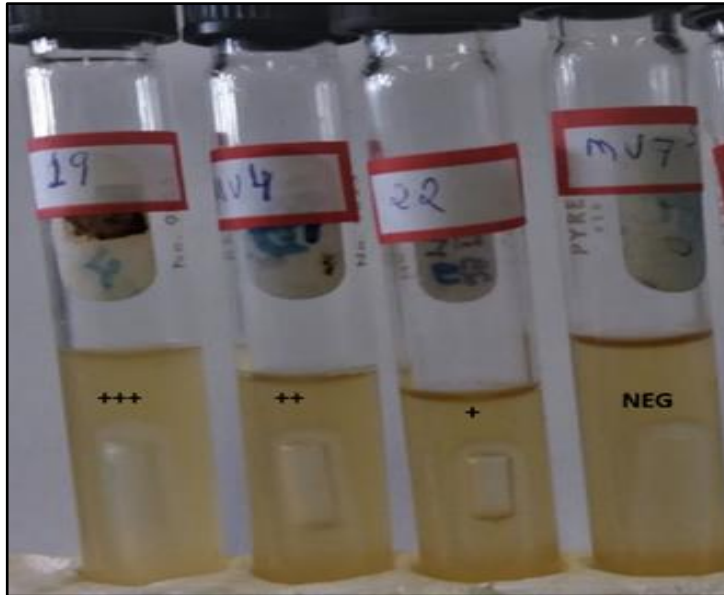


Figura 5: Escalas de resultados fermentativos em tubos de ensaio com tampa de rosca e tubo de Durham invertido: +++ (ótima), ++ (bom), + (regular) e NEG (não houve fermentação)

4.3.6.2 -Teste fermentativo na presença de antimicina

Os pré-inóculos foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio YPD, incubados a 30 °C, a 200 rpm, por 48 h. Essas leveduras foram distribuídas, em triplicata para as placas de 96 poços de fundo chato recebendo o nome de placa matriz. Cada teste foi formulado com o meio YP e uma diferente fonte de carboidrato a 2% (glicose, sacarose, maltose ou maltotriose), suplementado com 2 mg/L de antimicina (Sigma®). Esses meios foram distribuídos em placas, de mesmo modelo da matriz com as transferências de leveduras realizadas pelo replicador pontiagudo. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 72 h. Os isolados que crescerem na presença de antimicina são considerados resistentes (adaptado de CAMOUGRAND *et al.*, 1991).

4.4.7 - Teste de crescimento em diferentes temperaturas

Os pré-inóculos foram incubados utilizando meio YPD seguindo padrões das metodologias anteriores e distribuídas, em triplicata, para os poços da placa matriz. As leveduras dos pré-inóculos foram transferidas pelo replicador para placas do mesmo modelo da matriz, contendo meio teste YP 2% de glicose. Cada placa foi incubada nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 37 °C. A leitura do resultado foi realizada no intervalo de 48 a 72 h, sendo considerados positivos os isolados que apresentaram crescimento na temperatura testada.

4.5 - Identificação molecular das leveduras selecionadas

4.5.1 - Extração de DNA

A extração do DNA e demais metodologias moleculares foram realizadas no laboratório LBCM (UFOP). As leveduras selecionadas para produção de bebidas foram crescidas em tubos de ensaio, com 5 mL de meio YPD, incubados a 200 rpm, 30 °C por 48 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 5 min e seu sobrenadante descartado. No tubo foi adicionado 3 mL de água estéril e centrifugado novamente, na mesma velocidade anterior, fazendo isso em duplicata, desprezando novamente o sobrenadante. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de água estéril ultrapura e 200 µL de tampão (1 M sorbitol, 0,1 M de EDTA em pH 7,5), acrescido de 30 µL da enzima *litycase* (Sigma®). O tubo foi homogeneizado e incubado em estufa a 37 °C por 2 h. Ao terminar, adicionou mais 200 µL da solução II (50 mM Tris-HCl, 20 µL EDTA em pH 7,5) com 10 µL de SDS a 10%. O tubo foi homogeneizado em um vortex por 1 min e posteriormente deixado por 5 min em termobloco a 65 °C. Após, foi adicionado 160 µL de acetato de potássio a 5 M, acondicionado em gelo por 30 min. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, completando o volume inicial com isopropanol, deixado por mais 5 min em temperatura ambiente. O microtubo foi centrifugado novamente por 10 min, desprezando o sobrenadante. Adicionou-se álcool 70% e centrifugou por mais 10 min a 12.000 rpm. Em sequência o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado o separando do pellet formado, que foi secado em termobloco a 50 °C. Para finalizar foi adicionado 30 µL de água ultrapura nesse microtubo. Ao terminar a extração do DNA, o material foi quantificado e verificado sua qualidade (pureza), com o auxílio do equipamento *Nanodrop* (Thermo Fisher®). Por fim, houve o armazenamento do material em ultrafreezer a - 80 °C (López, 2001; com adaptações).

4.5.2 - Protocolo de amplificação da região 28S do DNAr.

Para identificação das leveduras selecionadas foi amplificada a região conservada do DNA ribossomal, D1/D2 do 28S, por reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação foi realizada no termociclador T100 – *Thermal Cycler* (Biorad®). Os iniciadores (*primers*) utilizados foram o NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) e NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG). A amplificação gerou um fragmento de

aproximadamente 600 pares de bases (pb) com volume final de 25 μ L. Para cada reação foi utilizado 2,5 μ L de tampão 10x, 0,75 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 0,5 μ L de dNTPs, 0,4 μ L de cada primer, 0,3 μ L da enzima Taq polimerase a 5 U/ μ L e 1 μ L de DNA molde com 400 ng, completando o restante do volume com água ultrapura. As condições da PCR foram de desnaturação inicial de 92 °C por 4 min, desnaturação de 92 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 5 min em 34 ciclos (SPERANDIO; DO VALE; MOREIRA, 2015).

Para confirmação das amplificações, 3 μ L dos produtos da PCR somados a mais 3 μ L de *loading buffer* foram transferidos para os poços em gel de agarose a 1% (p/v). Foi utilizado como padrão de peso molecular o marcador de DNA da Kasvi® de 1000 pb. O gel foi corado com *GelRed*® e revelado com um fotodocumentador que utilizou o programa *AlphaImager*®.

4.5.3 - Sequenciamento e construção da árvore filogenética

As regiões amplificadas foram sequenciadas pela metodologia de Sanger (SANGER; SEIFERT; COULSON, 1977), no equipamento modelo ABI3730, realizados pela empresa Myleus Facility, localizada na cidade de Belo Horizonte, MG. O envio das amostras respeitou o protocolo e as recomendações da empresa.

A qualidade dos sequenciamentos foi verificada observando a definição dos picos no eletroferograma. Foi utilizado o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) para tratamento das sequências, excluindo os ruídos iniciais e finais. Depois, foi utilizado o software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHL *et al.*, 1990) que comparou o sequenciamento das leveduras isoladas com a do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI. As sequências selecionadas do banco de dados foram as que apresentaram maior similaridade, maior cobertura e menor *e-value*. Para construção da árvore filogenética, foram incluídos outros sequenciamentos de leveduras de frutos do Cerrado, resultado do estudo de OLIVEIRA (2015). Para o alinhamento e produção da árvore filogenética foi usado o programa MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013), utilizando os parâmetros de máxima verossimilhança, modelo evolutivo Kimura-2 e teste de *bootstrap* com 1000 replicações. Ao sequenciamento da levedura *Schizosaccharomyces pombe* - GU319988 foi usada como grupo externo.

4.5.4 - Polimorfismo molecular das cepas selecionadas por amplificação COX1

Para identificar as diferenças moleculares entre as espécies selecionadas, foi realizado uma PCR de amplificação da região do gene mitocondrial *COX1*, responsável pela produção da enzima citocromo oxidase. A reação ocorreu no termociclador T100 – *Thermal Cycler (Biorad®)*, sendo utilizado como 4 iniciadores: 3L (GCTTTAATTGGWGGWTTTGG), 3R (ATTGTCATACCATTGTGTYCTYAT), 4L (GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA), e 5R (GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT). O volume final foi de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 2,5 µL de tampão 10x, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0,625 µL de dNTPs, 0,5 µL de cada primer, 0,5 µL da enzima Taq polimerase a 5 U/µL e 1,5 µL de DNA molde com 400 ng, completando o volume com água ultrapura. As condições da PCR foram de desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 51 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 5 min em 35 ciclos. Para confirmação das amplificações, foi transferido 5 µL do produto PCR mais 5 µL de *loading buffer* para os poços do gel de poliacrilamida a 8% (v/v). A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata a 12%. Foi utilizado como padrão de bandas o marcador de DNA da Sinapse® de 1000 pb (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização morfológica das leveduras isoladas dos frutos e folhas do cerrado

Dentre os frutos utilizados, no total, foram isoladas 37 colônias de leveduras, divididas em: 4 no abacaxi do cerrado, 4 no jenipapo, 1 na pitomba, 4 curriola, 8 no araçá e 11 no jurobão. Todos foram armazenados em meio YPD com glicerol 30% e congelados a 80 °C. As informações sobre a localização, quantitativo de isolados e identificação utilizada nesse estudo está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Informações gerais sobre os isolados obtidos nos frutos e folhas nativos do Cerrado mineiro utilizados neste trabalho

Frutos	Coordenadas geográficas	Isolados	Identificação Isolados
<i>Ananas comosus</i> (abacaxi do cerrado)	S 16° 29' 57.9" W 042° 57' 21.1" elev. 826 m	4	ABA (1,4, 5S, 5B)
<i>Genipa americana</i> (jenipapo)	S 16° 27' 17.8" W 043° 00' 19.0" elev. 797 m	4	JEN (2, 3, 5, 11)
<i>Passiflora setacea</i> (maracujá de veado)	S 16° 27' 56.7" W 042° 59' 28.9" elev. 851 m	4	MVC (3, 4, 7S, 7B)
<i>Talisia esculenta</i> (pitomba)	S 16° 29' 22.5" W 042° 57' 16.0" elev. 799 m	1	PIT (3)
<i>Pouteria ramiflora</i> (curriola)	S 16° 30' 12.8" W 042° 57' 16.0" elev. 799 m	5	ERC (1, 9, 10B, 10S, 16)
<i>Psidium firmum</i> (araçá)	S 16° 33' 34" W 042° 53' 23" elev. 829 m	8	ARA (1, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12)
<i>Stachytarpheta cassiae</i> S. Atkins (Jurobão)	S 15° 36' 3" W 42° 32' 40" elev. 794 m	11	JUR (5,9,10,11,14, 15,16,19,22,24,58)
Total de leveduras isoladas			37

Os resultados demonstraram que a maioria das leveduras eram de tamanho grande (86%), com forma circular (59%), de cor branca (78%), bordas lisas (84%), perfil lisa e convexa (86%) e textura cremosa (84%). A característica de superfície apresentou-se bem dividida, com 47% de estrias concêntricas e 53% estrias radiais. Todas as descrições morfológicas e as imagens das leveduras estão apresentadas na Figura 6 e no Anexo1.

As informações morfológicas devem ser interpretadas com cautela, servindo como um indicador de descrição de espécie. Apesar do meio YPD atender grande parte das necessidades biológicas de um grande espectro de espécies de leveduras, muitas possuem necessidades particulares e a falta de algum componente neste meio pode ser um limitante de crescimento ou ocasionar adaptações que modifiquem características morfológicas,

levando a erros de interpretações de espécies. Mesmo com as dificuldades citadas, atualmente, as características morfológicas são muito utilizadas para este fim (DIAS *et al.*, 2010).

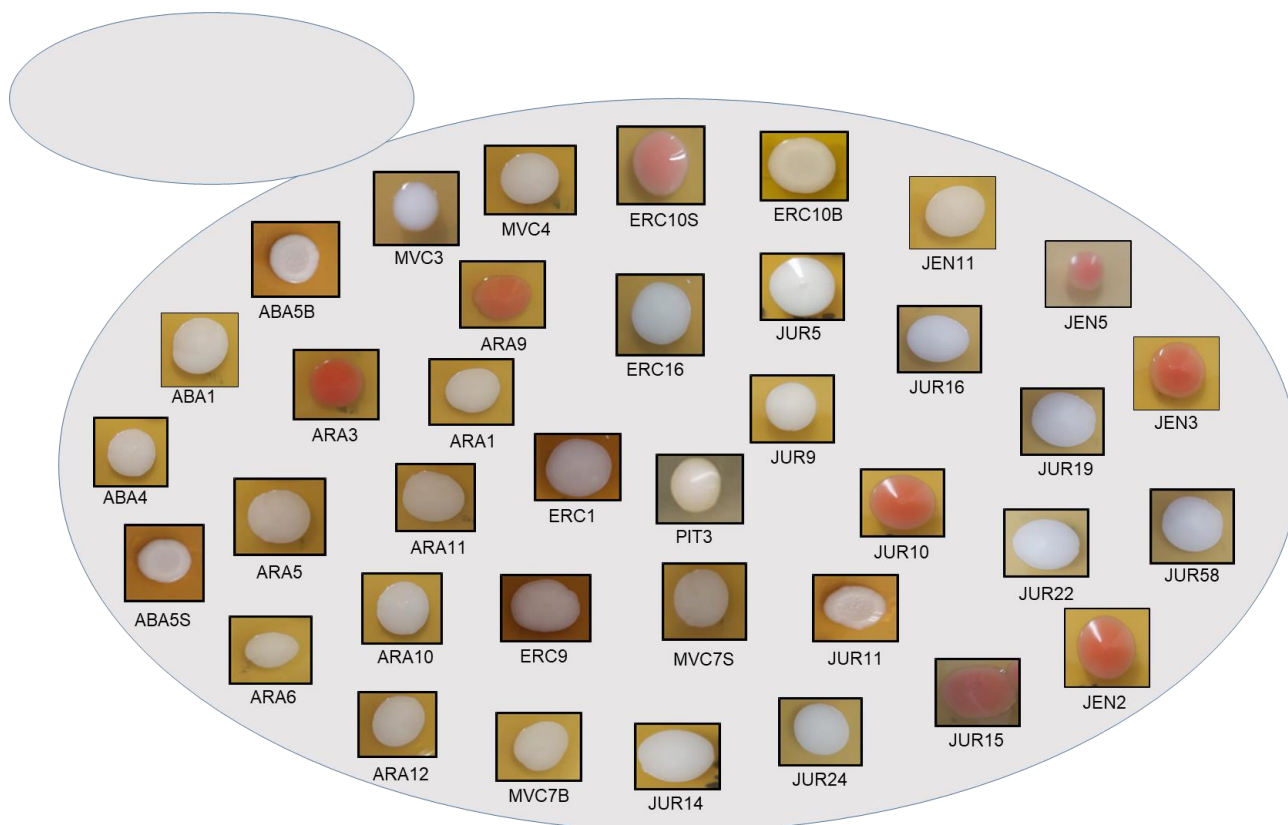


Figura 6: A imagem das 37 leveduras isoladas dos frutos e folhas do Cerrado de acordo com suas características macromorfológicas

Trabalhos de isolamento de leveduras com frutos do Cerrado mostraram a potencialidade de se encontrar diferentes espécies. Oliveira (2015) isolou e identificou 85 espécies de diferentes leveduras de 13 frutos nativos do Cerrado localizados na região Noroeste de Minas Gerais. Em outro trabalho, nessa mesma perspectiva, foram isoladas 9 espécies de leveduras dos frutos ingá e guavira (GRANDE, 2015). Ademais, em folhas dos frutos cagaita e murici do Distrito Federal foram identificadas 35 espécies leveduras (SPERANDIO; DO VALE; MOREIRA, 2015)

Geralmente representantes do grupo de leveduras basidiomicetos são encontrados na parte externa dos frutos. Elas possuem características adaptativas de proteção contra exposição de raios solares pela presença de pigmentos carotenóides e cápsulas polissacarídicas, que previnem contra ressecamento e a baixa umidade. Esse tipo de levedura é adaptado a metabolizar polissacarídeos mais elaborados, como a pectina,

celulose e hemicelulose, encontrados na parede celular vegetal (ATLAS, BARTHA, 1997, SLÁVIKOVÁ, VADKERTIOVÁ, 2003). Por outro lado, as leveduras do grupo dos ascomicetos são mais comuns e se adaptam melhor no interior dos frutos, ambientes com a presença predominante de açúcares mais simples, principalmente glicose e frutose. Suas colônias são geralmente de cores claras, como brancas ou beges.

A presença maior no quantitativo de isolados em folhas (11 no total), em comparação aos demais frutos (4 no abacaxi do cerrado, jenipapo, maracujá de veado, 1 na pitomba, 5 na curriola e 8 no araçá), pode ser explicada em virtude da maior presença e adaptação das leveduras as folhas, que se mostram presentes por todo ano. Os frutos são sazonais e seu tempo é mais curto em comparação com as folhas, ocasionando a diminuição do tempo de exposição as leveduras deste ambiente.

A relação entre a presença de leveduras em plantas pode ser benéfica para ambas, pois muitas cepas contribuem na produção de substâncias de crescimento e proteção contra invasores patogênicos (SPERANDIO; DO VALE; MOREIRA, 2015, IGNATOVA *et al*, 2013).

5.2 - Crescimento nas fontes de carboidratos

Os resultados do crescimento das leveduras em meios YP com diferentes fontes de carboidratos mostraram que as 37 leveduras foram capazes de crescer na presença de glicose, sacarose, maltose. Entretanto, as leveduras JEN2, ARA9, JUR14 e JUR22 não foram capazes de metabolizar maltotriose (Tabela 3).

Esses testes possuem grande importância, pois os carboidratos testados são comumente encontrados em diferentes concentrações nos mostos de cachaça e de cerveja. A cachaça é produzida a partir do caldo de cana que é formado por 17% de sacarose, 0,4% de glicose e 0,2% de frutose (LIMA *et al.*, 2012). O mosto cervejeiro é constituído de 10% de glicose e frutose, 6% de sacarose, 40% de maltose, 6% de maltorriose e 6% de outros tetrassacarídeos (SILVA, 2019). A capacidade de produção de álcool está diretamente ligada a capacidade das leveduras catabolizarem os carboidratos presentes no mosto (uma característica importante no momento de seleção). A Tabela 4 mostra os resultados dos testes com os diferentes carboidratos testados.

Tabela 3: Perfil de resposta bioquímica dos testes realizados relativos a produção de cerveja e cachaça das leveduras isolados de frutos e folhas do Cerrado Norte Mineiro

Nº ISOLADO	CARBOIDRATOS		AROMA			FLOCULAÇÃO		FERMENTAÇÃO						ESTRESSE		RESISTÊNCIA						TEMPERATURA ° C									
	SAC	MAL	H ₂ S	TFL	CERUL	PPP	DURHAM	DURHAM	DURHAM	DURHAM	GLIC	SAC	MAL	GLIC	SAC	MAL	GLIC	SAC	MAL	GLIC	SAC	MAL	GLIC	SAC	MAL	GLIC	SAC	MAL	GLIC	37	20
1 JEN2	P	P	N	R	R	R	N	(+++)	(++)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	
2 JEN3	P	P	P	R	R	S	P	(++)	(+++)	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	P	P	
3 JEN5	P	P	P	R	S	S	P	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	P	P	
4 JEN11	P	P	P	R	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
5 ABA1	P	P	P	N	R	S	P	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	P	P	
6 ABA4	P	P	P	R	R	S	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	P	P	
7 ABA5	P	P	P	R	R	R	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
8 ABA5B	P	P	P	N	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
9 MVC3	P	P	P	N	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
10 MVC4	P	P	P	P	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
11 MVC7B	P	P	P	P	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
12 MVC7S	P	P	P	P	R	S	P	(+)	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
13 ARA1	P	P	P	N	R	S	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
14 ARA3	P	P	P	N	R	S	P	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
15 ARA5	P	P	P	N	R	S	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
16 ARA6	P	P	P	N	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
17 ARA9	P	P	P	N	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
18 ARA10	P	P	P	P	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
19 ARA11	P	P	P	P	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
20 ARA12	P	P	P	P	R	S	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
21 PIT3	P	P	P	P	R	S	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
22 ERC1	P	P	P	P	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
23 ERC9	P	P	P	P	R	S	N	(+++)	(++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
24 ERC10B	P	P	P	P	R	S	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
25 ERC10S	P	P	P	P	R	S	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
26 ERC16	P	P	P	P	R	S	P	(+++)	(+)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
27 JUR5	P	P	P	P	R	R	P	(++)	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
28 JUR9	P	P	P	P	N	R	R	(++)	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
29 JUR10	P	P	P	P	N	R	R	(++)	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
30 JUR11	P	P	P	P	N	R	R	(++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
31 JUR14	P	P	P	P	S	R	S	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
32 JUR15	P	P	P	P	R	R	S	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
33 JUR16	P	P	P	P	N	R	R	(++)	(++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
34 JUR19	P	P	P	P	N	R	R	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
35 JUR22	P	P	P	P	N	R	R	N	(+)	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
36 JUR24	P	P	P	P	N	R	R	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P
37 JUR58	P	P	P	P	N	R	R	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	P

P = positivo, N = negativo, R = resistente, S = sensível,
 SAC = Sacarose, MAL = maltose, MALTOTRI = maltotriose, H₂S = ácido sulfídrico, TFL = 5,5,5-Trifluoro-D,L-leucina, CERUL = ceruleína, PFP = fluoro-DL-fenilalanina
 C/ANTIMIC = com antimicina, ESTR.SAC.ET = estresse sacarose e etanol

5.3 - Teste relacionados a produção de aromas (teste de resistência ao TFL, cerulenina, PFP e produção de H₂S)

No resultado relativo ao teste com presença de TFL, observou-se que três isolados foram sensíveis a droga: MVC7S; ARA12 e JUR14 e os 34 restantes foram resistentes. No teste com a cerulenina, 18 isolados não cresceram: JEN5, JEN11, ABA5B, MVC3, MVC4, MVC7S, MVC7B, ARA1, ARA5, ARA6, ARA10, ARA11, ARA12, PIT3, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16 e as 19 restantes foram positivos. Quanto ao teste de resistência ao PFP, 19 isolados apresentaram resistência: JEN2, JEN11, ABA5S, ABA5, MVC3, MVC4, MVC7B, ARA1, ARA6, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR16 e JUR19 e os 16 restantes apresentaram sensibilidade a droga. E por último, na produção de H₂S, 22 leveduras foram negativas: JEN2, JEN11, ABA1, ABA5S, ABA5B, MVC3, MVC7B, ARA1, ARA3, ARA5, ARA6, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR9, JUR10, JUR11, JUR16, JUR19, JUR22, JUR24 e JUR58 e as 15 restantes apresentaram diferentes níveis de positividade. Os resultados dos testes de aroma estão demonstrados na Tabela 3.

O alto índice de resultados positivos de crescimento diante da presença das drogas sugere três explicações: a primeira, essas leveduras possuem a característica de alta produção de metabólitos secundários relacionados aos aromas testados sendo uma característica das leveduras dos frutos folhas do Cerrado Mineiro, em segundo, a concentração usada da droga que pode ter sido baixa para esses tipos de leveduras testadas. A concentração utilizada na metodologia foi desenvolvida para espécies do gênero *Saccharomyces*, podendo ter ação limitada para as cepas selecionadas. E como terceira hipótese, as leveduras podem ter utilizado mecanismos presentes em seu perfil fisiológico para inativação da droga, como modulação genética, alteração de molécula alvo, mudanças de transportadores de membrana ou de rotas metabólicas (SHAPIRO, ROBBINS, COWEN, 2011).

5.4 - Teste de tolerância ao etanol em diferentes fontes de carboidrato

Nenhum dos isolados foi capaz de crescer na presença de 20% etanol, independentemente do carboidrato utilizado. No meio YP maltose, 22 isolados apresentaram resistência a concentração de 10% de etanol (JEN2, JEN3, JEN5, JEN11, ABA5S, MCV3, MCV4, MCV7B, MCV7S, ARA1, ARA9, ARA10, ARA11, ARA12, ERC1, ERC9, ERC10B, JUR5, JUR11, JUR16, JUR19 e JUR22) e 15 isolados foram sensíveis a

esta porcentagem de álcool (ABA1, ABA4, ABA5B, ARA3, ARA5, ARA6, PIT3, ERC10S, ERC16, JUR0, JUR10, JUR14, JUR15, JUR24 e JUR58). Na presença de 15% de álcool nesse meio, as leveduras resistentes foram JEN11, ARA9, ARA12, ERC10B, JUR11 e JUR16. As demais apresentaram sensibilidade não crescendo no meio. O YP sacarose, 20 isolados foram resistentes a concentração de 10% de etanol (JEN2, JEN3, JEN5, JEN11, ABA5S, MCV3, MCV4, MCV7B, ARA1, ARA10, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR10, JUR11, JUR16, JUR19 e JUR22) e as demais apresentaram sensibilidade (ABA1, ABA4, ABA5B, MVC7S, ARA3, ARA5, ARA6, ARA9, ARA12, PIT3, ERC10S, JUR9, JUR14, JUR15, JUR24 e JUR58). Na porcentagem de 15% de álcool no meio YP sacarose, apenas o isolado ERC1 apresentou resistência e os demais isolados foram sensíveis a essa quantidade de álcool. Todos os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

O álcool é um produto primário produzido pelo processo fermentativo, o trabalho eficaz da levedura na fermentação depende da sua resistência diante dessa substância. A presença do álcool pode ocasionar problemas na membrana celular nas leveduras, como a diminuição de fluidez de moléculas, modificando a capacidade de captação de glicose do meio externo para o interior celular, resultando baixo crescimento celular, diminuição da reprodução e da capacidade fermentativa (MONTEIRO *et al.*, 2016). Concentrações acima de 6% de etanol já são consideradas tóxicas para grande parte das leveduras (DING *et al.*, 2010).

5.5 - Teste de resistência ao estresse osmótico

No teste de resistência ao estresse, 11 isolados não apresentaram crescimento: ABA1, MVC7B, ARA1, ARA3, PIT3, ERC9, ERC16, JUR5, JUR9, JUR24 e JUR58 e os 26 restantes foram resistentes (Tabela 3). O teste de resistência ao estresse osmótico, visa conhecer o comportamento das leveduras em condições semelhantes ao que ocorre em dornas de fermentação. No processo diário de fabricação de cachaça, as leveduras são expostas a seguidas pressões osmóticas, devido ao teor alcóolico e a concentração de açúcares presentes nos mostos que se mantem elevadas por causa do reabastecimento contínuo de caldo de cana nas dornas. As cepas de produção de cachaça devem suportar estresse de temperatura a 37 °C, 8% de etanol e 20% de glicose (PATARO *et al.*, 2000). Resistir a esse conjunto de fatores é muito importante para que as leveduras iniciem e terminem bem o processo fermentativo para produção de cachaça.

5.6 - Teste qualitativo de floculação

Das 37 leveduras, 19 apresentaram capacidade floculativa muito baixa ou negativa (JEN2, ABA4, ABA5S, ABA5B, MCV4, ARA1, ARA5, ARA6, ARA9, ARA10, ARA12, PIT3, ERC9, ERC10S, ERC16, JUR9, JUR16, JUR22 e JUR58), dentro dos parâmetros estabelecidos na metodologia. Os 18 isolados restantes (JEN3, JEN5, JEN11, ABA1, ERC1, ERC10B, MVC3, MVC7B, MVC7S, ARA3, ARA11, JUR5, JUR10, JUR11, JUR14, JUR15, JUR19 e JUR24) tiveram resultados positivos (Tabela 3). A floculação muito rápida causa perda de rendimento na conversão de açúcar em etanol e CO₂ porque diminui o contato das leveduras com mosto (AMORIM *et al.*, 2005). Em contrapartida, a demora na sedimentação da massa celular prejudica e atrasa o processo de destilação na produção de cachaça além de aumentar o risco de contaminação. Com isso, a fermentação da cachaça em condições ideais é rápida, por volta de 16 a 24 h (ALCARDE, 2019; CARDOSO, 2013). Nesse sentido, a destilação deve ser feita com o sobrenadante do vinho produzido no processo fermentativo após a sedimentação das leveduras. A demora deste processo provoca a proliferação de bactérias que irão prejudicar a qualidade do destilado e dificultar a limpeza dos equipamentos (LUDWIG *et al.*, 2001). Atualmente, a grande maioria dos alambiques não possuem centrífugas, por serem equipamento muitos caros e a separação das leveduras ocorrem de forma natural pelo processo floculativo. Nas cervejas a importância da floculação está ligada a clarificação da bebida, deixando-a com aparência mais límpida e atrativa ao consumidor.

5.7 - Resultados de testes fermentativos

5.7.1 - Fermentação com tubos de Durham

Os resultados dos testes fermentativos realizados com tubos de Durham invertido foram: em YP glicose com 23 leveduras positivos (JEN2, JEN11, JEN11, ABA5S, ABA5B, MCV3, MCV4, MCV7B, MCV7S, ARA1, ARA6, ARA10, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC10S, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR16 e JUR19) e 14 resultados negativos (JEN5, ABA1, ABA4, ARA3, ARA5, ARA9, ARA12, PIT3, JUR10, JUR14, JUR15, JUR22, JUR24 e JUR58). Em YP sacarose 22 leveduras apresentaram resultados positivos (JEN2, JEN3, JEN11, ABA5S, ABA5B, MCV3, MCV4, MCV7B, ARA1, ARA5, ARA10, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC10S, ERC16, JUR5, JUR11, JUR16, JUR19 e JUR22) enquanto 15 foram negativas (ABA1, ABA4, MVC7S, ARA3, ARA5, ARA9, ARA12, PIT3, JUR9, JUR10,

JUR14, JUR15, JUR24 e JUR58). Em YP maltose, todas as leveduras apresentaram respostas negativas (Tabela 3).

Conhecer as respostas fermentativas diante dos principais carboidratos presentes no mosto de cachaça e cerveja é muito importante. Pois, eles são os principais substratos a serem catabolizados em vias glicolíticas e fermentativas com resultado a produção de álcool, CO₂ e substâncias secundárias-substâncias formadoras das bebidas (FARIA-OLIVEIRA *et al.*, 2013). A presença da sacarose no mosto de cachaça equivale a aproximadamente 17% enquanto de glicose 0,4% (LIMA *et al.*, 2012). Paralelo a isso, no mosto cervejeiro, 10% e constituído de glicose e frutose, 6% de sacarose e mais de 40% de maltose (SILVA, 2019).

A presença do carboidrato com a levedura não garante sua metabolização. Para que isso ocorra há necessidade de transportadores específicos na membrana plasmática para que o substrato (carboidrato) consiga entrar na célula para ser utilizado (HORÁK, 2013; MACHADO, 1998; BISSON *et al.*, 1993). Com base nisso, a glicose e frutose são fontes preferidas e primárias a serem absorvidas pelas leveduras enquanto tiverem presentes no mosto e sua alta concentração causa repressão a outros transportadores intracelulares, presentes na membrana plasmática, diminuindo o acesso a outras fontes energéticas. Somente após grande parte do consumo da glicose, se inicia o processo de interiorização dos outros carboidratos (HORAK, 2013). Um dos motivos do resultado negativo da maltose em todos os isolados, pode ser em virtude da falta de contato do carboidrato com as leveduras isoladas. A maltose não é encontrada livremente no meio ambiente, sendo um carboidrato produzido por ação de enzimas que quebram cadeias mais complexas, como o amido, em moléculas mais simples. Em cervejas, essas enzimas estão presentes nos grãos malteados. As mais importantes são α e β amilases que quebram as cadeias mais complexas do amido, produzindo a maltose, presente no mosto cervejeiro (VENTURINI FILHO, 2018, SENAI, 2014, EVANS *et al.*, 2005). Como essa fonte energética não é normalmente encontrada nos frutos (LIMA *et al.*, 2012), as leveduras presentes nesse ambiente podem não ter desenvolvido mecanismos relacionados a absorção desse carboidrato ou mesmo uma rota metabólica capaz de utilizar este carboidrato e converter em energia (MENESES, JIRANEK, 2002). Como dito anteriormente, as leveduras têm maior preferência pela glicose e frutose, presentes em maior concentração nos frutos. Arruda e colaboradores (2016) quantificou carboidratos separadamente em araticum (*Annona crassiflora Mart.*), um fruto típico do Cerrado, e verificou baixa presença de maltose em

comparação aos outros carboidratos. A concentração foi de 12,39 mg/g em peso seco e maltotriose 0,69 mg/g em peso seco, bem abaixo da glicose com 125,92 mg/g em peso seco e frutose com 132,91 mg/g em peso seco.

5.7.2 - Testes fermentativos na presença de antimicina

O teste de capacidade fermentativa em meio YPD complementados com antimicina mostrou que 33 isolados apresentaram resistência (JEN2, JEN11, ABA5S, ABA5B, MCV3, MCV4, MCV7B, MCV7S, ARA1, ARA3, ARA5, ARA6, ARA9, ARA10, ARA11, ARA11, ARA12, PIT3, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC10S, ERC16, JUR5, JUR9, JUR10, JUR11, JUR14, JUR15, JUR16, JUR19, JUR22, JUR24 e JUR58) e 4 foram sensíveis (JEN3, JEN5, ABA1 e ABA4). O meio YP sacarose com antimicina, 25 isolados foram resistentes (JEN2, JEN11, ABA5S, ABA5B, MVC3, MVC4, MVC7B, MVC7S, ARA1, ARA3, ARA6, ARA10, ARA11, PIT3, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR14, JUR16, JUR19 e JUR24) e 12 sensíveis (JEN3, JEN5, ABA1, ABA4, ARA5, ARA9, ARA12, ERC10S, JUR10, JUR15, JUR22 e JUR58). Em YP maltose complementado com antimicina, 22 isolados foram resistentes (JEN2, JEN11, ABA5S, ABA5B, MVC3, MVC4, MVC7B, ARA1, ARA3, ARA6, ARA10, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR14, JUR16 e JUR19) e 15 sensíveis (JEN3, JEN5, ABA1, ABA4, MVC7S, ARA5, ARA9, ARA12, PIT3, ERC10S, JUR10, JUR15, JUR22, JUR24 e JUR58). Na última avaliação em YP maltotriose com antimicina, 21 foram resistentes (JEN2, JEN11, ABA5S, ABA5B, MVC3, MVC4, MVC7B, ARA1, ARA3, ARA6, ARA10, ARA11, ERC1, ERC9, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR16 e JUR19) e 16 sensíveis (JEN3, JEN5, ABA1, ABA4, MVC7S, ARA5, ARA9, ARA12, PIT3, ERC10S, JUR10, JUR14, JUR15, JUR22, JUR24 e JUR58 (Tabela 3).

Esse teste tem a função de compreender como as leveduras isoladas se comportam na via fermentativa, utilizando as fontes de carboidratos encontradas nos mostos da cachaça e cerveja. A ação da antimicina bloqueia o Complexo III da cadeia transportadora de elétrons, inviabilizando o processo aeróbico de obtenção de energia celular. Os resultados fermentativos de alguns isolados no meio utilizando a antimicina divergiram dos encontrados no outro teste fermentativo realizado (teste de Durham), principalmente quando a fonte de energia utilizada foi a maltose. Esse fato pode estar relacionado com a capacidade de algumas leveduras de usarem uma via alternativa na cadeia transportadora de elétrons, contornando o Complexo III inativado pela antimicina. Com isso é produzida

uma menor quantidade de energia celular, porém permite a viabilidade celular da levedura (VEIGA et al., 2000). Outras possíveis explicações para o alto índice de resistência a droga seria a concentração utilizada nos testes, visto que o teste foi desenhado para o gênero *Saccharomyces* e mecanismos de escape presentes na fisiologia das leveduras testadas que podem retirar a antimicina da sua célula (SHAPIRO, ROBBINS, COWEN, 2011).

5.8 - Teste de crescimento em diferentes temperaturas

Todos as leveduras testadas apresentaram crescimento entre as temperaturas de 10 °C e 30 °C. Em 37 °C, 20 cepas não apresentaram crescimento (JEN2, JEN3, JEN5, JEN11, ABA1, ABA4, MVC7S, ARA3, ARA5, ARA9, ARA12, PIT3, ERC1, ERC9, JUR10, JUR15, JUR16, JUR22, JUR24 e JUR58), as demais leveduras cresceram nesta temperatura (ABA5S, ABA5B, MVC3, MVC4, MVC7B, ARA1, ARA6, ARA10, ARA11, ERC10B, ERC16, JUR5, JUR9, JUR11, JUR14 e JUR19). Todos resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Os resultados de crescimento das leveduras nas temperaturas testadas mostraram amplitude de crescimento que se enquadram nas faixas de temperaturas normalmente utilizadas na fermentação de cachaça, que ficam entre 28 a 32 °C (ALCARDE, 2017, CARDOSO, 2013) quanto a das cervejas, que está entre 12 a 30 °C (SILVA, 2019). A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na fermentação e está relacionada ao metabolismo das leveduras, influenciando o resulta final na bebida. Outro fator importante foi a plasticidade de crescimento das leveduras nas temperaturas testadas, porque grande parte das fermentações realizadas nos alambiques brasileiros ocorrem em temperatura ambiente. É valido ressaltar que o Brasil é um país continental e possui grande variação de temperatura entre uma região a outra. Sendo assim, a falta de controle na temperatura pode ocasionar problemas no rendimento na fabricação da bebida e produção de *off flavours*, diminuindo a qualidade do produto.

5.9 - Seleção das leveduras para produção de cerveja e cachaça.

Os testes bioquímicos foram organizados em uma tabela (Tabela 3), com a finalidade de visualizar e avaliar as respostas das leveduras diante dos testes bioquímicos para a escolha dos isolados que apresentarem o melhor conjunto de respostas bioquímicas vantajosas para produção de cachaça e cerveja. Assim, as características observadas foram: crescimento nas fontes de carboidratos (glicose, sacarose, maltose e maltotriose);

produção negativa de H₂S; fermentação positiva nos testes com tubos de Durham invertidos, crescimento diante da antimicina; resistência ao estresse osmótico e a presença de etanol; crescimento dentro das faixas de temperaturas testadas

Dentre os 37 isolados, 4 foram selecionadas para produção das bebidas: as leveduras ERC10B, JEN11, JUR11 e JUR16 (Tabela 4). As capacidades floculativas foram positivas nas leveduras JUR11, ERC10B e JEN11. Apesar da JUR16 apresentar baixa floculação (característica que prejudica e atrasa o processo de fabricação da cachaça), ela foi escolhida por apresentar um conjunto de resultados favoráveis a produção de cervejas, em que as leveduras apresentam essa condição floculativa, como por exemplo as cepas utilizadas nas fabricações das cervejas do estilo Weiss e Witbeer.

Quanto a capacidade de resistência a presença do etanol, as 4 leveduras apresentaram respostas diferentes as concentrações testadas. Todas foram resistentes em meios suplementados com 10% de etanol. Em 15% de etanol em YP maltose as 4 leveduras também foram resistentes; já em YP sacarose com 15% de etanol, apenas a ERC10B apresentou crescimento. Na exposição a 20% de etanol em todos os meios, todas as cepas se mostraram sensíveis, não havendo crescimento. Na avaliação da temperatura, as 4 leveduras apresentaram crescimento entre 10 a 30 °C, e as cepas ERC10B e JUR11 também a 37 °C.

Nos testes relativos a produção de substâncias ligadas aos aromas e sabores, as leveduras selecionadas apresentaram diferentes respostas. As 4 cepas foram resistentes ao TFL e PFP e não produziram H₂S. A produção de H₂S pelas leveduras é uma característica importante pois essa substância influencia negativamente o sabor e aroma das bebidas, mesmo presente em baixas concentrações. Nas cervejas ou cachaças podem produzir um aroma e sabor indesejável (off-flavour) que remete a lembrança de ovo podre (WHITE, ZAINASHEFF, 2020, SWIEGERS *et al.*, 2005). O TFL é um análogo do aminoácido L-leucina. Quando presente dentro da célula inibe a ação da enzima α -Isopropilmalato sintase (α -IPM) que controla duas vias metabólicas: a de formação da L-leucina (aminoácido) ou de dois voláteis secundários: a do álcool isoamílico e acetato de isoamila, ambos responsáveis pelos aromas frutados, adocicados e de frutas amarelas a exemplo da banana. Como o TFL é um análogo a um aminoácido, ele é incorporado fazendo parte da construção das proteínas que são defeituosas e sem ação metabólica. Por esse motivo, a levedura não sobrevive ficando suscetível a droga. Leveduras resistentes ao TFL possuem uma mutação que não permite o controle feedback da enzima α -IPM e por isso tem o maior fluxo da via de produção da leucina, permitindo a sobrevivência das cepas. Como a enzima também controla as outras vias de produção de álcool isoamílico e acetato de isoamila também há uma maior produção destes

voláteis, refletindo em uma maior presença nas bebidas (SOUZA *et al.*, 2012 e OBA *et al.*, 2006). Em relação ao PFP, leveduras resistentes possuem um mecanismo de aumento da ação da enzima 3-desoxi-D-arabinoheptulosonate 7-fosfato sintase (DAHP sintetase) produzindo maior concentração de ácido corismático. Esse substrato recebe a ação da corismate mutase produzindo o prefenato. A enzima prefenato hidratase age no prefenato aumentando a produção de fenilalanina e o feniletanol, que reflete em um aroma de rosas nas bebidas, característica muito apreciada pelos consumidores (FUKUDA *et al.*, 1990). No teste com a presença de cerulenina, as leveduras JUR11 e ERC10B apresentaram sensibilidade enquanto a JUR16 e JEN11 resistência. O mecanismo de ação da cerulenina é bem parecido com a do TFL. A droga inibe a ação da ácido graxo sintetase, enzima chave na formação de ácidos graxos que modificam a quantidade de carbonos presentes na sua cadeia, em consequência do seu comprimento, formando ácidos graxos de cadeia curta. Leveduras que apresentam resistência a essa droga tem maior produção de ácidos graxos, o que aumenta a possibilidade de se acumularem ésteres de etila, volátil secundário que contribui no sabor frutado da bebida (ARIKAWA *et al.*, 2000).

Nos testes fermentativos em tubo de Durham invertido e resistência a antimicina com as fontes glicose e sacarose, as 4 leveduras apresentaram resultados positivos. Porém na presença da maltose, os testes fermentativos com o tubo Durham invertido os resultados foram negativos. Por não apresentarem a capacidade de fermentar maltose, as leveduras selecionadas foram direcionadas para produção de cervejas de baixo teor alcóolico, chamadas NAB/LAB (*No Alcohol Beer* e *Low Alcohol Beer*). A principal característica procurada nas leveduras para produção deste tipo de cerveja é a incapacidade de fermentar maltose (principal carboidrato encontrado no malte de cevada) e, por outro lado, metabolizar outros tipos de açúcares como glicose, sacarose ou maltotriose, por exemplo. Estes estão presentes em menores proporções no mosto cervejeiro.

As demandas de produção para as NAB/LAB veem aumentado em todo mundo, por vários motivos: saúde, leis mais rigorosas no trânsito e influências religiosas (VENTURINI FILHO, 2018, MÜLLER, *et al.*, 2017, O'SHEA *et al.*, 2010, BOFFETTA *et al.*, 2006). Para produção de cervejas com essas características são necessários equipamentos de alto valor econômico. O processo de retirada do álcool é complexo e ainda diminui o sabor e aroma da bebida. Leveduras com as características metabólicas apresentadas pelas leveduras selecionadas desse estudo podem dispensar estes equipamentos, além de produzirem uma cerveja singular com marcante presença de aromas e sabores.

Tabela 4: Resultados bioquímicos das 4 leveduras selecionadas para produção de cachaça e cerveja

ISOLADO	CARBOIDRATOS			AROMA				FLOCULAÇÃO	FERMENTAÇÃO								ESTRESSE SAC.ET.10%	RESISTÊNCIA						TEMPERATURA °C		
	SAC	MAL	MALTOTRI	H ₂ S	TFL	CERUL	PFP		DURHAM GLIC	DURHAM SAC	DURHAM MAL	ANTIMI GLIC	ANTIMI SAC	ANTIMI MAL	ANTIMI MALTO.	MAL ET.10%		MAL ET.15%	MAL ET.20%	SAC ET.10%	SAC ET.15%	SAC ET.20%	37	20	10	
JEN11	P	P	P	N	R	S	R	N	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	N	N	N	P	P	
ERC10B	P	P	P	N	R	S	R	P	(+++)	(+++)	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	N	N	P	P	P	
JUR11	P	P	P	N	R	R	R	P	(++)	(+++)	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	N	N	P	P	P	
JUR16	P	P	P	N	R	R	R	N	(++)	(++)	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	N	N	N	P	P	

P = positivo, N = negativo, R = resistente, S = sensível,

SAC = Sacarose, MAL = maltose, MALTOTRI = maltotriose, H₂S = ácido sulfídrico, TFL = 5,5-Trifluoro-D,L-leucina, CERUL = cerulelina, PFP = fluoro-DL-fenilalanina

C/ANTIMIC = com antimicina, ESTR.SACAR.ET = estrese sacarose e etanol

5.10 - Identificação das leveduras selecionadas por sequenciamento

Após a seleção das características das leveduras para produção da cachaça e cervejas, foram extraídos os seus DNAs. A razão de pureza do material genético foi mensurada, ficando dentro dos padrões exigidos de relação de absorvância 260/280, entre 1,8 a 2,0, (AZEVEDO *et al.*, 2003). Com esse material foi realizado um sequenciamento na região D1/D2 do DNAr com a metodologia Sanger. O tamanho deste fragmento é de aproximadamente 600 pb (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). As verificações da qualidade dos sequenciamentos foram realizadas por análises nos seus eletroferogramas.

As sequencias da região D1/D2 do DNAr foram submetidas ao alinhamento no banco de dados do NCBI, sendo considerado os parâmetros descritos anteriormente na metodologia. A JUR11, JUR16, ERC10B e JEN11 corresponderam as sequencias LC415310.1 e MH472655.1. A JUR11 apresentou 99,62% de identidade e as demais 100%. As coberturas de alinhamento para todos os isolados selecionados foram de 100% entre as sequencias do banco de dados e todos os *E-value* foram 0.0 (parâmetro de possibilidade de encontrar uma sequência por acaso no banco de dados). Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados de comparação dos sequenciamentos da região D1/D2 28S das leveduras selecionadas com sequencias do banco de dados nos parâmetros de qualidade: similaridade (**Match**), relação de identificação (**ID**), confiabilidade do alinhamento (**E-value**) e similaridade (**Query cover**)

FRUTO	CODIGO	ESPÉCIE	GENBANK MATCH	ID (%)	E-VALUE	QUERY COVER (%)
<i>Stachtarpheta cassiae</i> S. Atkins (jurobão)	JUR11	<i>Meyerozyma caribbica</i>	LC415310.1	99,62	0.0	100
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MH472655.1	99,62	0.0	100
	JUR16	<i>Meyerozyma caribbica</i>	LC415310.1	100	0.0	100
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MH472655.1	100	0.0	100
<i>Pouteria ramiflora</i> (curriola)	ERC10B	<i>Meyerozyma caribbica</i>	LC415310.1	100	0.0	100
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MH472655.1	100	0.0	100
<i>Genipa americana</i> (jenipapo)	JEN11	<i>Meyerozyma caribbica</i>	LC415310.1	100	0.0	100
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MH472655.1	100	0.0	100

Com essas sequencias e as demais adicionadas do estudo de Oliveira (2015) foi construída uma árvore filogenética. O resultado mostrou o agrupamento das sequências correspondidas no banco de dados (Tabela 5) mesmo clado (Figura 7), com similaridade acima de 99% com espécies do gênero *Meyerozyma* não conseguindo discernir entre as espécies *Meyerozyma caribbica* e *Meyerozyma guilliermondii*.

Meyerozyma caribbica é um basônimo de *Pichia caribbica* e a *M. guilliermondii* de *Pichia guilliermondii*. As leveduras do gênero *Meyerozyma* são cosmopolitas e podem ser encontradas em vários ambientes como plantas, frutos, cana de açúcar, solos, insetos e animais (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). Atualmente, esse gênero vem despertando o interesse de micologistas que descobriram várias aplicações biotecnológicas em biorremediação (AMORIM *et al.*, 2018), produção de biocombustível 2º geração (WANG *et al.*, 2011), biocontrole industrial (HASHEM *et al.*, 2011) e antimicrobianos (ZHAO *et al.*, 2010).

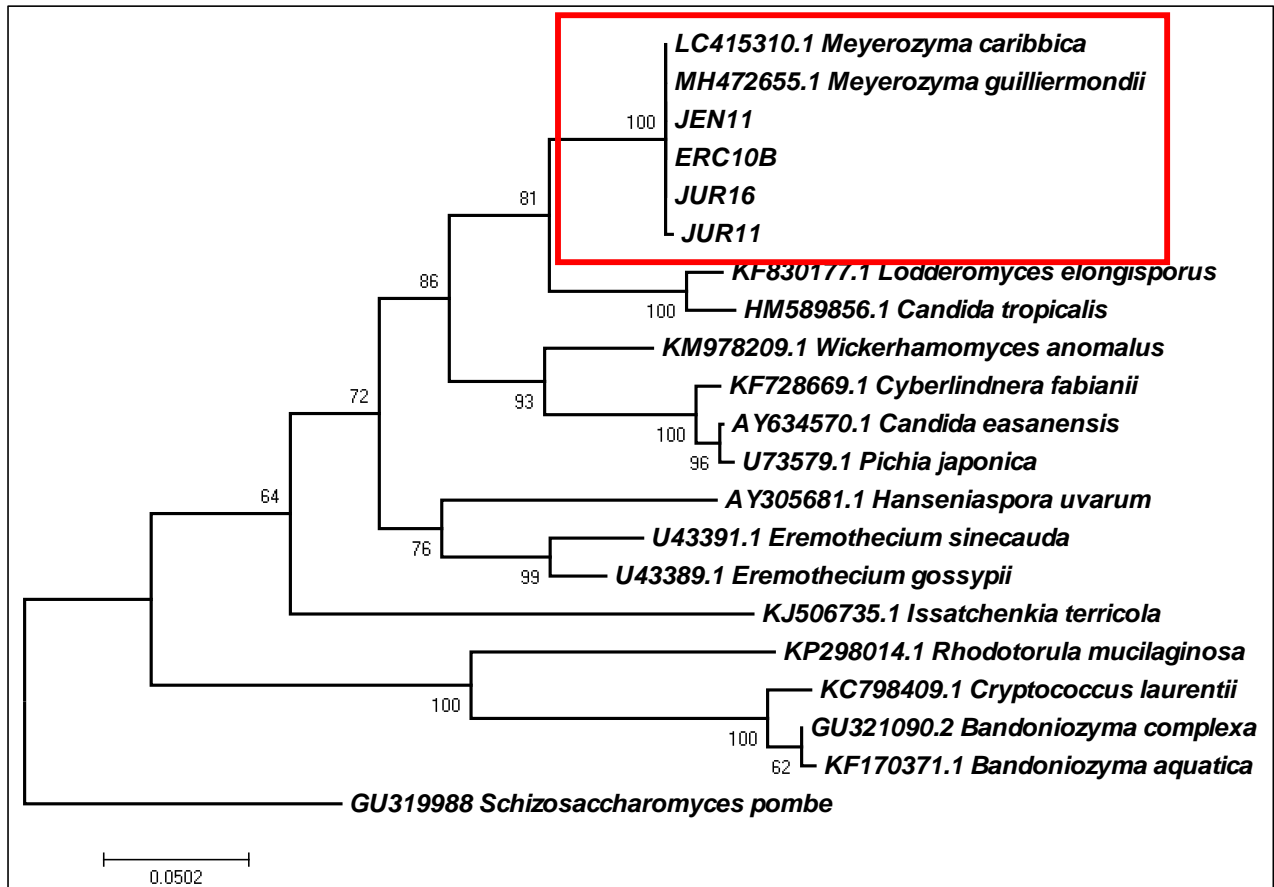


Figura 7: Análise filogenética utilizando o alinhamento das sequências das regiões D1/D2 das leveduras selecionadas com as do banco de dados NCBI produzidas pelo programa Mega 6 com os parâmetros de máxima verossimilhança, modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e confiabilidade por teste de *bootstrap* com 1000 replicações

A dificuldade na diferenciação entre essas duas espécies já foi relatada por Romi e colaboradores (2014). Segundo os autores, a proximidade entre seus genomas prejudica a diferenciação entre as espécies, mesmo usando marcadores filogenéticos tradicionais como o ITS, 28S E 18S do DNAr. Métodos tradicionais e morfológicos também apresentam dificuldades em discernir uma espécie da outra. Kurtzman e colaboradores (2010), realizaram 38 testes bioquímicos entre essas duas espécies e compararam os resultados entre si e verificaram que a única diferença encontrada foi que a *M. caribbica* cresce a 42 °C e a *M. guilliermondii* até 37 °C. Esse teste foi realizado porém nenhum dos isolados selecionados cresceram a 42 °C. Não podemos afirmar que todos pertencem a espécie *M. guilliermondii* pois os isolados podem ter se adaptado as temperaturas encontradas no Cerrado, que são mais amenas e não ultrapassam da média de 27 °C (ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Conhecer, entender e identificar leveduras não convencionais e aplicá-las na produção de bebidas tem sido uma procura entre pesquisadores e produtores de bebidas. A partir da década de 80, novas publicações utilizando esses tipos de leveduras vem ocorrendo,

demonstrando que elas não são apenas contaminantes, mas fazem parte dos microrganismos que fermentam e contribuem na formação de novos sabores e aromas (GSCHAEDLER *et al.*, 2017). Um exemplo clássico dessa aplicação acontece no México, no qual existem dois tipos de produção de tequilas (destilado a base de agave azul). Nesse sentido, em pequenas destilarias se utiliza um conjunto de leveduras selvagens (que podem ser consideradas não convencionais) isoladas da própria agave para produção da tequila. Por outro lado, em empresas de maior porte, a fermentação é realizada com leveduras selecionadas, a *S. cerevisiae* (LACHANCE *et al.*, 1995). As tequilas produzidas com esses diferentes microrganismos apresentam respostas sensoriais bem distintas umas das outras. O mesmo ocorre no Brasil. Na produção de cachaças artesanais, muitos produtores costumam usar os chamados fermentos caipiras (produzidos a partir de leveduras selvagens presentes na própria cana de açúcar) para produção de cachaça e outros utilizam leveduras selecionadas da espécie *S. cerevisiae*.

Na fabricação de vinhos, o início das fermentações é realizado com vários gêneros de leveduras não *Saccharomyces*, como: *Cândida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspota*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*. Essas leveduras são encontradas nas próprias frutas e tem importante participação na formação dos aromas e sabor do vinho (DA-SILVA *et al.*, 2015).

Em cervejas do tipo *lambic*, as leveduras *Dekkera bruxellensis* são responsáveis por grande parte da formação do aroma e sabor das cervejas tipo *Gueuze beer* (SCHIFFERDECKER *et al.*, 2014).

5.11- Análise do polimorfismo molecular das leveduras selecionadas

O resultado do polimorfismo molecular (Figura 8), mostrou que das 4 leveduras selecionadas, a JUR11, JUR16 e JEN11 apresentaram o mesmo perfil polimórfico enquanto a ERC10B apresentou um polimorfismo diferente. Essa metodologia já foi usada por López e colaboradores (2003), para monitorar prevalência de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* inoculadas na produção de vinhos e diferenciar das leveduras selvagens encontradas naturalmente no mosto ao final da fermentação vinda das próprias uvas.

Os frutos e folhas foram coletados na mesma região com as mesmas condições climáticas e ambientais. No estudo de O'Donnell *et al* (2007), analisando e comparando

comunidades microbianas de diferentes locais sugere que quando se apresentam nas mesmas condições ambientais elas compartilham estruturas e composição semelhantes se adaptando ao ambiente. Isso pode ter refletido nas características morfológicas tão próximas entre os isolados selecionados mesmo que a ERC10B apresente um perfil polimórfico diferentes das demais leveduras. Uma explicação de se encontrar 3 linhagens iguais em diferentes lugares (fruto jenipapo (JEN11) e folha jurobão (JUR11 e JUR16), é o mecanismo de dispersão destas leveduras. Primeiro elas pertencem ao mesmo ambiente, segundo as leveduras podem utilizar vetores naturais como vento, água e insetos polinizadores de frutos (SANTOS et al., 1996) e colonizar frutos ou outras partes das plantas. A figura mostra os perfis polimórficos das 4 leveduras selecionadas dos 6 frutos e folhas do Cerrado Mineiro.

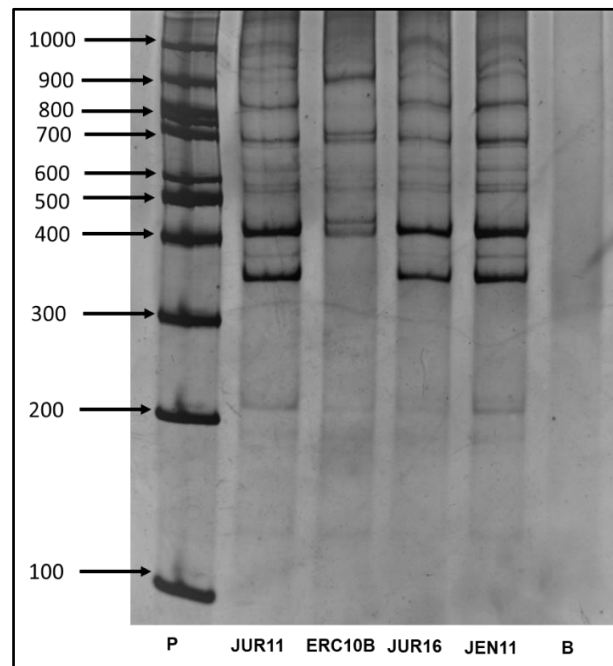


Figura 8: Resultados dos perfis de bandas em gel de poliacrilamida 8% das leveduras selecionadas de frutos e folhas do Cerrado, amplificadas pelo conjunto de iniciadores (3L, 3R, 4L e 5R) reveladas com nitrato de prata 12%. P- (padrão), B - (branco) e numeração a esquerda o tamanho das bandas em pb.

6 - CONCLUSÃO

Os frutos do Cerrado possuem diversidade de leveduras baseadas nas características morfológicas, além da mesma espécie poder colonizar diferentes frutos. A metodologia aplicada na seleção permitiu conhecer os perfis metabólicos de cada isolado. Com essas informações foi possível selecionar dentre as 37 leveduras 4 isolados. Estes apresentaram o melhor conjunto de características favoráveis a produção de cachaça e cerveja. Outros isolados podem ter utilidade em estudos de produção de outras bebidas, como por exemplo o vinho e hidromel, além de outras aplicações na indústria alimentícia. Ademais, o sequenciamento da região D1/D2 do DNAr não conseguiu diferenciação a nível de espécie, identificando as 4 leveduras pertencentes ao gênero *Meyerozyma*. Entre as 4 leveduras selecionadas apenas o ERC10B é de diferente linhagem. Leveduras não convencionais não são mais vistas como apenas microrganismo contaminantes e novos testes devem ser realizados para entendermos ainda mais suas particularidades e aplicá-las na produção de cachaça, cerveja e outros tipos de bebidas, a fim de fazer produtos singulares com sabores e aromas diferenciados. Esse trabalho aumenta as perspectivas de conhecer e estudar mais os microrganismos presentes no Cerrado brasileiro e o grande potencial biotecnológico que estes estudos possam produzir para sociedade.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. Números do setor- Faturamento. <https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2019.pdf> acessado dia 10/03/2020.

ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. Editora Blucher, 2017.

ALCARDE, A. R., MONTEIRO, B. M. D. S., BELLUCO, A. E. D. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1612–1618, 2012.

ALMEIDA JÚNIOR, E. B. D., CHAVES, L. J., SOARES, T. N. Caracterização genética de uma coleção de germoplasma de cagaiteira, uma espécie nativa do cerrado. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 246-252, 2014.

ALMEIDA, SP de. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p.

AMORIM, S. S., RUAS, F. A. D., BARBOZA, N. R., DE OLIVEIRA NEVES, V. G., LEÃO, V. A., GUERRA-SÁ, R. Manganese (Mn²⁺) tolerance and biosorption by *Meyerozyma guilliermondii* and *Meyerozyma caribbica* strains. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 4, p. 4538-4545, 2018.

Anuário da cachaça- Dados de produção de 2019. Disponível www.mapadacachaca.com.br/artigos/anuario-da-cachaca-2019-ministerio-da-agricultura-disponibiliza-dados-sobre-producao-de-cachaca-e-aguardente-no-brasil/ acessado dia 05/10/2020.

ARAÚJO, T. M. **Análises genômicas para otimização da produção de compostos aromatizantes por estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de produção de cachaça.** 201 f. Tese. Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto, 2018.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas.** 112 f. Dissertação – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013. 2013.

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

ASHIDA, S., ICHKAWA, E., SUGINAMI, K., IMAYASU, S. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51, n. 8, p. 2061-2065, 1987.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: fundamental and applications.** 4. ed. Redwood: Benjamin/Cummings Science Publishing, 643p. 1997.

AZEVEDO, M. D. O., FELIPE, M. S. S., BRÍGIDO, M. D. M. Técnicas básicas em biologia molecular. In: **Técnicas básicas em biologia molecular.** 211 p. 2003.

BARBOSA, E. A., SOUZA, M. T., DINIZ, R. H. S., GODOY-SANTOS, F., FARIA-OLIVEIRA, F., CORREA, L. F. M.; ALVAREZ, F.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F.; CASTRO, I. M; BRANDAO, R. L. Quality improvement and geographical indication of cachaça (brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1038-1051, 2016.

BEGEROW, D., NILSSON, H., UNTERSEHER, M., & MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87, n. 1, p. 99-108, 2010.

BISSON, L. F., COONS, D. M., KRUCKEBERG, A. L., LEWIS, D. A. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 259-308, 1993.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOFFETTA, P., HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 2, p. 149-156, 2006.

BOLZAN, A. R. **DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zygothrica**. 86 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

BRAIDWOOD, R. J., SAUER, J. D., HELBAEK, H., MANGELSDORF, P. C., CUTLER, H. C., COON, C. S., OPPENHEIM, A. Did man once live by beer alone. **American Anthropologist**, 55, n. 4, p. 515-526, 1953.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3.ed. Lavras: UFLA, 2013.

CAMOUGRAND, N. M., ZNIBER, S., GUÉRIN, M. G. The antimycin-A-insensitive respiratory pathway of *Candida parapsilosis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v. 1057, n. 1, p. 124-130, 1991.

CARREIRO, S. C., GUEDES, E. H. S., DE ALMEIDA, D. T., DE ABREU-LIMA, T. L. Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 36, n. 1, 2019.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

DAMIANI, C., VILAS BOAS, E. V. D. B., ASQUIERI, E. R., LAGE, M. E., OLIVEIRA, R. A. D., SILVA, F. A. D., PAULA, N. R. F. D. Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Food Science and Technology**, 31, n. 3, p. 723-729, 2011.

DA-SILVA, R., LAGO-VANZELA, E. S., BAFFI, M. A. **Uvas e Vinhos-Química, Bioquímica e Microbiologia**. São Paulo: Editora SENAC, 2015.

DE ARAÚJO VICENTE, M.; FIETTO, L. G.; DE MIRANDA CASTRO, I.; DOS SANTOS, A. N. G. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1966.

DE SOUZA, A. P. G., DE ARAÚJO VICENTE, M., KLEIN, R. C., FIETTO, L. G., COUTRIM, M. X., AFONSO, R. J. D. C. F., BRANDAO, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 101, n. 2, p. 379-392, 2012.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: Editora UFLA, 2010.

DING, J., HUANG, X., ZHAO, N., GAO, F., LU, Q., ZHANG, K. Q. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein Asr1p. **J Microbiol Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1630-1636, 2010.

EVANS, D. E., COLLINS, H., EGLINTON, J., WILHELMSON, A. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict malt fermentability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, n. 4, p. 185-198, 2005.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Market Sizes: historical/forecast. Brazil. London: **Euromonitor International**, 2020a.

FARIA-OLIVEIRA, F., PUGA, S., FERREIRA, C. Yeast: world's finest chef. In: **Food Industry**. Intech Open, 2013.

FERREIRA, M. C., CANTRELL, C. L., WEDGE, D. E., GONÇALVES, V. N., JACOB, M. R., KHAN, S., ROSA, L. H. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p. 692-697, 2017.

FUKUDA, K., WATANABE, M., ASANO, K., OUCHI, K., TAKASAWA, S. Isolation and genetic study of p-fluoro-dl-phenylalanine-resistant mutants overproducing β -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, 20, n. 6, p. 449-452, 1991.

FRANÇA, L. F. S., DE OLIVEIRA, F. M., JÚNIOR, A. F., GUIMARÃES FILHO, O., MEIRELES, W. A. Representação matemática da correlação entre acidez total no “vinho” e acidez volátil na cachaça. **Revista Agrogeoambiental**, 2010.

GRANDE, C.S. M. G. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 68 f. Dissertação - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

GSCHAEDLER, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 73-77, 2017.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids**. Symp. Ser. 41:95-98. 1999.

HASHEM, M., ABO-ELYOUSR, K. A. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 285-292, 2011.

HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current Genetics**, v. 59, n. 1, p. 1-31, 2013.

ICHIKAWA, E., HOSOKAWA, N., HATA, Y., ABE, Y., SUGINAMI, K., IMAYASU, S. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2153-2154, 1991.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNIKOVA, Y. V.; MUKASHEVA, T. D.; OMIRBEKOVA, A. A.; BERZHANOVA, R. Zh.; SYDYKBKOVA, R. K.; KARPENYUK, T. A.; GONCHAROVA, A. V. Biodiversity of Micromycetes Isolated from Soils of Different Agricultures in Kazakhstan and Their Plant Growth Promoting Potential. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v.7, n.7, 2013.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61, n. 2, p. 461-467, 1995a.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, 46, n. 2, p. 269-273, 1995b.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 106, n. 4, p. 317-323, 2008.

KURTZMAN, C. P., SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2-14, 2010.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: **The yeasts**: Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

LACHANCE, M. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 2, p. 151-160, 1995.

LIMA, R. B. **Processo de clarificação do caldo de cana-de açúcar aplicando elétrons acelerados**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LOPEZ, V., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., BARRIO, E., RAMÓN, D., QUEROL, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 63-71, 2003.

LÓPEZ, V., QUEROL, A., RAMÓN, D., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 75-81, 2001.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2001.

MADIGAN, M. *et al.* **Microbiologia de Brock-14^a Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P.; **Tecnologia da Cachaça de Alambique**, Editora SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS: Belo Horizonte, 2006.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, p. 413-421, 1998.

MCGOVERN, P. E. Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages. **Univ of California Press**, 2009.

MENDES, M. R. D. A., MUNHOZ, C. B. R., SILVA JÚNIOR, M. C. D., CASTRO, A. A. J. F. Vegetation and soil relationship in moist grassland in the National Park of Sete Cidades, Piauí, Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 971-984, 2012.

MENESES, F. J., JIRANEK, V. Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar catabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 3, p. 322-335, 2002.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível [http:// www.mma.gov.br/bioma/cerrado](http://www.mma.gov.br/bioma/cerrado) acessado em 23/05/2018.

MONTEIRO, B. M. D. S. **Produção de etanol combustível: efeito da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, 2016.

MOREIRA, R. F.; NETTO, C. C.; MARIA, C. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Química Nova**, 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.

MOSHER, R. **Degustando cerveja: tudo que você precisa saber para avaliar e apreciar a bebida**. Tradução: Márcio Caparica. Editora SENAC. São Paulo, 2020.

MÜLLER, C., MILANI, L. M., GIEHL, A., BARRILI, E. T., DEOTI, L., LUCARONI, A. C., JÚNIOR, S. L. A. Resíduos de cana-de-açúcar e milho como matéria prima do etanol 2G: atualidades e perspectivas. **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química**, v. 3, 2019.

MÜLLER, M., BELLUT, K., TIPPMANN, J., BECKER, T. Physical methods for dealcoholization of beverage matrices and their impact on quality attributes. **ChemBio Eng Reviews**, v. 4, n. 5, p. 310-326, 2017.

NAIR, B. M.; PRAJAPATI, J. B. The history of fermented foods. In: Handbook of fermented functional foods: **CRC Press**, 2003. p. 17-42.

NCBI- National Center for Biotechnology Information
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome acessado em 25/08/28.

OBA, T., NOMIYAMA, S., HIRAKAWA, H., TASHIRO, K., KUHARA, S. Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1270-1273, 2005.

O'BRIEN, H. E., PARRENT, J. L., JACKSON, J. A., MONCALVO, J. M., VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

O'DONNELL, A. G., YOUNG, I. M., RUSHTON, S. P., SHIRLEY, M. D., CRAWFORD, J. W. Visualization, modelling and prediction in soil microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 689-699, 2007.

OLIVEIRA, M. d. **Ocorrência, diversidade e caracterização enzimática de leveduras isoladas de frutos do cerrado**. 74 f. Dissertação - Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2015.

OLIVEIRA, V. A., VICENTE, M. A., FIETTO, L. G., DE MIRANDA CASTRO, I., COUTRIM, M. X., SCHÜLLER, D., BRANDAO, R. L. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 693-701, 2008.

O'SHEA, R. S., DASARATHY, S., MCCULLOUGH, A. J. Alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 307-328, 2010.

PATARO, C., GUERRA, J. B., PETRILLO-PEIXOTO, M. L., MENDONÇA-HAGLER, L. C., LINARDI, V. R., ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, 89, n. 1, p. 24-31, 2000.

RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of Natural Products**, 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

ROMI, W., KEISAM, S., AHMED, G., JEYARAM, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2014.

SAERENS, S. M. G., DELVAUX, F., VERSTREPEN, K. J., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J. M., DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 454-461, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, E. A., DE OLIVEIRA, R. B., MEDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast associated with flower and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Review of Microbiology**, v.27, p.33-40, 1996.

SCHIFFERDECKER, A. J., DASHKO, S., ISHCHUK, O. P., PIŠKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323-332, 2014.

SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SILVA, C. H. P. M. **MICROBIOLOGIA DA CERVEJA**: do básico ao avançado, o guia definitivo. 1ª ED. Livraria da Física. 2019.

SINDICERV- Sindicato Nacional da indústria cervejeira. Disponível www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/ acessado dia 05/10/2020.

SLÁVIKOVÁ, E., VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 43, n. 5, p. 430-436, 2003.

SOUZA, A. P. G., DE ARAÚJO VICENTE, M., KLEIN, R. C., FIETTO, L. G., COUTRIM, M. X., AFONSO, R. J. D. C. F., BRANDAO, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavour compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 379-392, 2012.

SPERANDIO, E. M.; DO VALE, H. M. M.; MOREIRA, G. A. M. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. **Fungal Biology**, 119, n. 11, p. 984-993, 2015.

SWIEGERS, J. H., BARTOWSKY, E. J., HENSCHKE, P. A., PRETORIUS, I. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

VEIGA, A.; ARRABAÇA, J. D.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 1, p. 93-97, 2000.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2016.

WANG, G. Y., CHI, Z., SONG, B., WANG, Z. P., CHI, Z. M. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 77-82, 2012.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Levedura: guia prático para fermentação de cerveja**. 1.ed Porto Alegre, RS: Editora Krater, 2020.

ZHAO, J., MOU, Y., SHAN, T., LI, Y., ZHOU, L., WANG, M., WANG, J. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7961-7970, 2010.

8- ANEXOS

Anexo 8.1 - Quadro com características macromorfológicas das leveduras isoladas

Isolado	Tamanho	Forma	Cor	Superfície	Borda	Perfil	Textura
JEN2	média	circular	vermelha	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
JEN3	grande	circular	vermelha	estrias radiais	lisa	lisa convexa	mucosa
JEN5	pequena	circular	vermelha	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
JEN11	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ABA1	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ABA4	grande	irregular	branca	estrias radiais	lisa	lisa convexa	cremosa
ABA5S	grande	irregular	branca	estrias radiais	pregueada	elevada e trapezoidal	cremosa
ABA5B	grande	irregular	branca	estrias radiais	pregueada	elevada e trapezoidal	cremosa
MVC3	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa e convexa	cremosa
MVC4	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa e convexa	cremosa
MVC7B	grande	irregular	branca	estrias radiais	lisa	lisa e convexa	cremosa
MVC7S	grande	irregular	branca	estrias radiais	lisa	lisa e convexa	cremosa
ARA1	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa e convexa	cremosa
ARA3	grande	circular	vermelha	estrias radiais	lisa	lisa e convexa	mucosa
ARA5	grande	irregular	branca	estrias radiais	lisa	lisa e convexa	cremosa
ARA6	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa e convexa	cremosa
ARA9	grande	irregular	vermelha	estrias concêntricas	lisa	lisa e convexa	mucosa
ARA10	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ARA11	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ARA12	grande	irregular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
PIT3	média	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ERC1	grande	circular	branca	estrias radiais	ondulada	lisa convexa	cremosa
ERC9	grande	irregular	branca	estrias radiais	ondulada	lisa convexa	cremosa
ERC10B	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
ERC10S	grande	circular	vermelha	estrias radiais	lisa	lisa convexa	mucosa
ERC16	grande	circular	branca	estrias radiais	ondulada	lisa convexa	cremosa
JUR5	grande	circular	branca	estrias radiais	lisa	lisa convexa cume central	mucosa
JUR9	média	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR10	média	circular	vermelha	estrias radiais	lisa	lisa convexa cume central	cremosa
JUR11	grande	irregular	branca	estrias radiais	pregueada	elevada e trapezoidal	cremosa
JUR14	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR15	grande	circular	vermelha	estrias radiais	lisa	lisa convexa	mucosa

JUR16	grande	circular	branca	estrias radiais	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR19	grande	circular	branca	estrias radiais	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR22	grande	circular	branca	estrias radiais	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR24	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa
JUR58	grande	circular	branca	estrias concêntricas	lisa	lisa convexa	cremosa

CAPÍTULO 2: Produção e análise de cachaças em escala piloto por leveduras isoladas dos frutos e folhas do Cerrado Mineiro

1- INTRODUÇÃO

A cachaça é o destilado preferido e mais consumido no Brasil. Em 2021, foram registrados 936 alambiques, 4.969 novos rótulos e produzidos 1,3 bilhões de litros, possuindo o 3º maior mercado mundial dentro das bebidas destiladas (Expocachaça, 2021).

Um dos principais protagonistas na produção deste destilado são as leveduras, microrganismos responsáveis pela fermentação do mosto a base de caldo de cana-de-açúcar. As leveduras convertem os carboidratos presentes neste mosto em grande parte em metabolitos primários, álcool e CO₂ e em uma pequena fração, e 1% em vários metabolitos secundários, como os aldeídos, álcoois superiores, ésteres, ácidos. Estas substâncias são responsáveis pela formação dos aromas e sabores da cachaça.

Pouco se conhece das leveduras do Cerrado, bioma rico em diversidade com algumas regiões ainda pouco impactadas pela ação antrópica. O Cerrado possui uma grande variedade de frutos endêmicos, pouco conhecidos pela população brasileira e que podem abrigar várias espécies de leveduras. As condições físico-químicas presentes nestes frutos são favoráveis ao crescimento de leveduras como pH ácido, presença de carboidratos e expostos a temperaturas médias de 22°C a 27°C (KLINK; MACHADO, 2005; MENDES et al., 2012; ALMEIDA JÚNIOR et al., 2014).

Foram analisados 6 frutos do Cerrado, o (*Psidium firmum* (araçá); *Genipa americana* (jenipapo); *Passiflora setacea* (maracujá de veado); *Talisia esculenta* (pitomba); *Pouteria ramiflora* (curriola) e *Ananas comosus* (abacaxi do cerrado) todos colhidos da cidade de Grão Mogol, MG. As folhas pertencem a espécie *Stachytarpheta cassiae* S. Atkins (jurobão), colhidas da cidade de Rio Pardo de Minas, MG. Deste material foram isoladas 37 leveduras que passaram por uma sequência de testes bioquímicos relacionados a produção de cachaça. Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), MG. Todos os isolados agora fazem parte da coleção do laboratório, que já possui cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

Dentre o total dos isolados, 4 foram selecionadas por apresentaram melhor conjunto de resultados. Todos cresceram e fermentaram na presença dos principais carboidratos encontrados nos mostos das bebidas, floculação positiva, resistência a drogas relacionadas a

as vias de produção de voláteis aromáticos, produção negativa de H₂S e resistência ao estresse osmótico.

O objetivo deste trabalho é aplicar as 4 leveduras selecionadas, JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 para produção de cachaça de alambique em escala piloto. Dentro deste processo foram avaliados parâmetros fermentativos dos vinhos (mostos fermentados) e parâmetros dos destilados produzidos. As cachaças passaram por teste sensorial de aceitação de público com a comunidade acadêmica e moradores da região. Todas estas avaliações foram realizadas no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG), campus Salinas, MG. Análise quantitativa dos voláteis secundários foi realizada no Laboratório de Massas na UFOP, na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A aplicação de leveduras isoladas de um ambiente tão rico, diverso e com muitas peculiaridades como o Cerrado podem ser uma alternativa promissora na descoberta de leveduras que agreguem na produção de bebidas, aumentando sua qualidade e formando sabores e aromas singulares que fidelize ainda mais o consumidor.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Cachaça

A cachaça é a bebida destilada mais consumida e conhecida entre os brasileiros. Sua relação com a nossa população é muito antiga, desde o período da colonização portuguesa. Sua atividade está ligada a produção açucareira, ambas de grande importância econômica para o país (CERIBELI *et al.*, 2010). O nome “cachaça” faz referência a aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil, sendo obtida pela destilação do vinho, com graduação alcoólica de 38 a 48% (v/v) a 20 °C, podendo ser adicionadas até 6 gramas por litro de açúcar. Essas características de identidade são regulamentadas pela Instrução Normativa do MAPA nº13 de 29 de junho de 2005 (BRASIL, 2005). De acordo com a legislação vigente, a Tabela 1 apresenta os valores de referência fundamentais para regulação da venda da cachaça.

Tabela 1: Parâmetros de substâncias da cachaça segundo a normativa atual. BRASIL, (2005)

SUBSTÂNCIAS	VALORES DE REFERÊNCIA
Grau alcoólico	38% e máximo 48% (v/v) a 20° C
Acidez volátil (em ácido acético)	Máximo 150 mg /100 mL (álcool anidro)
Ésteres (em acetato de etila)	Máximo 200 mg /100 mL (álcool anidro)
Aldeídos (em aldeído acético)	Máximo 30 mg /100 mL (álcool anidro)
Furfural	Máximo 5 mg /100 mL (álcool anidro)
Álcool superiores	Máximo 360 mg /100 mL (álcool anidro)
Coefficiente de congêneres	200 a 650 mg /100 mL (álcool anidro)
Metanol	Máximo 20 mg /100 mL (álcool anidro)
Cobre	Máximo 5 mg/L
Carbamato de etila	Máximo 150 mg/L

Em função da maior presença e controle dos órgãos fiscalizadores, além de um público consumidor mais exigente, o setor produtivo nacional tem buscado aumentar a qualidade do destilado. Diante disso, em 2019, a bebida foi exportada para mais de 60 países, gerando receitas em torno de US\$ 14 milhões anuais tendo como principais países importadores Paraguai, Alemanha, Estados Unidos, França e Portugal (ABRAS, 2019). Dentre os Estados brasileiros, Minas Gerais se destaca na produção de cachaça, possuindo 421 produtores

registrados, três vezes mais que São Paulo, Estado que ocupa o segundo lugar, com 126 registros (ABRAS, 2019).

Para a produção de uma cachaça de qualidade deve-se observar vários fatores: tipo e maturação da cana-de-açúcar; higienização durante todo processo para evitar a proliferação de bactérias; menor variação de temperatura durante a fermentação; qualidade da água utilizada e viabilidade e vitalidade das leveduras (CARDOSO, 2013).

O processo da fabricação é considerado rápido. Inicialmente, a cana é moída e o caldo peneirado para remoção de pequenas partes do bagaço (bagacilhos). Esse procedimento inicial deve ser feito em um prazo máximo de 24 h, após o corte da cana, para evitar a proliferação de microrganismos contaminantes presentes na própria cana-de-açúcar. É necessário fazer a adequação do caldo para 15 °Brix com água de boa qualidade e principalmente sem a presença de cloro. O caldo é imediatamente transportado para a dorna de fermentação onde em contato com a massa de leveduras (pé de cuba) inicia-se o processo fermentativo (VENTURINI FILHO, 2016; CARDOSO, 2013; SALES, 2001).

A última etapa é a destilação. Após a finalização da fermentação, o vinho (mosto fermentado) é aquecido no alambique. Nas cachaçarias artesanais, a destilação é realizada em alambiques de cobre. Esse equipamento tem a função de volatilizar produtos metabólicos primários e secundários formados no vinho durante o processo fermentativo. A medida que os gases entram em contato com o condensador do alambique passam para fase líquida formando a cachaça. A fração engarrafada da cachaça de alambique é chamada “coração”, sendo desprezada 5 a 10% da fração inicial denominada “cabeça” e 10 a 15% da fração final de “cauda” (YOKOYA, 1995). Segundo legislação vigente, o armazenamento da cachaça deve ser feito em recipiente composto de dois ou mais tipos de madeiras (tonéis) em um período de no mínimo 1 ano para ser considerada envelhecida (BRASIL, 2005). A Figura 1 apresenta um fluxograma simplificado para fabricação da cachaça de alambique.

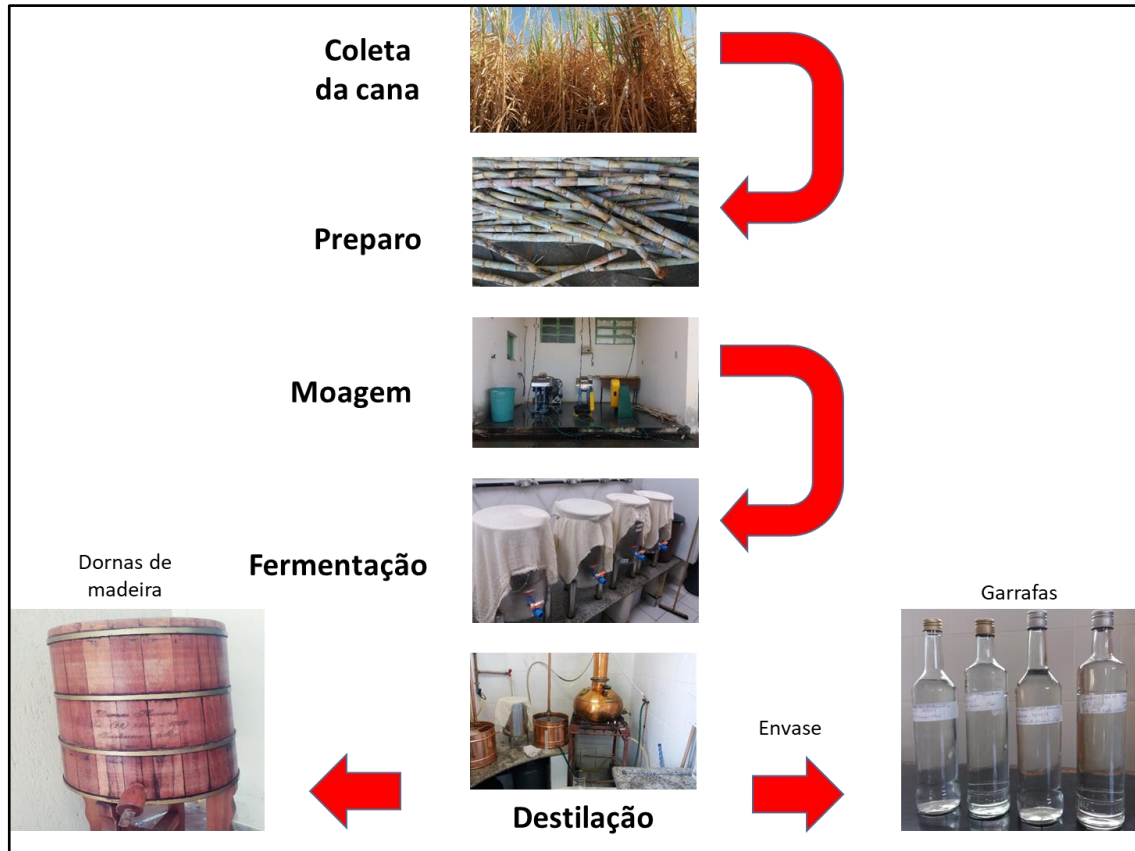


Figura 1: Processo simplificado da produção da cachaça de alambique do momento da colheita até seu armazenamento

Quando são utilizadas leveduras selecionadas há maior garantia de rendimento, redução de tempo fermentativo e menor concentração de substâncias indesejáveis causadas por contaminantes naturais. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura predominantemente utilizada nos processos de fabricação de cachaça devido suas características fermentativas positivas e sua adaptação ao ambiente do mosto que possui presença de álcool e alta osmolaridade, prejudiciais a grande parte das leveduras (VICENTE *et al.*, 2006).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Produzir cachaça em escala piloto com leveduras selecionadas de frutos e folhas nativos do Cerrado.

3.2 - Objetivos específicos

- Analisar parâmetros fermentativos e físico químicos das cachaças;
- Efetuar análise sensorial de atributos e aceitação das cachaças.

4 - METODOLOGIA

4.1- Produção das cachaças em escala piloto

As cachaças foram produzidas no setor de fermentação do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG), *Campus Salinas.*, localizada na cidade de Salinas–MG. Foram produzidas em escala piloto de 40 L, utilizando as leveduras selecionadas. Toda metodologia de propagação de leveduras, produção da cachaça, análises fermentativas e físico químicas foram desenvolvidas de acordo com Barbosa e colaboradores (2016).

4.1.2 - Propagação das leveduras

As leveduras selecionadas foram estriadas em placas de Petri, contendo o meio YPD incubadas em estufa a 30 °C por 48 h. Após o crescimento, foi coletada uma colônia de cada cepa e transferida para tubo com 5 mL com YPD. Para aumentar o volume celular foram realizadas transferências sequenciais para o mesmo meio, nas mesmas condições de crescimento em volumes de 10 mL, 100 mL, 1L e por fim 3 L. Após 12 h de incubação no último volume, as leveduras foram deixadas em superfície plana e inerte para sedimentação natural sendo feita a troca do sobrenadante por 3 dias consecutivos.

Ao fim da propagação inicial, as leveduras foram transferidas para baldes graduados de 20 L. Cada balde continha 5 L de melado de cana-de-açúcar diluído com água potável (livre de cloro) para concentração de 5 °Brix. Esse meio foi esterilizado, acrescido 1% de extrato de levedura e a multiplicação celular foi em temperatura ambiente com aeração constante. Quando o teor de açúcares chegava a 0, o balde era deixado em superfície plana e inerte para sedimentação natural das leveduras e apenas o sobrenadante era substituído pela solução de melado. Esse processo foi repetido até que se conseguisse obter um mínimo de 2 L de massa celular, o que equivale a cerca de 10^9 células por mL, quantidade necessária para iniciar a formação do pé de cuba.

4.1.3 - Preparação do pé de cuba

As leveduras propagadas nos baldes foram transferidas para dornas de aço inoxidável, em formato cônico, com capacidade máxima de 50 L (Figura 2A). As dornas foram alimentadas sequencialmente com adições de 4L, com aumento progressivo da concentração do teor de açúcares em 5, 7, 11, 13 e 15 °Brix. O intervalo entre cada abastecimento estava relacionado

ao consumo total dos carboidratos presentes no mosto. Ao fim deste procedimento, foi descartado .10 L do sobrenadante e os 10 L restantes foram denominados de pé-de-cuba.

4.1.4 - Fermentação em escala piloto

Para a produção da cachaça foi utilizado o cultivar RB 92579, colhida na Fazenda-Escola Santa Izabel, pertencente ao *campus* Salinas do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG).

As fermentações ocorreram nas mesmas dornas em que foi formado o pé-de-cuba (Figura 2A). Cada ciclo contou com 3 adições de 10 L de caldo da cana ajustados a 15 °Brix com água potável (sem cloro) totalizando um volume final de 40 L. As duas primeiras trocas eram realizadas quando o vinho apresentava 3 °Brix. Ao ocorrer o terceiro abastecimento, esperava-se o consumo total dos açúcares, a sedimentação das leveduras e então 30 L do sobrenadante (vinho) eram transferidos para o destilador. Os 10 L restantes foram mantidos nas dornas, reutilizados para o próximo ciclo. Não houve qualquer tipo de tratamento do pé de cuba entre um ciclo e outro.



Figura 2: (A) dornas de fermentação de alumínio utilizadas na produção piloto, (B) destilador de cobre usado na produção da cachaça

4.1.5 - Destilação

Os vinhos produzidos nas dornas foram destilados em um alambique de cobre com capacidade máxima de 40 L. Para aquecimento foi usado um fogão industrial a gás, elevando-se a temperatura até 90 °C, sendo esta aferida por termômetro acoplado ao destilador (Figura 2B).

Para o engarrafamento da cachaça, o destilado total foi dividido em três frações: cabeça (5%), coração (80%) e cauda (15%). As frações cabeça e cauda foram desprezadas e apenas a do coração foi armazenada em garrafas de vidro transparentes, com tampa e guardadas em local apropriado (Figura 3). A determinação das frações foi realizada com base no volume do vinho produzido multiplicado pela concentração de álcool presente no vinho dividido pelo corte do teor alcoólico da cachaça que foi de 45 °GL, conforme equação a seguir:

$$VTD = \frac{TAV \times VTV}{TAC}$$

Em que:

VTD: Volume total de destilado;

TAV: Teor alcoólico do vinho;

VTV: Volume do vinho; e

TAC: Teor alcoólico da cachaça



Figura 3: Cachaças engarrafadas produzidas pelas leveduras isoladas e selecionadas JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 dos frutos e folhas do Cerrado.

4.2 - Parâmetros fermentativos

4.2.1 - Acidez do mosto

Para o cálculo da acidez do mosto, foi retirado uma alíquota de 10 mL do vinho antes de cada alimentação nas dornas completados com 90 mL de água destilada. Foi usada uma solução padronizada de NaOH a 0,01 mol/l e indicador fenolftaleína a 1%. O volume gasto na titulação foi medido por uma bureta digital (Digitrade da Jencons®) (ABNT,1997a). Cada teste foi realizado em triplicata.

4.2.2 - Consumo de açúcares

A mediação do consumo de açúcares foi realizada por um refratômetro eletrônico portátil *ANTON PAAR modelo DMA 35 A* com correção automática de temperatura sendo anotado o horário de cada leitura. Esse procedimento foi realizado em triplicata antes do reabastecimento. Os resultados foram apresentados em °Brix/h.

4.2.3 - Teor alcoólico do vinho

Para determinar a porcentagem de grau alcoólico presente do vinho foram retirados 20 mL de cada fermentado no fim do 3º abastecimento antes da destilação. O aparelho usado foi o ebulliômetro seguindo a metodologia indicada pelo fabricante. Cada leitura foi realizada em triplicata. O resultado foi apresentado em teor alcoólico em % (v/v).

4.3 - Parâmetros físico-químicos da cachaça

4.3.1 - Teor alcoólico real da cachaça (% v/v)

Para calcular o grau alcoólico real presente nas cachaças foi utilizado o destilador Super DDE (Gibertini®). A metodologia seguiu as recomendações do fabricante. Foi utilizado 100 mL da amostra da cachaça, 3 mL do *antischiuma* (Gibertini®) e 3 mL de licor (Gibertini®). A leitura do resultado foi feita pelo aparelho *ANTON PAAR - modelo DMA 35®* com correção automática de temperatura. O resultado foi apresentado em teor alcoólico em % (v/v).

4.3.2 - Acidez volátil da cachaça

Para determinar a acidez volátil das cachaças foi utilizado o equipamento Super DDE (Gibertini®) seguindo as recomendações do fabricante. Foram retirados 20 mL de cada cachaça na qual ocorreu o processo de redistilação. Posteriormente, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína a 1% nessa solução. A leitura foi realizada por titulação com NaOH padronizada a 0,01 mol/L e a leitura feita com o auxílio de uma bureta digital (Digitrade da Jencons®) (ABNT, 1997b). Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.4 - Análise sensorial

O projeto foi submetido a avaliação do Comitê Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Montes Claros com nº o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 12775219.1.000.5146 e parecer 3.332.800. O local de execução do teste foi no Laboratório de Análise Sensorial do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - *Campus* Salinas (IFNMG). Participaram 65 julgadores, maiores de 18 anos, ambos os sexos, membros da comunidade acadêmica local e arredores.

A metodologia utilizada para avaliação foi o teste de aceitação com escala hedônica de 9 pontos, variando os termos máximo e mínimos de “gostei muitíssimo” a “desgostei muitíssimo” (Figura 4).

Para degustação, foram utilizados 4 copos modelo Nadir Figueiredo® (NF 2310) de 50 mL, servindo aos provadores 20 mL de cada tipo de cachaça, numerados em sequência aleatória de três dígitos, mais dois copos de 300 mL, um descartável contendo água potável e outro de plástico rígido com tampa usado para descarte. As amostras foram apresentadas em blocos completos casualizados. Os atributos sensoriais analisados foram aroma, sabor, acidez, frutado, impressão global. As notas avaliativas foram de 1 a 9 com termos hedônicos de: 1- “desgostei muitíssimo”; 2- “desgostei muito”; 3- “desgostei regularmente”; 4- “desgostei ligeiramente”; 5- “nem gostei/ nem desgostei”; 6- “gostei ligeiramente”; 7- “gostei regularmente”; 8- “gostei muito” e 9- “gostei muitíssimo”. A intenção de compra também foi avaliada com as notas de 1 a 5: 1- “certamente não compraria o produto”; 2- “provavelmente não compraria o produto”; 3- “tenho dúvidas se compraria o produto”; 4- “provavelmente compraria o produto” e 5- “certamente compraria o produto”. A ficha de avaliação está representada na Figura 4. As análises dos dados seguiram os padrões exigidos pela ABNT – NBR 14141 (ABNT, 1998), para avaliação sensorial de alimentos e bebidas.

Dados de identificação do provador

Provador No. _____

NOME: _____ SEXO () Fem () Masc.

IDADE () 18 () 19-21 () 22-30 () 30-40 () maior que 40 anos

Caso você concorde em participar do teste de Cachaça com fermento de frutos do cerrado e não tenha alérgicos e/ou outros problemas relacionados à ingestão deste produto, por favor, assine esta ficha.

ASSINATURA: _____

Obrigada por sua colaboração!

Instruções para o teste: Você está recebendo amostras codificadas de cachaça. Por favor, coloque a nota em relação ao seu aroma, sabor, acidez e frutado de acordo com a escala abaixo.

9- Gostei muitíssimo
 8- Gostei muito
 7- Gostei regularmente
 6- Gostei ligeiramente
 5- Nem gostei/ nem desgostei
 4- Desgostei ligeiramente
 3- Desgostei regularmente
 2- Desgostei muito
 1- Desgostei muitíssimo

Amostras	Aroma (característico da cachaça)	Sabor (característico da cachaça)	Acidez (característico da queimação na deglutição)	Frutado (característico do aroma de frutas)	Impressão Global (motivo geral que levou a dar a nota para cada amostra)
Amostra					
Amostra					
Amostra					
Amostra					

Dados de identificação do consumo de Cachaça.

1- Você consome cachaça com que frequência:

Frequentemente (uma ou mais vezes por semana)
 Regularmente (duas a três vezes ao mês)
 Ocasionalmente (uma vez ao mês)
 Quase nunca (2 a 6 vezes ao ano)
 Nunca consome
 Outros, especifique: _____

2- Se você é um consumidor de cachaça, por favor nos indique qual a sua razão de consumo

porque acha gostoso
 porque acha que é um complemento alimentar
 hábito na família
 Outros, especifique: _____

3- Baseado na impressão global do produto, indique a sua ATITUDE DE COMPRA com relação a amostra, usando a escala abaixo:

5- Certamente compraria o produto
 4- Provavelmente compraria o produto
 3- Tenho dúvida se compraria o produto
 2- Provavelmente não compraria o produto
 1- Certamente não compraria o produto

Amostra: _____	Nota: _____
Amostra: _____	Nota: _____
Amostra: _____	Nota: _____
Amostra: _____	Nota: _____

Figura 4: Formulário aplicado para avaliação sensorial de aceitação de público aos degustadores

4.5 - Análise quantitativa de compostos voláteis secundários em cachaças

Os compostos voláteis secundários (metabólitos secundários) analisados das cachaças, dividem-se em 4 grupos: contaminantes orgânicos, ésteres, álcoois superiores e aldeídos. Os valores de referência foram baseados de acordo com a IN 13/2005 (BRASIL, 2005). A quantificação foi realizada por um cromatógrafo a gás, acoplado com detector de ionização de chamas (CG-DIC), modelo Varian CP-3380 (Palo Alto, EUA). As condições cromatográficas estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Configurações cromatográficas utilizadas no Varian CP-3380 para análise de metabólitos secundários produzidos pela fermentação das leveduras selecionadas

Tipo de coluna	DB- WAX (polietilenoglicol, 60m x 0,25mmx 0,25µm)
Modo de injeção	2 µL, Split: 1/25.
Gás de arraste	Hidrogênio (99,9990%)
Temperatura do injetor	225 °C
Temperatura do detector	280 °C
FID	N ₂ (gás make up): 29 mL/min, H ₂ : 30 mL/min e Ar: 300 mL/min
Rampa	50 ° C (6 min.) subindo até 100 °C (6 min.), a uma rampa de 10 ° C/min subindo a 240 °C (7,7 min.) a 20 ° C/min
Tempo total	31,70 min

Para a construção da curva analítica, foram utilizados os padrões PA: metanol, n-propanol, álcool isobutílico, álcool isoamílico, acetaldeído, 1-butanol, 2-butanol e acetato de etila (todos Sigma-Aldrich®, EUA). Para cada analito foram construídas cinco faixas de concentração sendo adicionados 20 µl de n-pentanol como padrão interno (PI), na concentração final de 0,4% v/v. Cada faixa foi preparada em triplicata (Anexo 7.2).

Para a quantificação nas amostras, foram adicionados 20 µl do padrão interno (PI) de n-pentanol em 4,980 mL de cachaça, com injeção manual de 2 µl das amostras no cromatógrafo em triplicata.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - Parâmetros fermentativos

5.1.1 - Capacidade de consumo de carboidratos (Brix/h)

Os períodos de produção das cachaças foram de 21 dias interruptamente, obtendo 6 destilações com as cepas JUR11 e ERC10B e 5 com a JUR16 e JEN11. Entre as leveduras, não houve diferenças estatísticas com relação ao consumo de teores de açúcares e média de consumo de 0,256 °Brix/h. A diferença na quantidade de destilações foi ocasionada pela demora na sedimentação ocorrida entre as leveduras. As cepas JUR11 e ERC10B apresentaram uma floculação mais rápida, dinamizando o processo. A baixa capacidade floculativa da JUR16 já era prevista, devido ao resultado obtido no teste de floculação realizado durante a seleção das leveduras. No entanto, a cepa foi selecionada para continuidade dos testes devido ao seu conjunto de características bioquímicas positivas apresentadas no momento da seleção. Os consumos das leveduras selecionadas foram abaixo das cepas comerciais (Figura 5). Barbosa e colaboradores (2016), utilizando a mesma metodologia e condições experimentais, analisaram o consumo de 18 espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de dornas de fermentação de cachaça, obtendo o consumo variável de sólidos solúveis entre 0,2 a 1,2 °Brix/h. No decorrer das fermentações houve variação de consumo dos carboidratos, estabilizando a partir da quarta fermentação. Esses resultados podem ter sido influenciados por dois fatores: Os pés-de-cuba que não sofreram nenhum tratamento de recuperação e a inserção de outros tipos de levedura presentes naturalmente no caldo-de-cana (VENTURINI FILHO, 2016; CARDOSO, 2013; MAIA, CAMPELO, 2006). Assim, a diminuição do rendimento fermentativo foi observada à medida que iam ocorrendo os ciclos. Vários estudos confirmaram que as populações de leveduras presentes no mosto sofrem variações de espécies durante o processo fermentativo (VICENTE *et al.*, 2006; SCHAWAN *et al.*, 2001, PATARO *et al.*, 2000; PATARO *et al.*, 1998). Alcarde e colaboradores (2017), realizaram um experimento utilizando fermentação com leveduras comerciais CA-11, CAT-1 e Canamax com caldo de cana sem tratamento térmico e constataram que a partir da terceira semana de fermentação a comunidade de leveduras originais do pé de cuba sofrem grande influência de leveduras selvagens, porém continuam mantendo a predominância de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1.2 - Produção de álcool no vinho

A produção de álcool do vinho também não mostrou diferenças estatísticas entre as leveduras testadas (Tabela 2). A média de teor alcoólico produzido foi de 5,7% ($\pm 0,84$) v/v. Em geral, a porcentagem média encontrada no vinho é de 5 a 10% (LIMA *et al.*, 2001). Alguns fatores podem ter influenciado nos resultados, como a variação da temperatura ambiente ocorrida no momento da fermentação e a inserção de outras leveduras vindas dos caldos-de-cana ao decorrer dos abastecimentos, influenciando as características iniciais do pé de cuba.

A produção de etanol no mosto é um fator importante que está relacionado a capacidade da levedura na produtividade da bebida, ou seja, quanto maior o teor alcóolico presente no vinho maior será o volume do destilado (AMORIM *et al.*, 2010). Essa produção pode variar de acordo com a cepa ou linhagem utilizada. Um exemplo comum são cepas de *S.cerevisiae* na qual Silva e colaboradores (2008) obtiveram a produção de teor alcoólico de 6 a 9% no vinho e Barbosa e colaboradores (2016), apresentaram uma variação de 7% a 8,9%.

5.1.3 - Acidez no fermentado, acidez volátil e teor alcóolico nas cachaças

Os resultados da acidez do vinho mostraram que não houveram diferenças significativas quando utilizadas as leveduras selecionadas, com média 38,98 ($\pm 8,26$) mg. de ácido acético/100 mL de vinho (Tabela 2). Na porcentagem alcoólica também não houve diferenças com média de 46,73% ($\pm 3,70$) v/v. Fatores como características das cepas isoladas, controle de higienização dos equipamentos, utilização de caldos de canas cortadas em menos de 24 h e o processo de alimentação não continuada contribuíram para o resultado (ALCARDE, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2009).

França e colaboradores (2010), realizaram 5 fermentações utilizando um conjunto de microrganismos vindos a partir de uma solução com cana triturada conhecida entre os produtores de fermento “caipira” e obtiveram a concentração em seus vinhos de 344,50 mg de ácido acético em 100 mL de vinho. Barbosa e colaboradores (2016), utilizando 18 leveduras selecionadas de dornas de fermentação constataram a presença de 5,5 a 9,5 mg. de ácido acético em 100 mL de vinho em produção em escala piloto de 40 L. Altas concentrações de acidez no mosto indicam um fermento pouco produtivo ou contaminado, principalmente por bactérias acéticas, sendo esse resultado um parâmetro de controle de produção. A concentração de acidez volátil no destilado está relacionada diretamente com a qualidade e

aceitação da cachaça sendo um reflexo da condução do processo fermentativo. A alta concentração de acidez na bebida, produz um odor de vinagre e um sabor forte e áspero ao consumidor (ALCARDE, SOUZA e BELLUCO, 2011, MAIA; CAMPELO, 2006). Poucos trabalhos são encontrados utilizando leveduras não convencionais como principal agente fermentativo. Portugal e colaboradores (2017) utilizaram a levedura *Meyerozyma guilermoii* em um estudo fermentativo de escala laboratorial com caldo-de-cana e obtiveram a produção em média de 38 mg de ácido acético em 100 mL de a.a, resultado abaixo do encontrado em nossos testes que foram em escala piloto. Na utilização da levedura *Pichia fermentans* a concentração produzida foi de 130,0 mg de ácido acético em 100 mL de álcool anidro Bortoletto e Alcarde (2015), fizeram análise de 268 amostras de cachaças e aguardentes de diferentes regiões do Brasil e observaram uma grande variação de acidez volátil com uma média de produção de 88,18 ($\pm 61,86$) mg. de ácido acético em 100 mL de álcool anidro. JERÔNIMO (2004), trabalhando com fermentação em mosto de caldo com *Saccharomyces cerevisiae* obteve variações de produções desde 7,0 a 365,0 mg. ácido acético/100 mL de álcool anidro.

Tabela 2: Resultados dos parâmetros fermentativos produzidos pelas leveduras selecionadas na produção da cachaça

LEVEDURAS	CONSUMO BRIX/h	ACIDEZ DO VINHO (mg. Ac. Acético) 100 mL/vinho	ÁLCOOL DO VINHO % (V/V)	ÁCIDEZ VOLÁTIL (mg. Ac. Acético) 100mL/cachaça	ÁLCOOL NA CACHAÇA % (V/V)	AUTORES
JUR11	0,27 \pm 0,23	40,33 \pm 7,59	6,10 \pm 0,9	60,91 \pm 13,06	46,31 \pm 4,34	
ERC10B	0,28 \pm 0,13	35,16 \pm 10,89	6,05 \pm 0,8	50,61 \pm 11,91	47,98 \pm 2,57	
JEN11	0,22 \pm 0,12	40,78 \pm 6,84	5,65 \pm 2,80	61,99 \pm 16,16	46,77 \pm 6,09	
JUR16	0,20 \pm 0,16	39,63 \pm 5,59	5,22 \pm 2,70	87,61 \pm 13,21	45,68 \pm 2,24	
*LBCM 670	0,25 c	9,00 a	8,00 b	32,70 \pm 5,9	—	BARBOSA <i>et al.</i> ,
*LBCM 671	1,25 a	6,00 b	8,00 ab	15,1 \pm 6,8		2016

*As leveduras LBCM 670 e 671 (BARBOSA *et al.*, 2016) foram usadas como referências pois seguiu a mesma metodologia e as mesmas condições de produção do experimento

5.2 - Análise sensorial

A análise sensorial é uma importante metodologia que verifica atributos da bebida de forma integrada, ressaltando como seus componentes interagem entre si e conseguindo identificar diferentes padrões de formação de aromas e sabores, tarefa ainda não realizadas com sucesso por aparelhos eletrônicos (MUNOZ, *et al.*, 1992).

Na avaliação visual, todas as cachaças produzidas apresentaram características dentro dos padrões do destilado como: alta transparência, aspecto brilhante, presença de oleosidade nas bordas do copos, aromas suaves e agradáveis e formação de pequenas bolhas no momento de agitação. Todas as características citadas são relacionadas a uma cachaça de qualidade.

A análise sensorial foi realizada após aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (Anexo 1). Nos quesitos aroma, acidez, frutado e impressão global, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 5), recebendo as notas entre 6 e 7 “gostei ligeiramente e gostei regularmente”. O resultado foi satisfatório visto que a avaliação ocorreu antes do tempo de “descanso de garrafa” que leva de 2 a 3 meses após a produção dos destilados. Esse tempo é importante para organizar as substâncias organolépticas presentes na cachaça e melhorar o sabor do destilado (MIRANDA, 2005). De Moura e colaboradores (2020), analisaram cachaças produzidas por diferentes leveduras da espécie *S. cerevisiae* e o resultado de aceitação entre os provadores aumentou quando as cachaças ficaram em “descanso” a partir de três meses. Os atributos de sabor e aroma das cachaças produzidas pelas leveduras dos frutos e folhas se mostraram próximos a cachaças produzidas por diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, que apresentaram um intervalo de aceitação de 5,40 a 6,21 no aroma e 6,62 a 6,68 no sabor (SILVA *et al.*, 2006).

No quesito acidez, as médias obtidas pelas cachaças ficaram entre 5 e 6 “nem gostei/nem desgostei e gostei ligeiramente” não diferenciando estatisticamente entre elas. Esta avaliação tem relação com o resultado de teor de acidez presente na cachaça. O ácido acético quando encontrado em altas concentrações diminuem a aceitação dos provadores porque causa um sabor mais “pungente” na bebida sendo características de cachaças de baixa qualidade.

Em relação a impressão global, as notas dadas as cachaças produzidas também não se diferenciaram estatisticamente, apresentando um resultado entre 6 e 7, “gostei ligeiramente e gostei regularmente”. Esse resultado leva em consideração a harmonização dos atributos avaliados. Mesmo com o pouco tempo de descanso e o teor alcoólico perto do limite aceitável, fatores que contribuíram para o sabor forte da bebida, quando somadas as três maiores notas respondidas pelos degustadores no quesito aceitação (as notas 6, 7 e 8 que caracterizam a expressão “gostei ligeiramente” a “gostei muito”) as cachaças tiveram a aprovação de mais de 58% dos degustadores sendo que a levedura JUR11 apresentou uma aceitação de 68,3% e a JEN11, ERC10B e JUR 16 tiveram a aceitação de 63,3%, 61,7% e 58,3%, respectivamente. Também, mais de 50% dos provadores optaram entre “provavelmente compraria e certamente

compraria o produto. O conjunto de resultados da análise sensorial foram satisfatórios levando em conta que a espécies empregadas não são comumente utilizadas e ainda desconhecidas na produção do destilado.

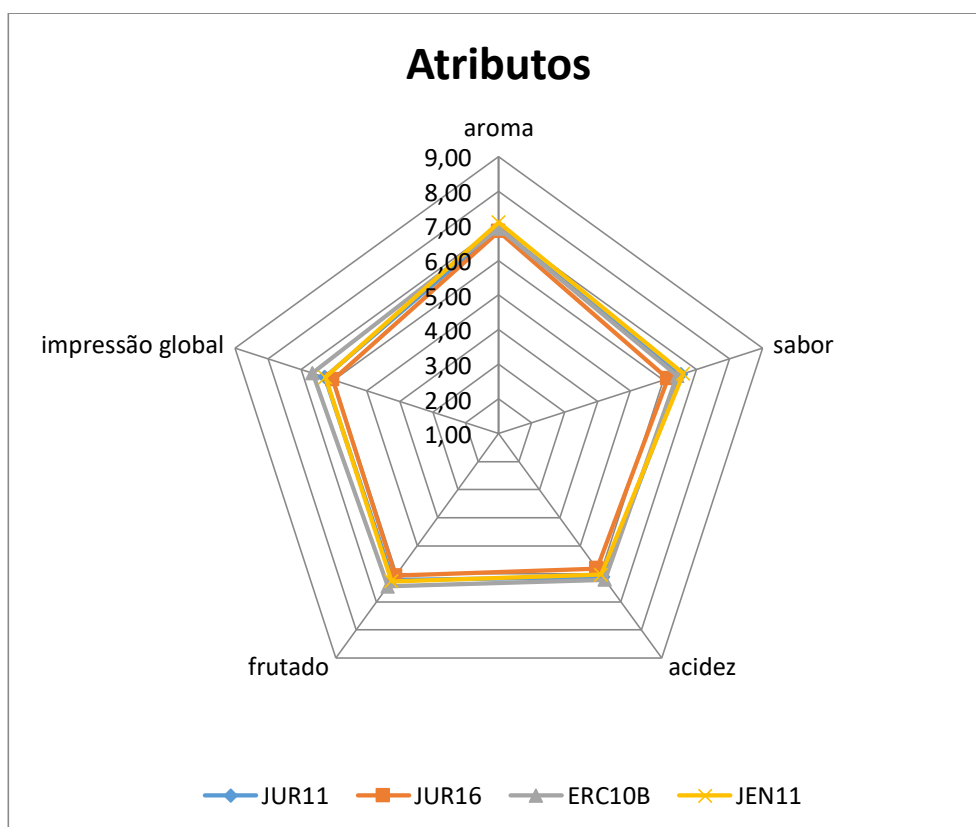


Figura 5: Notas relacionadas aos atributos avaliados pelos degustadores nas cachaças produzidas pelas leveduras JUR11, JUR16, ERC10B e JEN11

5.3 - Perfil de voláteis das cachaças

Em função da complexidade da composição química das bebidas, as técnicas cromatográficas têm sido muito usadas para conhecer e quantificar substâncias que compõem os perfis de voláteis presentes nas cachaças e servem como ferramentas de fiscalização para verificar as concentrações presentes na bebida (SERAFIN, 2018; DUNN; ELLIS, 2005).

Em nenhuma das cachaças produzidas pelas leveduras selecionadas foi detectada a presença de contaminantes orgânicos (metanol, 1-butanol e 2-butanol) (Tabela 3). Este resultado é muito importante, pois sua presença na bebida é indesejável e insalubre. Quando essas substâncias estão presentes na bebida, com concentrações acima do permitido pela legislação, o consumo frequente pode ocasionar cegueira e até mesmo a morte (CARDOSO, 2013). O metanol tem origem da ação de enzimas pectinametilsterase produzidas pelas

leveduras devido a presença das fibras do bagaço da cana no momento da fermentação (MOTA *et al.*, 2010). O cuidado na separação dos bagacilhos do caldo é muito importante e evita a produção do metanol. Os outros contaminantes monitorados, tem atribuição de bactérias acetobutílicas, que podem proliferar no vinho no momento da fermentação (MAIA; CAMPELO, 2006). A detecção do 1-butanol e 2-butanol, está diretamente relacionada aos cuidados de higiene na produção das cachaças e a ação das leveduras presentes no pé-de-cuba, que devem iniciar rapidamente o processo fermentativo limitando o acesso de nutrientes aos microrganismos contaminantes presentes naturalmente no caldo-de-cana (CAMPOS *et al.*, 2010).

O acetaldeído é um composto intermediário no processo fermentativo, que ao ser detectado pelo consumidor reflete odores fortes e enjoativos a bebida. Quando essas concentrações estão acima do permitido podem causar mal-estar, dores de cabeça, vômitos e a famosa “ressaca” (SILVA *et al.*, 2020, CARDOSO, 2013). Os resultados quantificados de acetaldeído presentes nas cachaças foi de 12,20 ($\pm 3,04$) para JUR16, para a JEN11 foi de 19,48 ($\pm 1,35$) e por último as leveduras JUR11 com 26,05 ($\pm 2,94$) e ERC10B com 24,71 ($\pm 2,94$) (Tabela 3). Parte da produção desse metabolito secundário, ocorre durante a multiplicação das leveduras na etapa primária da fermentação e normalmente vai desaparecendo gradualmente nas etapas finais do processo fermentativo em virtude da reutilização deste composto pelas próprias leveduras na produção de energia para o seu metabolismo. A alta presença de acetaldeído pode ter origem da oxidação dos álcoois superiores ou atividades de bactérias contaminantes (PEREIRA *et al.*, 2003, YOKOYA, 1995). Alcarde e Bortolletto (2015), em levantamento amplo, analisaram os perfis de voláteis de 268 cachaças e aguardentes comercializados no Brasil. Com isso, obtiveram resultados de concentração de acetaldeído abaixo de 30 mg de acetaldeído em 100 mL de álcool anidro. Em contradição, SILVA (2009), ao analisar os voláteis produzidos por 6 cepas de diferentes alambiques de Minas Gerais, verificaram a presença de acetaldeído acima dos valores recomendados pela legislação. Caruso e colaboradores (2008) estudando cachaças comercializadas em São Paulo, verificou que das 60 amostras avaliadas, 31 estavam fora dos limites aceitáveis de acetaldeído.

Na produção de álcoois superiores (Tabela 3), a concentração de n-propanol nas cachaças produzidos com as leveduras selecionadas foi abaixo de 23,61 ($\pm 0,71$) e acima de 15,66 ($\pm 0,33$) mg de propanol em 100 mL de a.a. Em relação ao isobutanol, a levedura ERC10B produziu maior concentração entre as leveduras, com 58,50 ($\pm 2,39$) mg de isobutanol em 100 mL de a.a. O isolado JUR16 produziu 39,11 ($\pm 1,59$) de isobutanol e as leveduras

JUR11 e JEN11 não apresentaram diferenças estatísticas entre si com a produção 30,62 ($\pm 2,3$) para primeira levedura e 26,57 $\pm 5,27$ para segunda. Entre os álcoois superiores, destacou-se a produção de álcool isoamílico. As leveduras JUR16 e ERC10B não apresentaram diferenças estatísticas entre si com a presença de 156,90 ($\pm 1,86$) mg de álcool isoamílico em 100 mL de a.a. para primeira e 147,46 ($\pm 6,88$) para segunda, enquanto a cachaça fermentada com a JUR11 produziu 110,71 ($\pm 6,86$) e a JEN11 com 53,59 ($\pm 0,34$). Esses compostos têm origens a partir da degradação de aminoácidos, principalmente da L-leucina e valina para isobutanol e álcool isoamílico e da treonina para n-propanol. A formação dessas substâncias está vinculada ao tipo de levedura e o cuidado na fermentação (ALCARDE, 2017 e PEREIRA *et al.*, 2003, YOKOKA, 1995). Esses três compostos formam os álcoois fúseis, que fazem parte dos sabores e aromas específicos do destilado provocando ao degustador a sensação de aquecimento. Altas concentrações destes compostos tornam o sabor da bebida desagradável e causam dores de cabeça ao consumidor (WHITE, ZAINASCHEFF, 2020; CARDOSO, 2013; MAIA; CAMPELO, 2006).

Na avaliação de acetato de etila, a concentração produzida entre as leveduras JUR11 e ERC10B não mostraram diferenças estatísticas entre si, com média de 50,18 ($\pm 3,36$) e 47,87 ($\pm 3,39$) mg de acetato de etila em 100 mL de a.a. respectivamente, enquanto as leveduras JUR16 produziram 36,52 ($\pm 1,58$) e JEN11 32,39 ($\pm 1,55$), também sem diferenças estatísticas entre si. O acetato de etila é o éster mais representativo na cachaça, ao lado dos álcoois superiores esta como um dos principais voláteis produzidos na fermentação e juntos tem a maior influência no sabor e aroma na bebida. A concentração produzida está associada ao metabolismo de cada tipo de levedura, sendo obtido pela ação de enzimas acetiltransferases, que ligam um álcool (podendo ser um do tipo superior) a um substrato Acetil-CoA (SILVA, 2019). A presença de acetato de etila confere um sabor de frutas agradável ao destilado, porém, quando encontrados em altas concentrações, proporcionam um sabor enjoativo que prejudica a aceitação da bebida pelo consumidor (WINDHOLZ, 1976).

Tabela 3: Perfis de metabólitos secundários quantificados produzidos pelas leveduras selecionadas com referências de outros estudos em cachaças e aguardentes

LEVEDURAS	AC. VOLÁTIL ÁC. ACÉTICO	ALDEÍDO ACETALDEÍDO	ÉSTER ACET. ETILA	ALCÓOIS SUPERIORES			CONTAMINANTES			AUTORES
				N- PROPANOL	ALC. ISOBUTÍLICO	ALC. ISOAMÍLICO	METANOL	1- BUTANOL	2- BUTANOL	
mg/100 mL de álcool anidro										
JUR11	60,91(±13,06)	26,05 (±2,94)	55,96 (±26,76)	19,83 (±0,71)	30,62 (±2,39)	110,71 (±6,86)	ND	ND	ND	
ERC10B	50,61(±11,91)	24,71(±2,94)	76,32 (±3,70)	23,61 (±0,71)	58,50 (±2,39)	147,46 (±6,88)	ND	ND	ND	
JEN11	61,99(±16,16)	19,48 (±1,35)	64,83 (±27,28)	16,97 (±0,88)	26,57 (±5,27)	53,59 (±0,34)	ND	ND	ND	
JUR16	87,61(±13,21)	12,20 (±3,04)	89,89 (±38,53)	15,66 (±0,33)	39,11 (±1,59)	156,90 (±1,86)	ND	ND	ND	
CA-11(LNF)	42,27(±2,13)	18,16 (±2,02)	17,83(±0,81)	89,15 (±1,21)	57,91(±1,94)	191,58(±7,01)	8,26(±0,16)	1,66(±0,05)	3,14 (±0,06)	SILVA <i>et al.</i> , 2020
<i>M. guillemontii</i>	—	150,00	8,00	—	280,00	200,00	—	—	—	NOVA
<i>M. caribbica</i>	—	70,00	4,00	—	230,00	300,00	—	—	—	<i>et al.</i> , 2009
*IN 13/2005	<150	<30	< 200	—	—	—	<20	< 3	< 10	BRASIL/2005

*Instrução Normativa 13/2005, ND-Não detectado, ----- não foi realizado, ND- Não detectado

Poucos trabalhos verificam a aplicabilidade de leveduras não convencionais em escala piloto como desenvolvido nesse estudo. Nova e colaboradores (2009), avaliaram leveduras em testes laboratoriais de *Meyerozyma guillemontii* e *caribbica* isoladas de pé de cubas originárias da cana-de-açúcar e seus resultados mostraram comportamento completamente diferentes das nossas cepas, mesmo elas sendo pertencentes ao mesmo gênero (Tabela 3). As leveduras do estudo de Nova produziram maiores concentrações de acetaldeído, álcool isoamílico e isobutanol quando comparadas as leveduras utilizadas neste estudo, sendo não detectada a presença de n-propanol. Na produção de acetato de etila, essas leveduras produziram concentrações abaixo das encontradas dos nossos resultados. Silva e colaboradores (2020), quando utilizou leveduras selecionadas e convencionais *Saccharomyces cerevisiae* (CA-11) mostrou que quando comparados com os resultados das leveduras selecionadas dos frutos e folhas do Cerrado, as concentrações de voláteis secundários são inferiores (Tabela 3). Quanto as concentrações de álcoois superiores produzidas pelos isolados dos frutos e folhas, mostraram-se abaixo dos resultados de Nova *et al.*, (2009) e Silva *et al.*, (2020). O somatório de n-propanol, álcool isoamílico e álcool isobutanol nas cachaças produzidas pela CA-11 foi de 338,64 mg em 100 mL de a.a., sendo que na levedura JEN11 essa produção alcançou 97,13, na JUR11 com 161,16, na JUR16 com 211,67 e a que produziu maior concentração foi a ERC10B com 229,67. Em relação a presença de acetato de etila, as leveduras do nosso estudo apresentaram menores concentrações nas cachaças quando comparados a CA-11. As quantidades de voláteis presentes influenciam diretamente no resultado sensorial da bebida e suas interações são

responsáveis por produzir características positivas e singulares ao produto (ELIODÓRIO *et al.*, 2019).

6 - CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados deste estudo deixam clara a viabilidade da utilização das leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 isoladas de frutos e folhas nativos do Cerrado para produção de cachaça. Os destilados produzidos tiveram um consumo baixo de sólidos e solúveis em comparação as leveduras tradicionais utilizadas na produção de cachaça, porém houve a aprovação de mais de 58% entre os degustadores e todos os parâmetros analisados da cachaça se enquadraram nas normas atuais da legislação. Os estudos e aplicações destes tipos de leveduras estão em fase inicial, e os resultados apresentados já demonstraram que a JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 apresentaram perfis de metabolitos secundários relacionados ao sabor e aroma são diferentes das leveduras tradicionais utilizadas na produção de cachaça. Parcerias com outras leveduras em processos co-fermentativos podem contribuir para formação de uma cachaça com mais sabor e aroma, atraindo e fidelizando o consumidor. Por fim, este estudo contribuiu para melhorar o entendimento sobre as leveduras não convencionais e mostrar suas aplicações no o setor de bebidas, demonstrando o grande potencial científico escondido no Cerrado brasileiro, bioma muito negligenciado pelos pesquisadores.

7- REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14141. Escalas utilizadas em análise sensorial e de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. Determinação do teor alcoólico –NBR 138920. São Paulo: ABNT, 1997a.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856. São Paulo: ABNT, 1997b.

ABRAS - Associação Brasileira de Supermercados. Disponível em <http://abras.com.br/clipping.php?area=10&clipping=68830> acessado dia 9/08/2019.

ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. Editora Blucher, 2017.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO, A. E. S. Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 355-360, 2011.

AMORIM, H. V.; GRYSCHER, M.; LOPES, M. L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane–fuel ethanolindustry. In: Eggleston G, ed. Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries. ACS symposium series. Washington: **American Chemical Society**. v. 1058 p.73–82, 2010.

BARBOSA, E. A., SOUZA, M. T. D., DINIZ, R. H. S., GODOY-SANTOS, F., FARIA-OLIVEIRA, F., CORREA, L. F. D. M., BRANDÃO, R. L. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **Journal of Applied Microbiology**, 121, n. 4, p. 1038-1051, 2016.

BORTOLETTO, A. M., ALCARDE, A. R. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. **Food Control**, v. 54, p. 1-6, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa 13/2005- Disponível <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=76202> acessado em 12/11/2019.

CAMPOS, C. R., SILVA, C. F., DIAS, D. R., BASSO, L. C., AMORIM, H. V., SCHWAN, R. F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3.ed. Lavras: UFLA, 2013.

CARUSO, M. S. F., NAGATO, L. A. F., ALABURDA, J. Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 1, p. 28-33, 2008.

CERIBELI, D. L., SILVA, D. F. D., QUEIROZ, I. G. D., FERREIRA, C. L., CORONEL, D. A., LÍRIO, V. S. Orientação regional e competitividade do agronegócio da cachaça para a Alemanha e os Estados Unidos. **Revista de Política Agrícola**, 19, n. 3, p. 21-32, 2010.

DE ARAÚJO VICENTE, M.; FIETTO, L. G.; DE MIRANDA CASTRO, I.; DOS SANTOS, A. N. G. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

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

DUARTE, F. C., CARDOSO, M. D. G., SANTIAGO, W. D., MACHADO, A. M. R., NELSON, D. L. Brazilian organic sugarcane spirits: physicochemical and chromatographic profile. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 288-295, 2017.

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

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

ELIODÓRIO, K. P., E CUNHA, G. C. D. G., MÜLLER, C., LUCARONI, A. C., GIUDICI, R., WALKER, G. M., BASSO, T. O. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. In: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, p. 61-119, 2019.

FERNANDES, O. W. B. **Avaliação da composição físico-química da cachaça de alambique obtida de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação**. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS** yeast research, 8, n. 7, p. 979-995, 2008.

FRANÇA, L. F. S., DE OLIVEIRA, F. M., JÚNIOR, A. F., GUIMARÃES FILHO, O., MEIRELES, W. A. Representação matemática da correlação entre acidez total no “vinho” e acidez volátil na cachaça. **Revista Agrogeoambiental**, v. 2, n. 3, 2010.

GONÇALVES, CLEBER MIRANDA; ROSA, CARLOS AUGUSTO; UETANABARO, ANA PAULA TROVATTI. **Manual de Boas Práticas: Cachaça de Alambique**. Bahia- Ilhéus: Editus, 2009.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. 132 p. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MAIA, A. B. R. A., & CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE/MG: SINDBEBIDAS, 2006.

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

MUNOZ, A. J., CIVILLE, G. V., CARR, B. T. **Sensory evaluation in Quality Control**. Van Nostrand Reinhold. New York, 1992.

NETO, L., MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2005.

NOVA, M. X. V., SCHULER, A. R. P., BRASILEIRO, B. T. R. V., MORAIS JR, M. A. Yeast species involved in artisanal cachaca fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009.

PATARO, C., SANTOS, A., CORREA, S., MORAIS, P. B., LINARDI, V. R., ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 2, p. 104-108, 1998.

PATARO, C., GUERRA, J. B., PETRILLO-PEIXOTO, M. L., MENDONÇA-HAGLER, L. C., LINARDI, V. R., ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 24-31, 2000.

PENTEADO, J. C. P.; MASINI, J. C. Heterogeneidade de álcoois secundários em aguardentes brasileiras de diversas origens e processos de fabricação. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1212-1215, 2009.

PEREIRA, N. E., CARDOSO, M. D. G., AZEVEDO, S. M. D., MORAIS, A. R. D., FERNANDES, W., AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, 2003.

PORTUGAL, C. B., DE SILVA, A. P., BORTOLETTO, A. M., Alcarde, A. R. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça?. **Food Research International**, v. 91, p. 18-25, 2017.

QUILTER, M. G., HURLEY, J. C., LYNCH, F. J., MURPHY, M. G. The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 1, p. 34-40, 2003.

SALES, A. C. Registro de estabelecimento, equipamentos para produção e controle de operação de aguardente. In CARDOSO, M. G. (ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2021.

SCHWAN, R. F.; CARVALHO, F. P.; DIAS, D. R.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. das. (Ed.). **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

SERAFIM, F. A. O papel da cromatografia no controle de qualidade, conformidade e na rastreabilidade das aguardentes. **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v. 10 n.4, p. 230-242, 2018.

SILVA, A. P. D., SILVELLO, G. C., BORTOLETTO, A. M., ALCARDE, A. R. Composição química de aguardente de cana obtida por diferentes métodos de destilação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

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

SILVA, C. L. C.; VIANNA, C. R.; CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; GOMES, F. C. O.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 131, n. 2-3, p. 203-210, 2009.

SILVA, C.H.P.M. **Microbiologia da Cerveja**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2019.

SILVA, P. H. A. D., SANTOS, J. D. O., ARAÚJO, L. D., FARIA, F. C., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, V. A. D., BRANDÃO, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 100-106, 2009.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2016.


VICENTE, M.A. Caracterização **Molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação da cachaça de alambique**. 124 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

WINDHOLZ, M. The Merck index an encyclopedia of chemical and drugs. In: **The Merck index an encyclopedia of chemical and drugs**. 1976.

YOKOYA, F. Fabricação da aguardente de cana. In: **Fabricação da aguardente de cana**. p. 92-92, 1995.

8- ANEXOS

8.1- Parecer da CEP

<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS NATIVOS DO CERRADO PARA FABRICAÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE
Pesquisador: Daniela Caetano Cardoso
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 12775219.1.0000.5146
Instituição Proponente: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO NORTE
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 3.332.800
Apresentação do Projeto:
A pesquisa tem o objetivo de testar a capacidade de leveduras isoladas de frutos nativos do cerrado mineiro na fabricação de cachaça artesanal de alambique avaliando a aceitabilidade do produto através da análise sensorial. A pesquisa é qualitativa e quantitativa. O teste de aceitação será realizado com 65 provadores.
Objetivo da Pesquisa:
Testar a capacidade de leveduras isoladas de frutos nativos do cerrado mineiro na fabricação de cachaça artesanal de alambique avaliando a aceitabilidade do produto através da análise sensorial
Avaliação dos Riscos e Benefícios:
A autora indica que há risco mínimo do provador não gostar do sabor e/ou aroma das cachaças fabricadas com frutos nativos do cerrado. Os benefícios são produzir uma cachaça de qualidade com levedura de fontes diferentes das comumente utilizadas que possa oferecer notas sensoriais diferenciadas e agregar mais valor regional as cachaças do norte mineiro por causa do cerrado e seus frutos.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
O projeto apresenta relevância científica e adequação ética. A metodologia está adequada. O cronograma de execução está dentro do prazo.
<p>Endereço: Av. Dr. Rui Braga s/n-Camp. Univers. Prof. Darcy Rib Bairro: Vila Maurício CEP: 39.401-080 UF: MG Município: MONTES CLAROS Telefone: (38)3229-8180 Fax: (38)3229-8103 E-mail: smelocosta@gmail.com</p>
Página 01 de 03

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MONTES CLAROS -
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 3.332.800

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A autora apresenta folha de rosto devidamente preenchida e TCLE adequado.

Recomendações:

Apresentação de relatório final por meio da plataforma Brasil, em "enviar notificação".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto respeita os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos, sendo assim somos favoráveis à aprovação do mesmo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:


Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1335873.pdf	22/04/2019 17:19:01		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TemoConsentimento.docx	22/04/2019 17:09:29	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	22/04/2019 16:35:37	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Img20190417_18562743.pdf	22/04/2019 16:33:32	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Img20190417_18545147.pdf	22/04/2019 16:32:53	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Img20190417_18534233.pdf	22/04/2019 16:32:10	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Img20190417_18512454.pdf	22/04/2019 16:30:48	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Img20190417_18502112.pdf	22/04/2019 16:30:16	Daniela Caetano Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoAssinada.pdf	22/04/2019 16:27:17	Daniela Caetano Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Dr. Ruy Braga s/n-Camp. Univers. Profª Darcy Rib
Bairro: Vila Maurício CEP: 39.401-080
UF: MG Município: MONTES CLAROS
Telefone: (38)3229-8180 Fax: (38)3229-8103 E-mail: amelocosta@gmail.com

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MONTES CLAROS -
UNIMONTES**



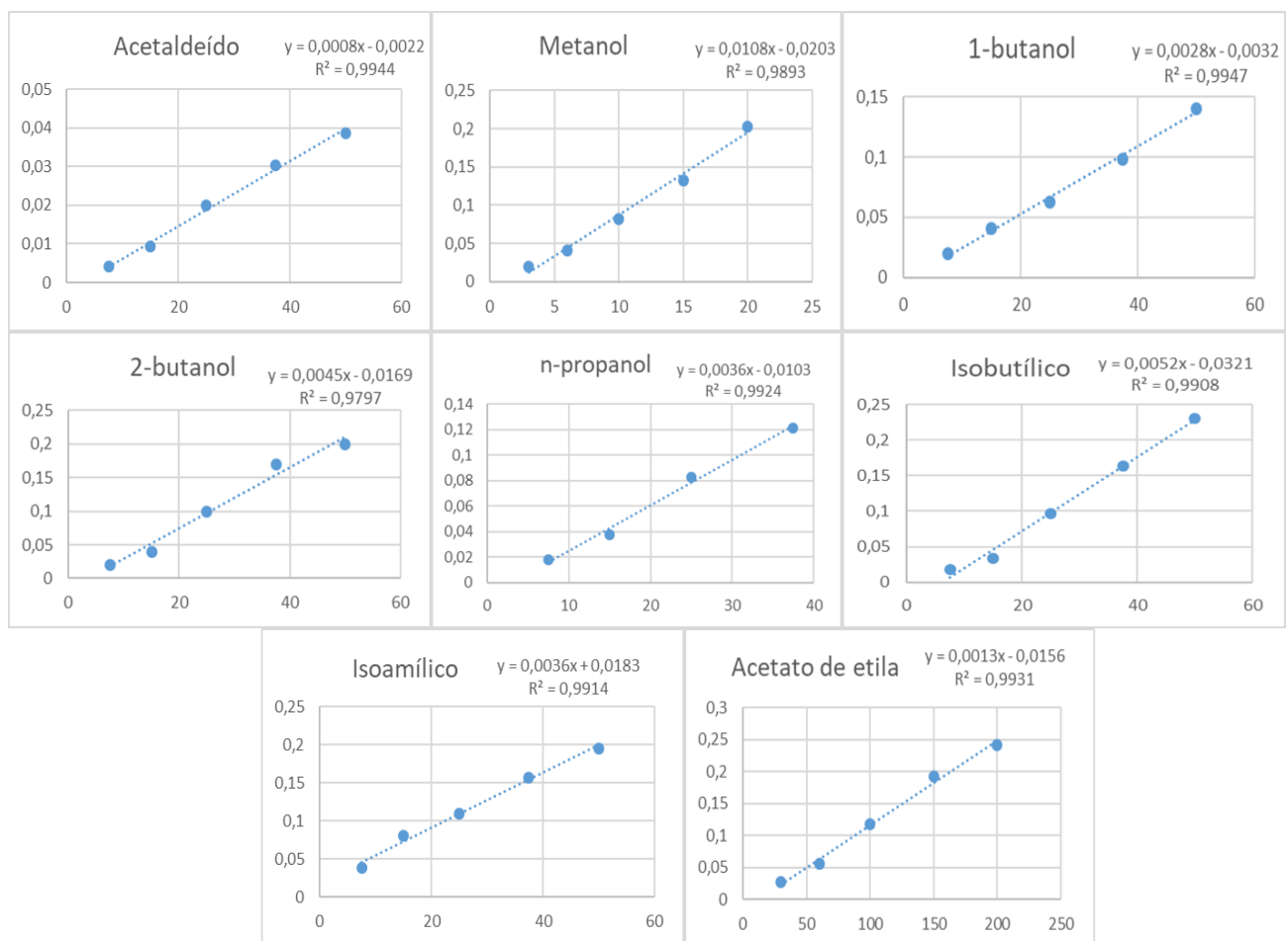
Continuação do Parecer: 3.332.800

**Necessita Apreciação da CONEP:
Não**

MONTES CLAROS, 17 de Maio de 2019

**Assinado por:
SIMONE DE MELO COSTA
(Coordenador(a))**

8.2 - Curva padrão das análise de voláteis



CAPÍTULO 3: Produção de cervejas em escala laboratorial com leveduras selecionadas de frutos e folhas do cerrado

1 - INTRODUÇÃO

A cerveja é, atualmente, a bebida fermentada mais consumida no mundo. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2021 houve um aumento de 12% no registro de cervejarias se comparado ao ano de 2020 (ANUÁRIO DA CERVEJA, 2021). O atual consumidor tem enfrentado desafios no consumo da cerveja, pois está se tornando ciente dos malefícios causados pelo álcool na sua saúde e no âmbito social. Outrossim, do risco de transgredir leis cada vez mais rígidas (Lei Seca, N°11.705 de 2008) de consumo de álcool no trânsito (LIGUORI et al., 2018, BRASIL, 2008). Pelos motivos citados, muitas pessoas têm migrado para o consumo de cervejas de baixo teor alcóolico.

Esse estilo de cerveja vem ganhando espaço nas prateleiras europeias e no mercado brasileiro. Esse fenômeno advém de melhorias nas tecnologias de produção e investimentos em pesquisas que contribuíram para apurar a qualidade da cerveja, principalmente no quesito sabor e aroma. O desafio das pequenas e médias cervejarias é a aquisição de equipamentos de desalcoolição que necessitam de um alto investimento financeiro e se tornam um empecilho para a produção deste tipo de cerveja. Nesse sentido, uma possibilidade mais acessível para ampliação da produção de cervejas de baixo teor alcóolico e que não mudaria a rotina de produção das fábricas seria o uso de leveduras especiais que não metabolizassem maltose (principal carboidrato presente no mosto cervejeiro (SILVA, 2019) e que fornecesse concentrações de metabolitos voláteis que agregassem sabor e aroma).

O Cerrado é um bioma rico em diversidade, principalmente de frutos endêmicos que possuem boas condições para o desenvolvimento de leveduras (KLINK; MACHADO, 2005, ALMEIDA, 1998). Com essa premissa, foram isoladas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Norte de Minas Gerais, campus Salinas 37 leveduras de 6 frutos do Cerrado Mineiro: *Psidium firmum* (araçá); *Genipa americana* (jenipapo); *Passiflora setácea* (maracujá de veado); *Talisia esculenta* (pitomba); *Pouteria ramiflora* (curriola) e *Ananas comosus* (abacaxi do cerrado), todos colhidos na cidade de Grão Mongol em MG, e folhas da espécie *Stachytarpheta cassiae* S. Atkins (jurobão), vindas do Parque Estadual Rio Pardo, localizado na cidade de Rio Pardo de Minas. Todas essas leveduras passaram por uma série de testes bioquímicos relacionados a capacidade de produzirem cervejas. Dentre as leveduras testadas, apenas 4 foram selecionadas, a JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16. Os ensaios fermentativos foram realizados na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), no Laboratório de Biologia

Celular e Molecular (LBCM) e Laboratório de Massas, ambos responsáveis por vários estudos com leveduras e quantificação de substâncias produzidas em processos fermentativos.

Todos os isolados selecionados para essa etapa apresentaram resultados negativos em testes laboratoriais para fermentação de maltose, sendo esta uma característica positiva para produção de cerveja de baixo teor alcoólico. Além dessa resposta, a JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 apresentaram crescimento e fermentação na presença de glicose, sacarose e maltotriose, floculação, resistência a drogas relacionadas as vias de produção de voláteis aromáticos, produção negativa de H₂S e resistência ao estresse osmótico.

O objetivo deste trabalho é aplicar as leveduras selecionadas JUR11, ERC10B, JUR11 e JUR16, isoladas de frutos e folhas nativos do Cerrado mineiro, para produção de cerveja de baixo teor alcoólico. A partir desse pressuposto, foram necessários testes fermentativos, em escala laboratorial, para verificar a capacidade de baixa produção de etanol em diferentes condições, além da quantificação dos metabolitos relacionados ao sabor e aroma das cervejas.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Histórico e produção das cervejas

A origem da cerveja é muito antiga, documentos escritos por sumérios, na Mesopotâmia, datados entre 5.000 a 6.000 anos a.C, revelam as primeiras produções de cervejas. Os responsáveis pela disseminação da bebida pela Europa foram os celtas, por volta de 2.000 anos atrás. Em 1356 na Alemanha, a cerveja apresentava uma importante fonte econômica. Na cidade de Hamburgo já haviam sido registradas 457 cervejarias que fabricavam milhões de litros de cervejas por ano, empregando grande parte da população ativamente econômica e sendo responsáveis pela exportação da bebida para outras nações da Europa (MORADO, 2017). Um passo importante para assegurar a qualidade e característica da bebida foi dado em 23 de abril de 1516, quando o duque Guilherme IV da Baviera, promulgou a lei *Reinheitsgebot* (lei da pureza). Ela preconizava que a cerveja deveria ser produzida com apenas 4 matérias primas: água, malte de cevada e lúpulo. No início, não havia o conhecimento das leveduras e muito menos do seu papel na produção das cervejas. Somente no final de 1860 Louis Pasteur descobriu as leveduras e o seu papel no processo produtivo, a tornando um item obrigatório na fabricação da bebida. Posteriormente, as leveduras foram incorporadas como matéria prima na lei da pureza alemã. A *Reinheitsgebot* não vigora atualmente, porém, ainda é influência no país e em várias cervejarias espalhadas pelo mundo (MORADO, 2017).

No Brasil, a cerveja foi introduzida a partir da chegada da família real portuguesa em 1808, e somente em 1836, começou a fabricação nacional (ERTHOL *et al.*, 2007). A atual legislação brasileira para produção de cerveja está descrita na Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 65/2019 (BRASIL, 2019). É considerada cerveja a bebida produzida pela fermentação do mosto de cevada malteada ou extrato de malte por leveduras, adicionando o lúpulo nesse processo. Por causa da alta demanda dos produtores e a grande variedade nas receitas de cervejas, a partir de 2019 foi permitido adicionar adjuntos de origem animal, como mel e lactose (BRASIL, 2019).

A fabricação da cerveja é realizada em etapas. A primeira é chamada de mosturação. O processo inicia-se com a moagem dos grãos de cevada malteada, adicionando água aquecida, em temperaturas por volta de 60 °C a 70 °C. Essa etapa tem por finalidade expor o amido encontrado no interior das cevadas e solubiliza-la em água. Nessas condições, as enzimas α -amilase e β -amilase, presentes nos maltes de cevada irão agir no amido, o

convertendo em carboidratos mais simples que serão assimiladas pelas leveduras no processo fermentativo (SILVA, 2019 e EVANS *et al.*, 2005). Antes da próxima etapa, ocorre a filtração para a separação do bagaço do malte e outras impurezas. Na sequência, deve-se realizar a fervura para esterilização do mosto produzido. O tempo mínimo de fervura é de pelo menos 1 h. Nesse intervalo é adicionado o lúpulo (*Humulus lupulus*), que contém α -ácidos e óleos, responsáveis pelo amargor e aromas característicos da cerveja (HAZELWOOD *et al.*, 2010). Ao terminar a fervura, o mosto é resfriado à temperatura de inoculação da levedura, que vai iniciar o processo fermentativo. Na fermentação as leveduras convertem os carboidratos presentes no mosto em dois produtos metabólicos primários (o etanol e CO_2) e em vários outros produtos metabólicos secundários. Na última fase do processo de produção cervejeira, após a conclusão da fermentação, inicia-se a maturação. Esse período se caracteriza pela decantação das leveduras e a reabsorção de alguns compostos secundários produzidos na fermentação que são indesejáveis na bebida em altas concentrações, como o diacetil e acetaldeído (DUONG *et al.*, 2011). Terminada a maturação, a cerveja pode ser envasada em garrafas ou em barris com adição direta de CO_2 por cilindro ou por refermentação das leveduras residuais, adicionando uma solução a base de açúcar simples. O fluxograma do processo é apresentado na Figura 1.

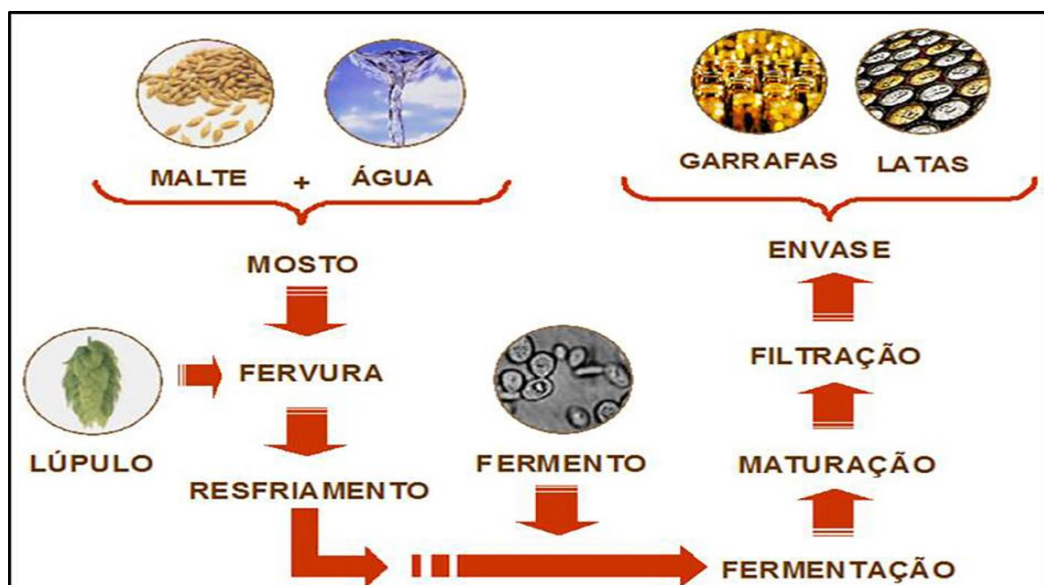


Figura 1: Fluxograma resumido das etapas de fabricação da cerveja até o momento do envase. Fonte: ROSA; AFONSO, 2015

Existem dois grandes grupos ou famílias de cervejas, as mais antigas chamadas de *Ales* e as mais novas chamadas de *Lagers* (AQUARONE *et al.*, 2001). As *Ales* têm como

característica uma fermentação mais vigorosa, ocorrendo em temperaturas mais altas, por volta de 15 °C a 24 °C. Suas leveduras geralmente localizam na parte superior do mosto. Nas cervejas *Lagers*, o processo fermentativo é mais lento e calmo, ocorrendo em temperaturas mais baixas, no intervalo de 8 °C a 12 °C. As leveduras *Lagers* geralmente localizam-se na parte inferior do mosto (SAERENS *et al.*, 2010). As espécies de leveduras mais utilizadas para produção de cerveja pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Nas cervejas *Lagers*, são geralmente utilizadas espécies *Saccharomyces uvarum*, por outro lado, nas cervejas *Ales* as leveduras são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (AQUARONE *et al.*, 2001). Esse comportamento de localização espacial das leveduras no mosto cervejeiro ainda não está totalmente esclarecido. Alvarez e colaboradores (2014), estudaram o comportamento floculativo de leveduras das espécies *Saccharomyces*, isoladas de destilarias de cachaça e foi verificado que este comportamento é relacionado por variáveis além das características genéticas, como por exemplo, as condições de densidade e temperatura encontradas no mosto (ALVAREZ *et al.*, 2014). A Figura 2 ilustra a diversidade de estilos de cervejas que se ramificam a partir destas duas famílias.

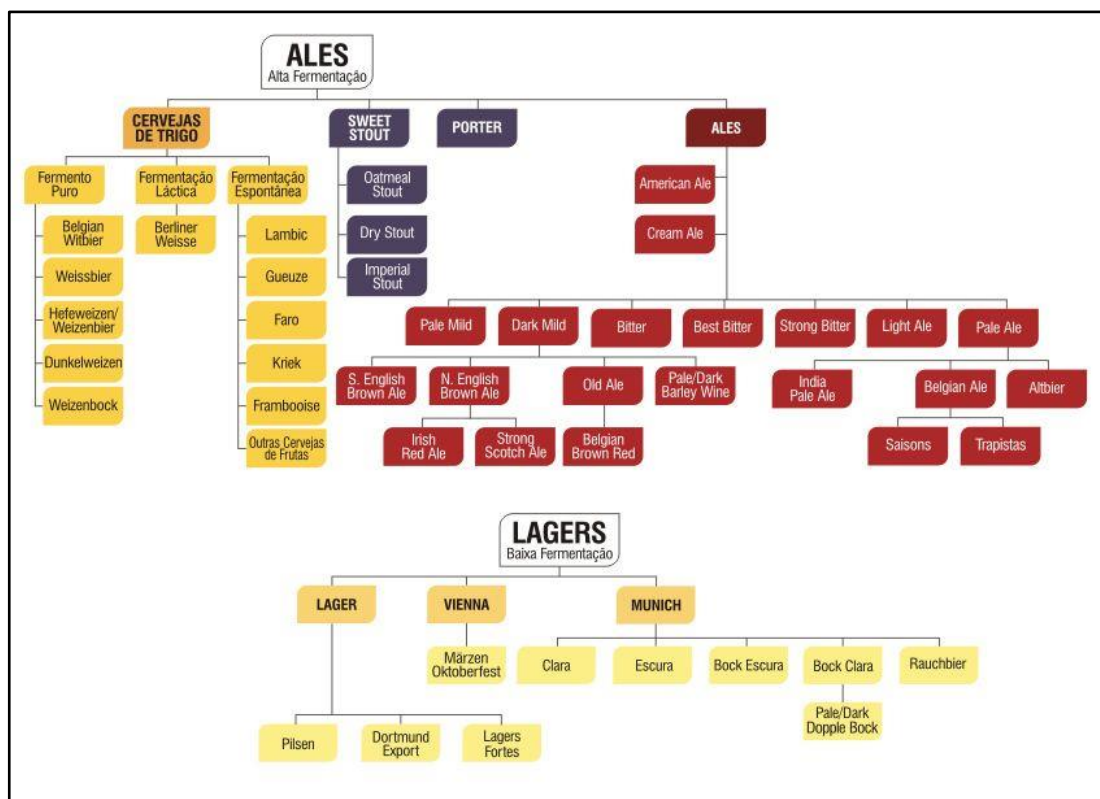


Figura 2: Fluxograma mostrando uma pequena variedade de estilos de cervejas a partir das duas famílias: Lager e Ale. Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/395964992213811790/>

2.2 - Cervejas de baixo teor alcoólico

Atualmente existem diversos estilos de cervejas (Figura 2). Elas trazem diferentes sabores e aromas em virtude da ampla variedade de matérias primas utilizadas em suas receitas (MORADO, 2017). Atualmente há um público considerável que gosta de consumir cerveja, mas ao mesmo tempo estão preocupados com os efeitos do álcool no organismo humano e seus problemas causados na sociedade (LIGUORI *et al.*, 2018, THIERAUF *et al.*, 2010 e BRÁNYIK *et al.*, 2012). Por causa destes questionamentos, a cerveja de baixo teor alcoólico vem ganhando muito espaço entre os consumidores mundiais, incluindo os brasileiros (DE FRANCESCO *et al.*, 2015). Os motivos relatados para o aumento do consumo desse tipo de cerveja foram atribuídos a leis mais rigorosas no trânsito que não permitem dirigir após o consumo de álcool e o estilo de vida mais saudável. O consumo excessivo de álcool pode levar problemas na gravidez, aumento de peso e dificuldades no convívio social (LIGUORI *et al.*, 2018, MORADO, 2017). A cerveja com baixo teor alcoólico além de evitar os problemas citados anteriormente, contém diversas substâncias benéficas à saúde, como polifenóis, fibras solúveis, maltodextrina, silício, proteínas, aminoácidos, vitaminas além de favorecer a eliminação de substâncias indesejadas pelo organismo (IMHOF *et al.*, 2014).

No entanto, há algumas questões relacionadas à aceitação da cerveja com baixo teor alcoólico. O produto é muito criticado pelos consumidores por causa do seu sabor e aroma. Muitas dessas cervejas apresentam uma alta doçura no seu sabor, devido ao alto teor de açúcares residuais presentes na bebida. O outro problema está relacionado a falta de sabor e ao aroma, distanciando das características encontradas nas cervejas tradicionais. Estes resultados negativos muitas vezes são ocasionados pela metodologia aplicada em suas fabricações (MADSEN, 2017).

Nos últimos 5 anos, com a melhoria e desenvolvimento de novas metodologias na produção desse estilo de cerveja, ocorreu um grande ganho de qualidade, refletindo consequentemente em uma rápida e maior assimilação de mercado, aumentando cerca de 80% no consumo deste estilo de cerveja (LIGUORI *et al.*, 2018). Nos tempos hodiernos, grandes fábricas tradicionais do setor cervejeiro estão investindo fortemente nessa tendência, disponibilizando várias opções de produtos para o mercado consumidor (CATALISI, 2021). Em países como a Bélgica, as cervejas com baixo teor alcoólico já são responsáveis por 2,1% do mercado consumidor. A Espanha, possui o maior mercado consumidor mundial, com 17,7%, e a Alemanha, país mais tradicional na fabricação de cerveja, as cervejas de baixo

teor alcoólico já ocupam cerca de 10,4% das vendas (FORBEER, 2014). No Brasil, o hábito de consumir cerveja de baixo teor alcoólico cresceu 5% em 2015, contra 3% dos anos de 2010 a 2014, chegando a ser responsável por 1% das vendas de cerveja no país, com um faturamento de setenta bilhões de reais por ano e uma produção de 14 bilhões de litros de cerveja (SALLES, 2015). Com a melhoria da qualidade das cervejas sem álcool, se expandem as possibilidades para a exploração de grandes mercados consumidores. A exemplo disso, estão os países árabes que possuem barreiras religiosas, culturais e legais muito fortes contra o consumo de bebidas com teor alcoólico.

Na produção da cerveja de baixo teor alcoólico não há modificação nos insumos básicos e nas etapas de preparo, seguindo os mesmos procedimentos da produção de cervejas tradicionais. O que é modificado no processo é o tipo de levedura utilizada ou o tratamento dado ao fermentado. Basicamente existem duas vias para essa retirada ou diminuição da produção do teor álcool. A retirada pode ser realizada por métodos físicos ou métodos biológicos. A Figura 3 mostra as principais metodologias para produção de cerveja de baixo teor alcoólico.

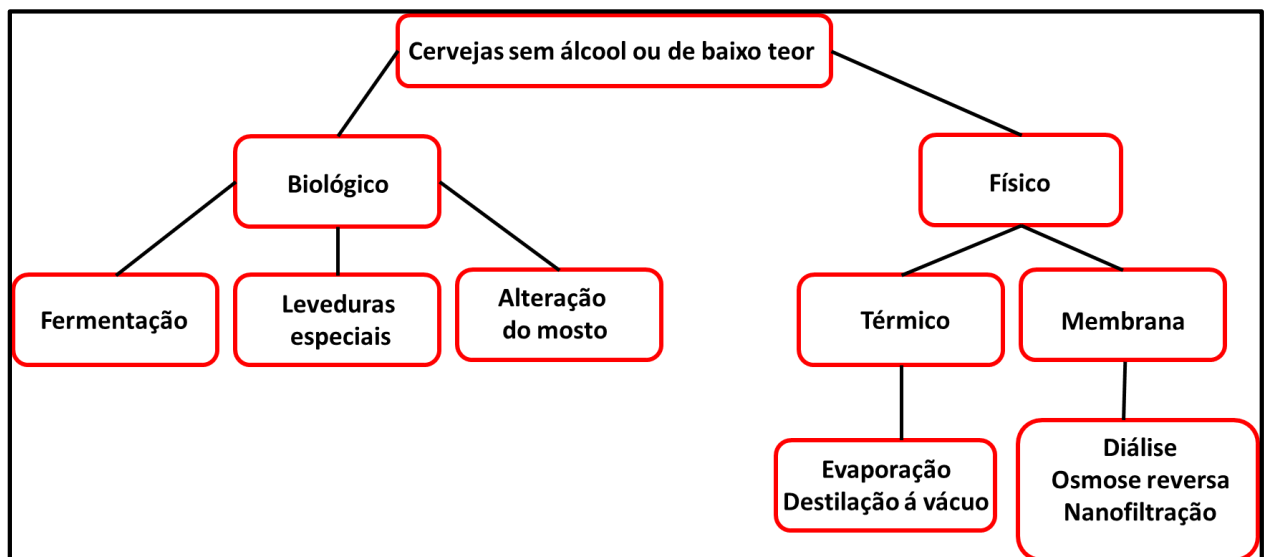


Figura 3: Organograma com as principais metodologias biológicas e físicas utilizadas no processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico em cervejas. Adaptado de GÜZEL e colaboradores (2020)

Pelo método biológico há uma interrupção do processo fermentativo. Uma maneira utilizada é a separação das leveduras do fermentado, por filtros ou centrifugação, antes do consumo total dos carboidratos presentes no mosto. Essa estratégia de interromper parcialmente a fermentação gera menores quantidades de álcool na bebida. Outra forma biológica, seria aumentar as temperaturas de mosturação, a fim de minimizar o efeito das

enzimas amilases, que agem no amido presente no malte, disponibilizando para as leveduras menores concentrações de açúcares e por isso uma menor conversão em álcool (SENAI, 2014; VENTURINI FILHO, 2016). Por fim, a utilização de leveduras especiais, não habilitadas a metabolização de maltose, principal carboidrato presente no mosto cervejeiro (SILVA, 2019).

Pelos métodos físicos, a separação do álcool acontece após ocorrer normalmente o processo fermentativo. Uma opção usada para separação do álcool é o processo de destilação da cerveja. O teor alcoólico é removido por aquecimento (MÜLLER *et al.*, 2017). Por causa das alterações significativas no sabor e na perda de aroma das cervejas que também são removidos com a utilização deste procedimento, houve uma necessidade de apuração dessa metodologia. Atualmente a destilação é conduzida sob vácuo, conseguindo extrair o álcool da cerveja em temperaturas menores, diminuindo um pouco dos problemas relatados anteriormente (ANDRÉS IGLESIAS *et al.*, 2015). Um outro processo físico é por evaporação em camadas. As cervejas ficam em tanques com temperaturas por volta de 30 °C a 40 °C, distribuídas ao longo de superfícies rotativas cônicas, expostas a uma força centrífuga que as distribui em camada finas, causando a evaporação rápida do álcool. Após a realização da retirada do álcool, a cerveja é transferida para outro tanque, sendo ajustada a quantidade de água perdida e CO₂ por carbonatação forçada (VENTURINI FILHO, 2016). A outra maneira de retirar o álcool fisicamente é pela utilização de membranas semipermeáveis, com diferenças de temperaturas, concentração ou pressão. Desta maneira, somente a água e outros compostos de baixa massa molecular atravessam, mantendo a maior parte de substâncias na cerveja sem a presença do álcool. Com base nessa mesma linha de separação, o álcool pode ser removido por meio da difusão de diferentes concentrações de solução e por osmose reversa. A passagem da cerveja ocorre devido a um gradiente de pressão. Nessas metodologias, as temperaturas de trabalho são muito mais baixas, entre 1 °C a 6 °C. O que permite manter a maior parte do aroma e sabor da bebida (LIGUORI *et al.*, 2018, MANGINDAAN *et al.*, 2018). A nanofiltração é a separação utilizando uma membrana polimérica semipermeável de 0,0005 µm acionada por pressão. Dessa forma, o fermentado é separado do álcool causando menor interferência nas características de sabor e aroma (JOHNSON; NGUYEN, 2017).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Testar as leveduras selecionadas dos frutos *Genipa americana* (jenipapo - JEN11), *Pouteria ramiflora* (curriola - ERC10B) e folhas *Stachytarpheta cassiae* S. Atkins (Jurobão - JUR11 e JUR16) nativos do Cerrado para produção de cervejas em escala laboratorial com baixo teor alcoólico.

3.2.- Objetivos específicos

- Realizar testes fermentativos em escala laboratorial com as leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 utilizando meios laboratoriais e mostos cervejeiros com diferentes mosturações;
- Quantificar a concentração de metabólitos secundários relacionados ao sabor e aroma;
- Avaliar a influência dos lúpulos na produção do etanol utilizando as leveduras selecionadas;
- Quantificar o etanol presente nas cervejas produzidas pelas leveduras selecionadas.

4 - METODOLOGIA

4.1 - Desempenho fermentativo estimado por perda de peso em meios laboratoriais

As 4 leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 foram utilizadas para os testes de desempenho fermentativo estimado por perda de peso. Cada levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose), incubadas a 30 °C, sob agitação durante 24 h. Esse cultivo foi transferido para 150 mL do mesmo meio, incubado nas mesmas condições citadas anteriormente durante 48 h. Após esse período foi verificado a densidade óptica (DO) a 600 nm da suspensão de células com o auxílio de um espectrofotômetro. As fermentações foram realizadas em escala laboratorial, em triplicata. Foi utilizado fermentadores (Figura 4B) com 100 mL de YP maltose (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 10% de maltose) (Vetec®) e 100 mL de extrato de malte a 10% (Kasvi®). As leveduras foram inoculadas em uma concentração de DO de 3.0 a 600 nm (equivalente a 3×10^7 células) nas temperaturas 15 °C, 18 °C e 25 °C, sem agitação e por 96 h. Como controle foi utilizada a levedura *Nottingham* (LalBrew®). O desempenho fermentativo foi avaliado de acordo com a perda de peso aferido todos os dias, no mesmo horário, utilizando a fórmula de estimativa de produção de etanol (CONCEIÇÃO, 2015).

4.2 - Desempenho fermentativo por perda de peso com mosto cervejeiro

A preparação do inóculo seguiu a metodologia descrita em 4.1. O mosto cervejeiro foi produzido pelo modo *Brew in a Bag* (BIAB) (Figura 4A). Os insumos utilizados foram malte base e água mineral. A densidade final do mosto foi ajustada para 1.020 (em temperatura de 20 °C) e a mosturação realizada a 70 °C. Para inoculação das leveduras, o mosto foi resfriado em banho de gelo para 18 °C. Uma alíquota de 100 mL do mosto preparado foi transferida para os fermentadores (Figura 4B). Em cada dispositivo foi inoculado uma concentração de levedura com DO de 3.0 a 600 nm, a 18 °C, sem agitação por 168 h. Como controle foi utilizado a levedura *Nottingham* (LalBrew®). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O desempenho fermentativo foi monitorado todos os dias, no mesmo horário, com medição de perda de peso, utilizando a fórmula aplicada da metodologia de Conceição e colaboradores (2015).



Figura 4: (A) produção do mosto cervejeiro em escala laboratorial pelo método BIAB, (B) fermentadores utilizados para realização do experimento em escala laboratorial.

4.3 - Análise de voláteis secundários produzidos em fermentado cervejeiro

Os metabólitos secundários voláteis produzidos nos processos fermentativos (metodologia 4.2) pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16, foram quantificados com um cromatógrafo a gás, acoplado com detector de ionização de chamas (CG-DIC), modelo Varian CP-3380 (Palo Alto, EUA), configurado de acordo com Quadro 1. Os compostos quantificados foram: álcoois superiores: n-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico; ésteres: acetato de isoamila, acetato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila; aldeído: acetaldeído e cetona: diacetil.

Quadro 1: Configurações utilizadas no cromatógrafo modelo Varian CP-3380 para análise de metabólitos voláteis secundários produzidos pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 nos fermentados. Fonte: Adaptado de ARAUJO, 2013

Tipo de coluna	DB- WAX (polietilenoglicol, 60m x 0,25mmx 0,25µm)
Modo de injeção	Splitless por 2 min, Split: 1/30.
Gás de arraste	Hidrogênio (99,9990%)
Temperatura do injetor	225 °C
Temperatura do detector	280 °C
FID	N2 (gás make up): 29 mL/min, H2: 30 mL/min e Ar: 300 mL/min
Rampa	50 ° C (5 min.) subindo até 100 °C (5 min.), a uma rampa de 5 ° C/min subindo a 250 °C (3 min.) a 30 ° C/min
Tempo total	24.5 min

Para análise quantitativa foi construída uma curva analítica (Anexo 8.1), utilizando como padrões substâncias com grau de pureza acima de 99% (Sigma®). Foram construídas cinco faixas de concentrações. Foi usada como referência a concentração usualmente encontrada

nas cervejas tradicionais (AGRARIA, 2021, PIRES *et al*, 2014, SENAI, 2014). Foi adicionado 20 μ L de n-pentanol (Sigma®) como padrão interno (PI) a uma concentração final de 0,2% v/v. Cada ponto da curva foi preparado e injetado em triplicata.

Para as análises das amostras, foram transferidas 5 mL de cada fermentado produzido para *vials*, totalmente vedados, com 20 μ L de padrão interno n-pentanol (Sigma®). Posteriormente os *vials* foram aquecidos em banho maria a 60 °C, por 25 min extraíndo 5 mL dos gases produzidos por uma seringa do tipo *gastight* e imediatamente injetado no cromatógrafo. Para determinar a concentração dos voláteis, foi calculado a relação entre as áreas dos picos das amostras e do padrão interno. Os valores dos resultados foram apresentados em mg/L (adaptado de ARAÚJO, 2013).

4.4 - Preparação do mosto

O mosto cervejeiro foi produzido pelo modo BIAB. Os ingredientes utilizados foram malte de cevada básico, água mineral, os lúpulos Columbus e Amarelo (LNF®) e as leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16. A densidade inicial do mosto foi ajustada para 1.020 em temperatura de 20 °C. O primeiro mosto produzido seguiu as temperaturas mais tradicionalmente utilizadas na produção de cerveja, com a primeira rampa de temperatura a 50 °C por 5 min e a segunda de 66 °C por 40 min. Esse mosto foi dividido em dois frascos e cada um ficou 1,5 L. Na etapa da fervura em apenas um dos frascos foi adicionado 2 g do lúpulo Columbus, nos 10 min iniciais e mais 2 g de lúpulo amarelo nos 10 min finais, para que a cerveja tivesse aproximadamente 30 IBU (unidade internacional de medida de amargor). A produção do segundo mosto seguiu os mesmos procedimentos da produção de mosto anterior porém com a primeira temperatura de mosturação a 50 °C por 5 min e a segunda a 70 °C, por 40 min. Esse mosto também foi dividido em dois frascos de 1,5 L, e em apenas um deles foi adicionado os mesmos lúpulos, nas mesmas quantidades do ensaio anterior.

Ambos os mostos foram resfriados com auxílio de gelo até que alcançassem a temperatura de 18 °C e foram transferidos 100 mL para os fermentadores (Figura 4B). A inoculação da levedura seguiu a metodologia 4.1. Os fermentadores foram mantidos em estufa, a 18 °C, sem agitação por 168 h. Como controle foi utilizado a levedura Nottingham (LalBrew®). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A fermentação foi acompanhada pela medição de perda de peso diariamente, no mesmo horário, conforme metodologia de Conceição e colaboradores (2015).

4.5 - Quantificação do teor alcoólico em cervejas produzidas com diferentes mosturações

Para quantificação do etanol foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo 8040 – Shimadzu®, com coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm), com detector de índice de refração RID-10A (Shimadzu®), injetor automático SIL-20AC (Shimadzu®) e bomba LC-20AB (Shimadzu®). O tempo de corrida da fase móvel foi de 30 min e o eluente utilizado foi H₂SO₄ a 0,005 mol.L⁻¹, com um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, operado a 55 °C. Para injeção no equipamento, os fermentados e cervejas foram filtrados em filtros de 0,22 µm de politetrafluoretileno (PTFE), armazenados e congelados em microtubos de 2 mL em duplicata a -20 °C. Para construção da curva analítica, foi utilizado um padrão de etanol, com grau de pureza acima de 99% (Sigma®). A solução padrão foi preparada a partir de 1 g/L. Essa solução foi diluída em 10 pontos para construção da curva padrão. Este procedimento foi realizado em triplicata. As amostras das cervejas e fermentados foram diluídas por 2 vezes com fase a móvel utilizada. Os resultados foram apresentados em teor alcoólico % (v/v).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - Testes de desempenho fermentativo

As 4 leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 foram submetidas as fermentações em escala laboratorial, nos meios YP maltose 10% e extrato de levedura a 10%, em temperaturas de incubação de 15°C, 18 °C e 25 °C. Na temperatura de 15 °C, as leveduras JEN11, JUR11 e JUR16 apresentaram 0,052% de teor alcoólico (v/v) enquanto a ERC10B produziu 0,079% de teor alcoólico (v/v). A levedura controle NOT produziu 0,675% de teor alcoólico (v/v). Quando a temperatura foi aumentada para 18 °C, o comportamento fermentativo das leveduras JEN11, JUR11 e NOT se mantiveram iguais aos obtidos na temperatura de 15 °C. A ERC10B diminui o seu rendimento fermentativo em relação ao ensaio anterior com a produção de 0,052% de teor alcoólico (v/v). A JUR16 aumentou a produção de teor alcoólico no fermentado com 0,079%. Na temperatura de 25 °C, as 4 leveduras testadas melhoraram seus rendimentos fermentativos. A JUR16 produziu 0,178% de teor alcoólico (v/v) enquanto as leveduras ERC10B e JUR11 produziram 0,152% de teor alcoólico (v/v). A JEN11 apresentou a menor porcentagem com 0,099% de teor alcoólico. A levedura NOT aumentou seu rendimento para 1,390% de teor alcoólico (v/v) (Figura 5).

Nos ensaios fermentativos com o meio YP maltose 10%, os resultados mostraram que as leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 não assimilam maltose como fonte de energia, independente da temperatura de incubação. Essa afirmação fica mais clara quando seus resultados são comparados com os da levedura controle NOT (Figura 5). Essa baixa capacidade da metabolização da maltose é uma característica importante para leveduras candidatas a produção de cervejas de baixo teor alcoólico, visto que esse é o principal carboidrato presente no mosto cervejeiro, com cerca de mais de 50% de sua composição de carboidratos (SILVA, 2019 e SENAI, 2014). Alguns motivos sugerem a falta de capacidade da utilização da maltose. A primeira seria as mudanças ocorridas nos mecanismos de transporte ativo (permeases) presentes na membrana plasmática das leveduras, para a interiorização da maltose (ZASTROW *et al.*, 2001). Essa mudança pode ter sido ocasionada por causa da exposição das leveduras as condições oferecidas pelo mosto para produção da cerveja. O outro motivo seria a ausência ou a falta da ativação dos genes *MAL*. São 5 *loci MAL* espalhados pelo genoma das leveduras. O *MAL1* se localiza no cromossomo VII; o *MAL2*, está presente no cromossomo III; o *MAL3*, no cromossomo II; o *MAL4* no cromossomo XI; e por último o *MAL6* localizado no cromossomo VIII. Estes genes são responsáveis pela codificação do transportador

de maltose presente na membrana plasmática (permeases), da enzima maltase e de proteínas que induzem a expressão dos genes MAL quando a maltose está presente no meio. Em *Saccharomyces cerevisiae*, para metabolização da maltose é necessário a ativação de pelo um desses genes (NEEDLEMAN, 1991; NOVAK *et al.*, 2004).

No teste fermentativo realizado com extrato de malte 10% incubado a 15 °C, mostrou-se que a JUR11 produziu 0,026% de teor de álcool (v/v) enquanto a JEN11 apresentou a resposta de 0,046% de teor de álcool (v/v), a JUR16 com 0,112% de teor de álcool (v/v), a ERC10B com 0,211% de teor de álcool (v/v) e a NOT com 1,01 de teor de álcool (v/v). Ao avaliar o desempenho fermentativo do experimento a 18 °C, as leveduras JEN11 e a JUR11 aumentaram para 0,066% e 0,033% os seus teores de alcoólicos (v/v), respectivamente. As leveduras ERC10B produziram a maior porcentagem com 0,092% teor de álcool (v/v) e a NOT manteve a maior produção com 1,020% teor de álcool (v/v). Em 25°C todas leveduras melhoraram seus desempenhos fermentativos quando comparadas com as outras temperaturas testadas. A levedura JUR11 produziu 0,390% teor de álcool (v/v), a JEN11 e JUR16 apresentaram o mesmo resultado com 0,251% teor de álcool (v/v) e por último a ERC10B com 0,211% teor de álcool (v/v). A levedura NOT aumentou um pouco mais seu rendimento para 1,126% teor de álcool (v/v). Todos os resultados dos testes fermentativos por perda de peso estão demonstrados na Figura 5.

O conjunto de resultados obtidos nos ensaios de fermentação com estimativa de peso utilizando extrato de malte apresentaram um melhor rendimento fermentativo quando comparado ao YP maltose 10%. Os resultados, se relacionados com a levedura controle (NOT), foram bem inferiores, reforçando a baixa ou negativa metabolização de maltose (Figura 5). O extrato de malte é um substrato que pode ser utilizado na produção de cerveja conforme a legislação vigente (IN 69/2019). Sua composição é formada majoritariamente de maltose (cerca de 70%), nitrogênio (1,30%) e aminoácido (0,40%) (KASVI®). Por essas características, as respostas obtidas nestes testes fermentativos são importantes para antecipar o comportamento das leveduras no processo de fabricação das cervejas de baixo teor alcoólico.

Outro parâmetro importante analisado foi a melhor temperatura de incubação para inoculação das leveduras. Pois, para produção de cerveja de baixo teor alcoólico os melhores resultados apresentados ficaram entre as temperaturas de 15°C a 18 °C. Essa condição pode ser considerada uma vantagem porque não haveria necessidade de realizar grandes mudanças nos protocolos de temperatura comumente utilizados na produção das cervejas com maior porcentagem de álcool que estão entre 12 °C a 18 °C (SENAI, 2014).

De acordo com as respostas obtidas destes testes, foi verificado que todas leveduras utilizadas são candidatas a produção de cervejas com baixo teor alcoólico quando incubadas a 15 °C e 18 °C. Os próximos ensaios foram realizados a 18 °C, pois essa temperatura apresentou baixo rendimento alcoólico e é muito utilizada na produção de grande parte dos estilos de cerveja.

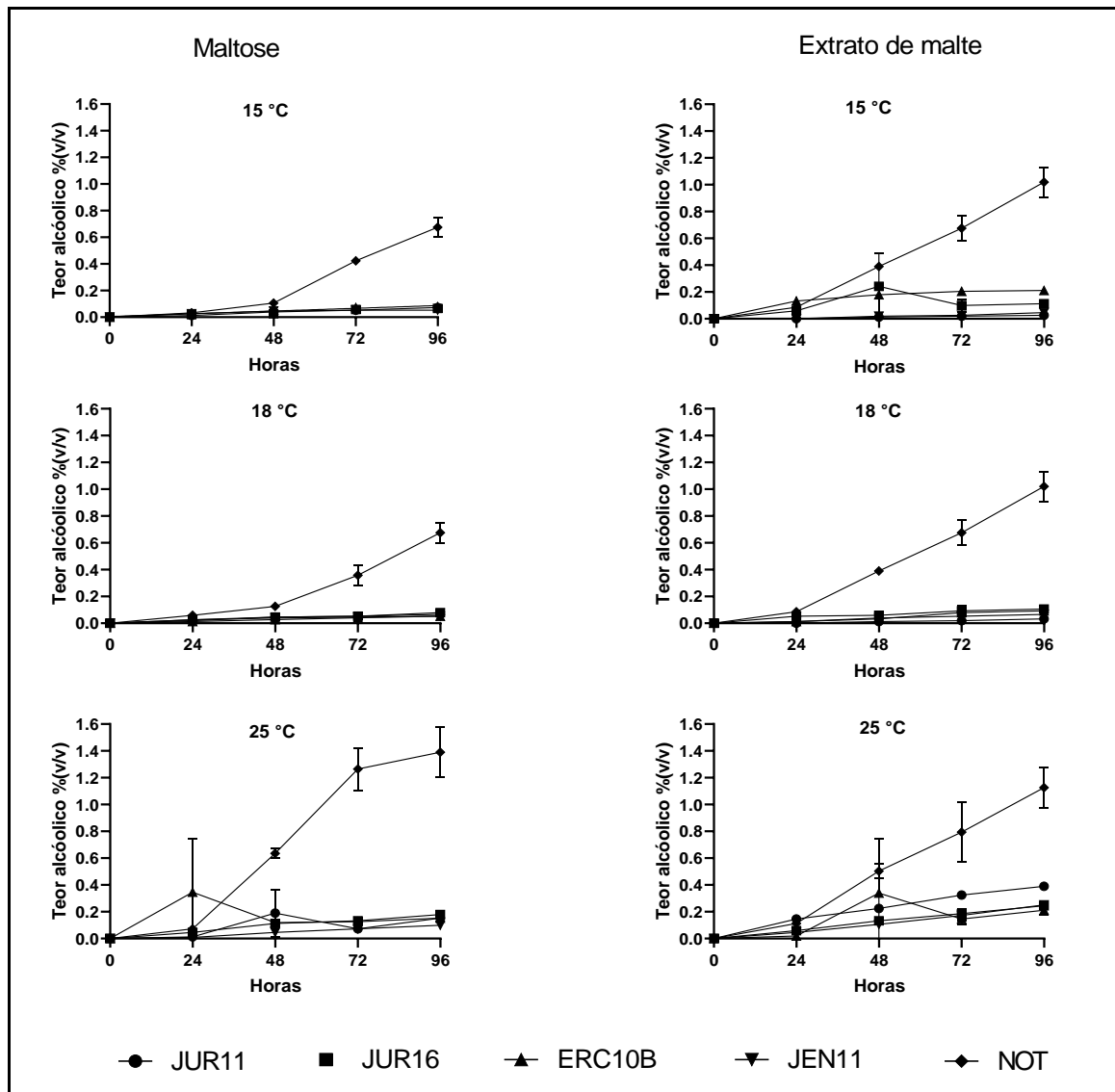


Figura 5: Testes fermentativos preliminares de produção estimada de teor alcoólico em %(v/v) em meios laboratoriais YP maltose 10% e extrato de malte 10% por perda de peso pelas leveduras selecionadas JUR11, JUR16, ERC10B, JEN11 e a levedura controle Nottingham (NOT) por um período de 96 horas em diferentes temperaturas

5.2 - Produção estimada de álcool em mosto cervejeiro

Na avaliação estimada de etanol produzido pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 incubadas a 18°C em mosto cervejeiro mostrou-se uma baixa produção de teor alcoólico, repetindo o comportamento dos testes anteriores quando foram utilizados os meios YP maltose 10% e extrato de malte a 10%. As porcentagens alcoólicas produzidas pelas 4 leveduras testadas ficaram abaixo de 0,5% de teor alcoólico (v/v). A levedura JEN11 obteve maior rendimento fermentativo quando comparado as demais, com 0,445% de teor alcoólico (v/v). A ERC10B e JUR16 apresentaram resultados próximos de 0,385% e 0,375% (v/v), respectivamente. A JUR11 produziu um pouco menos, com 0,345% (v/v). A levedura controle NOT obteve uma produção bem maior com 3,245% de teor alcoólico (v/v) (Figura 6).

O mosto cervejeiro tem uma natureza mais complexa e rica em sua constituição se comparados ao YP maltose 10% e possui diferentes concentrações de substratos ao serem comparados com o extrato de malte 10%, que já são definidos em sua formulação (KASVI®). As temperaturas de mosturação utilizadas, o tipo de malte e a qualidade da moagem interferem na composição do mosto, produzidos a partir dos grãos de malte. Esses fatores podem aumentar ou diminuir a oferta de carboidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e vitaminas interferindo no corpo da cerveja (MALLETT, 2022, SENAI, 2014). O mosto produzido com densidade 1.020 em temperatura de 70 °C, teve a função de evitar maior ativação da beta amilase (enzima responsável em quebrar o amido em carboidratos mais simples como a maltose (SENAI, 2014) e com isso diminuir o aspecto “doce”, uma característica prejudicial ao sabor da cerveja) que possui temperatura ótima de 66 °C,

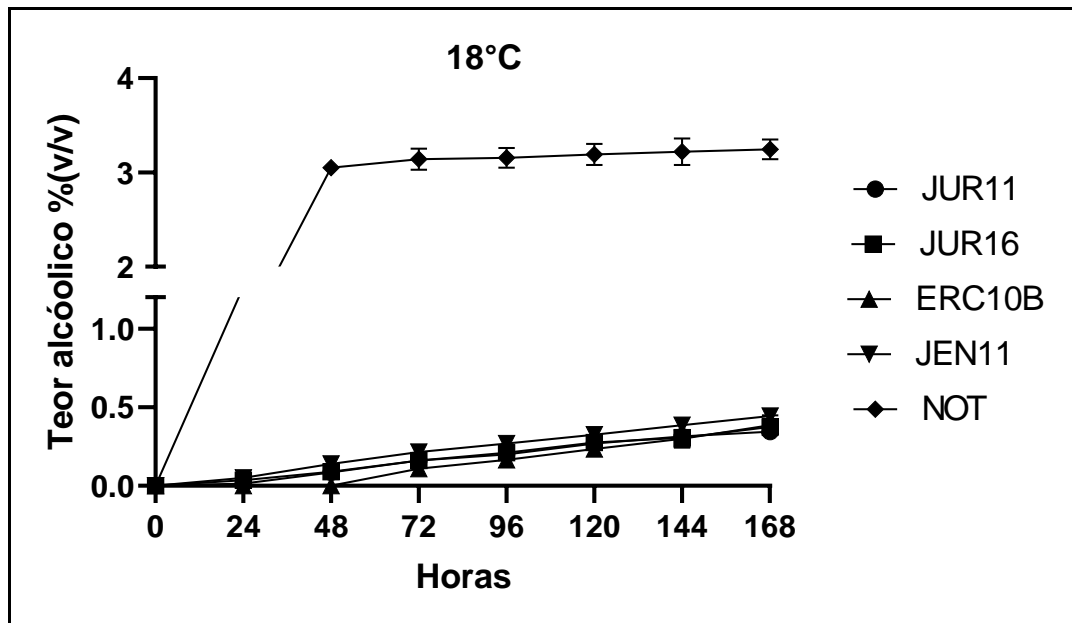


Figura 6: Produção estimada de teor alcoólico em % (v/v) no mosto cervejeiro em escala laboratorial pelas leveduras selecionadas JUR11, JUR16, ERC10B, JEN11 e levedura controle Nottingham (NOT) por um período de 168 h a temperatura de 18 °C.

Vários trabalhos vêm procurando testar leveduras não convencionais com assimilação negativa de maltose para produção de cerveja de baixo teor alcoólico. Albertin e colaboradores (2014), utilizaram a cepa *Torulasporea delbrueckii* isolada de fermentação espontânea de vinho para produção de cervejas com baixo teor alcoólico. Essa levedura demonstrou a capacidade de converter sacarose presente no mosto do vinho em moléculas de glicose e frutose que foram absorvidas para seu metabolismo celular, porém não conseguiam incorporar a maltose. De Francesco e colaboradores (2015), utilizaram espécies de leveduras isoladas de uvas em fermentações de pequena escala em mosto de cervejas com densidade de 1.048, fermentando a 20 °C e obtiveram uma produção alcoólica entre 0,51% a 1,36% (v/v) em teor alcoólico. Esses resultados foram acima ao dos encontrados pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR11. Outra levedura descoberta a partir do isolamento do mosto da produção do vinho e recentemente muito utilizada para produção de cerveja de baixo teor alcoólico é a espécie *Saccharomycodes ludwigii* (CAPECE *et al.*, 2018). Sua característica é de não possuir atividade enzimática das invertases e maltases e por isso não assimilar maltose e nem converter a sacarose presente no mosto (VEJARANO, 2018). Narziss (1992), utilizou *Saccharomycodes ludwigii* em mosto com densidade aproximada de 1.046 e produziu uma cerveja com concentração alcoólica de 0,68% (v/v) de teor alcoólico, sugerindo que, se a concentração do mosto fosse menor, por volta de 1.030, alcançaria a concentração abaixo de 0,5% (v/v). Se os experimentos fossem conduzidos da mesma maneira, os resultados

poderiam ser compatíveis aos encontrados no estudo com aplicação das leveduras isoladas dos frutos e folhas do Cerrado.

Aplicar leveduras com a habilidade de não metabolizarem maltose facilita a produção de cerveja de baixo teor alcoólico. Essa característica dispensa métodos de separação física do álcool que necessitam de equipamentos de alto valor financeiro e muitas vezes prejudicam o sabor e aroma da cerveja diminuindo a aceitação entre os consumidores (BRÁNYIK et al., 2012).

5.3 - Metabólitos voláteis secundários

Foram analisados e quantificados metabólitos voláteis secundários produzidos pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16, em fermentados cervejeiros. As substâncias analisadas foram o n-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico, componentes dos álcoois superiores, acetato de isoamila, acetato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, que fazem parte dos ésteres, o acetaldeído pertencente ao aldeído e por último o diacetil que é dicetona vicinal. Todos os componentes citados são responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja.

O acetaldeído é um metabolito secundário volátil, precursor do álcool. Geralmente ele é produzido durante os 3 primeiros dias de fermentações, sendo posteriormente reabsorvido dentro do processo de maturação da cerveja. As concentrações produzidas pelas leveduras utilizada nesse estudo ficaram dentro dos parâmetros de referência encontrados nas cervejas produzidas com leveduras tradicionais, com produção média de 2 mg/L a 19 mg/L (SENAI, 2014). A JUR11 produziu 5,80 mg/L, a JUR16 com 6,53 mg/L, a ERC10B com 5,35 mg/L e por último a JEN11 com cerca de 8,65 mg/L (Figura 7). A alta concentração desse composto é indesejável na bebida, pois pode ocasionar intoxicação, dor de cabeça e um aroma desagradável, prejudicando a aceitação do consumidor.

Outro metabolito secundário importante e que afeta muito o sabor da cerveja é o diacetil. Essa substância tem origem a partir da metabolização da valina, que produz um composto intermediário chamado de acetolactato, que ao ser difundido para o meio externo sofre um processo de oxidação produzindo o diacetil (WHITE, 2020, VAN BERGEN *et al.*, 2016; LANDAUD, 1998). A concentração normalmente encontrada em cervejas comuns está entre 0,008 a 0,60 mg/L (AGRARIA, 2021). Os níveis quantificados pelas leveduras deste

experimento foram de 0,21 mg/L para JUR11, 0,16 mg/L para JUR16, 0,10 mg/L para ERC10B e por último a JEN11 com a produção de 0,06 mg/L (Figura 7). A alta concentração de diacetil promove um sabor amanteigado e gorduroso na cerveja depreciando a qualidade do produto.

Os álcoois superiores são outro grupo de metabólitos secundários de grande relevância na aceitação da bebida. Dentre eles os que estão mais presentes são n-propano, álcool isobutílico e álcool isoamílico. Seus limiares de detecção são considerados altos e tem influência no sabor característico do álcool, promovendo o aquecimento no paladar. Em nenhuma das cervejas foi detectado pela metodologia aplicada a presença de n-propanol, porém a concentração de álcool isobutílico e álcool isoamílico foram maiores do que os produzidos pela levedura controle. A NOT produziu 9,00 mg/L álcool isobutílico e 51,47 mg/L álcool isoamílico. A JUR11 produziu 10,39 mg/L de álcool isobutílico e 58,96 mg/L de álcool isoamílico, JUR16 produziu 10,39 mg/L de álcool isobutílico e 52,71 mg/L de álcool isoamílico, a ERC10B com 11,40 mg/L de álcool isobutílico e 64,15 mg/L de álcool isoamílico e a JEN11 foi mensurado 10,55 mg/L de álcool isobutílico e 47,40 mg/L de álcool isoamílico (Figura 7). Em todos fermentados as concentrações encontradas estão dentro da média encontrada em cervejas que possuem maior teor alcoólico. Nessas cervejas a produção de álcool isobutílico fica entre 4 a 14 mg/L e para o álcool isoamílico de 34 a 73 mg/L (SENAI, 2014). Assim, é desejável que as somas destes compostos fiquem abaixo de 100 mg/L, pois acima dessa concentração pode gerar ao degustador um aquecimento indesejado no momento do consumo e causar dores de cabeça (WHITE, 2020; SENAI, 2014). O somatório de álcoois superiores produzido pela levedura JEN11 foi de 57,95 mg/L, a JUR16 com 67,60 mg/L, a JUR11 com 69,35 mg/L e a que mais produziu foi a ERC10B com 75,55 mg/L.

O último grupo quantificado foram os ésteres. Esses compostos possuem grande influência na produção de notas frutadas e cítricas nas cervejas. Dentre os tipos de ésteres analisados não foi detectado pela metodologia o hexanoato de etila e decanoato de etila. O octanoato de etila produzido foi de 0,52 mg/L para ERC10B, 0,67 mg/L para as leveduras JUR11 e JEN11 e 1,00 mg/L produzida pela JUR16. A levedura controle NOT produziu 0,84 mg/L (Figura 7). As concentrações quantificadas deste composto encontradas nos experimentos estão acima dos valores médios detectados em cervejas comuns que ficam geralmente entre 0,04–0,53 mg/L (PIRES *et al.*, 2014). O acetato de etila é o éster com maior presença nas cervejas. A concentração produzida pela JUR11 foi de 32,44 mg/L, a JUR16 com 27,85 mg/L, a ERC10B com 28,39 mg/L, JEN11 com 32,60 mg/L e a NOT com 30,40 mg/L (Figura 7). Geralmente as concentrações encontradas em cervejas com maior teor

alcoólico ficam entre 9,0 a 35,0 mg/L e sua detecção pelo paladar humano é de 25 a 30 mg/L (SENAI; PIRES *et al.*, 2014). A presença de ésteres pode realizar um efeito matriz com outros componentes, potencializando sua influência no aroma e sabor e ainda promover uma identidade marcante ao produto final. No entanto, quando presentes em altas concentrações produzem sabores enjoativos e desagradáveis ao provador (PIRES *et al.*, 2014).

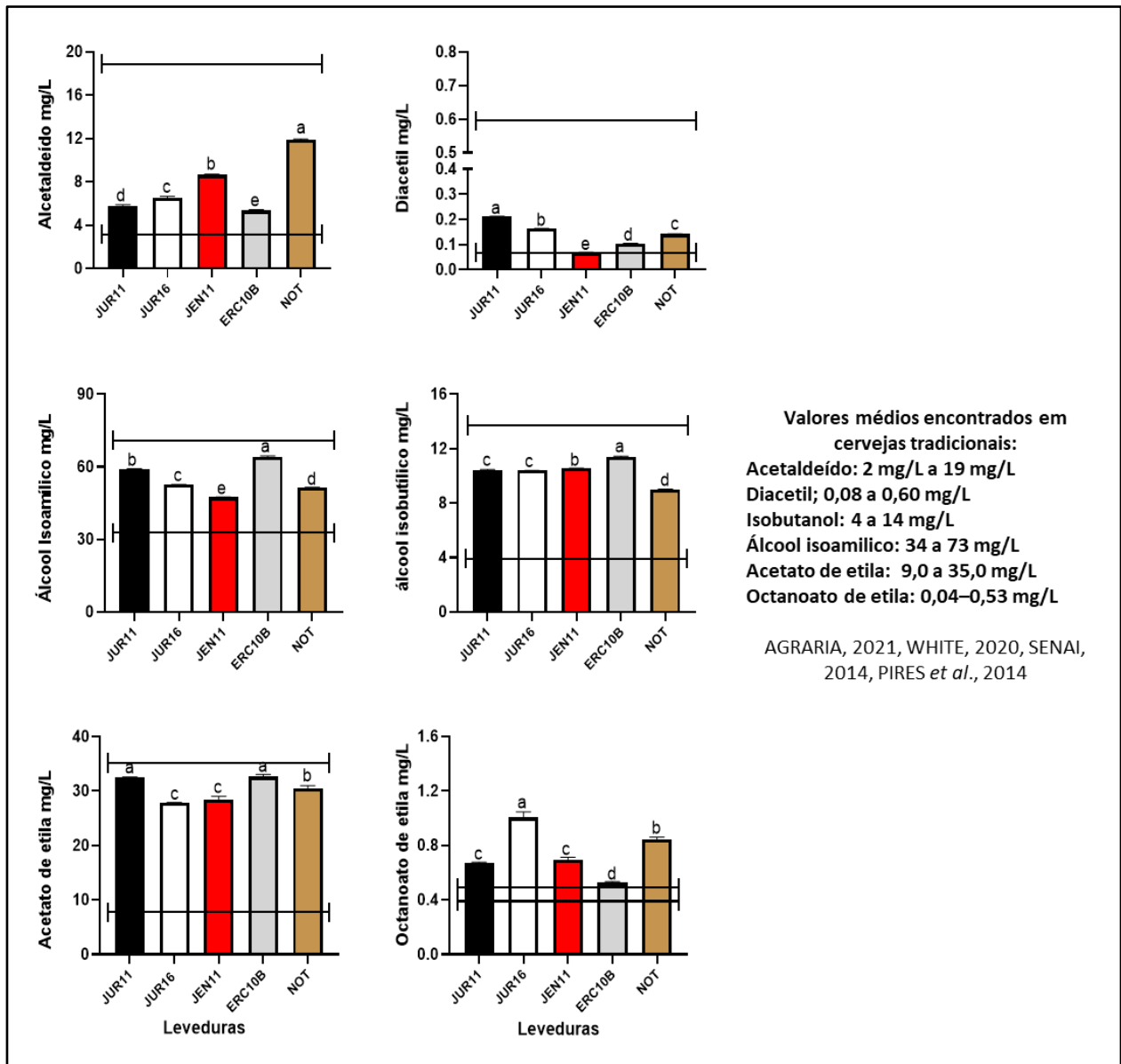


Figura 7: Perfil dos metabólitos secundários voláteis quantificados por cromatografia gasosa (Varian CP-3380) nas cervejas produzidas após fermentação em mosto sem lúpulo das leveduras selecionadas JUR11, JUR18, JEN11, ERC10B e Nottingham (NOT) em escala laboratorial. Os traços superiores em cada metabolito indicam o máximo e os traços inferiores os mínimos de concentrações encontradas em média nas cervejas tradicionais com álcool

As quantidades produzidas desses metabólitos secundários pelas leveduras JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16 foram satisfatórias, porque mesmo fermentando um mosto com

baixa densidade (1.020) as concentrações produzidas foram compatíveis com a levedura controle NOT e as médias encontradas em cervejas com álcool (Figura 7) (AGRARIA, 2021, WHITE, 2020, SENAI, 2014, PIRES et al., 2014). O conjunto de metabolitos secundários são os responsáveis pela formação do sabor e aroma das cervejas, que em produtos de baixo teor alcoólico são muitas vezes neutras, característica que desagrade o consumidor que busca a mesma sensação encontrada nas cervejas tradicionais com a presença de álcool (MICHEL *et al.*, 2016a; SANNINO *et al.*, 2019). Com o aumento da nova demanda do mercado, buscando uma ampliação na oferta de cervejas de baixo teor alcoólico, surge a fomentação de investimentos em pesquisas que englobam o conhecimento adquirido das fermentações em vinho, aplicando leveduras não convencionais na contribuição da formação de perfis singulares e versáteis de aromas e sabores (PÉREZ *et al.*, 2011; SWANGKEAW *et al.*, 2009).

5.4 - Seleção da levedura para produção de cerveja de baixo teor alcoólico

Para produção da cerveja a levedura escolhida foi a ERC10B. Isso se justificou por motivo de melhores respostas aos testes realizados para produção de cerveja de baixo teor alcoólico. O primeiro resultado a favor da aplicação desta levedura foi o seu desempenho floculativo (resultado de teste realizado anteriormente não mostrado neste Capítulo), pois essa característica é importante ao permitir que a cerveja fique com uma aparência mais límpida e atraente ao consumidor. Ademais, outro fator relevante para a escolha foi a produção abaixo de 0,5% (v/v) teor alcoólico em todos os testes fermentativos realizados. Esses resultados indicam que as cervejas produzidas pela ERC10B se enquadram dentro das cervejas zero álcool, como indica a legislação vigente. E por último, as concentrações produzidas de acetaldeído e diacetil, considerados *off-flavours* (sabores e aromas prejudiciais a bebida), estão entre as menores encontradas ao serem comparadas a JEN11, JUR11 e JUR16. Ainda nesse viés, a produção de acetato de etila e álcool isoamílico está entre as maiores concentrações quando comparadas com os resultados das outras leveduras testadas. Esse conjunto de respostas fez com que a ERC10B tenha maior possibilidade em produzir uma cerveja com baixo teor alcoólico de sabor e aroma que se assemelhe as encontradas em uma cerveja tradicional com álcool.

5.5 - Teor alcoólico estimado com a levedura selecionada

Os resultados da estimativa fermentativa por perda de peso em mosturações com diferentes temperaturas, na ausência e presença de lúpulo (Figura 8), mostraram que a fermentação em mosto produzido a 70 °C com a levedura ERC10B na ausência de lúpulo obteve o resultado de 0,2% de teor alcoólico (v/v), enquanto na presença de lúpulo o resultado foi mais baixo com 0,08% de teor alcoólico (v/v). A levedura controle NOT ficou no mesmo patamar fermentativo, independente da presença ou ausência de lúpulo, com a produção de 1,80% de teor alcoólico (v/v) nas duas situações. No mosto produzido com a temperatura de 66 °C, a ERC10B obteve melhor rendimento na ausência de lúpulo com 0,14% de teor alcoólico (v/v) quando comparado a fermentação no mosto com presença de lúpulo, produzindo 0,07% de teor alcoólico (v/v). A levedura NOT apresentou melhor desempenho no mosto produzido a 66 °C na presença de lúpulo com a produção de 3,15% teor alcoólico (v/v) se comparado a fermentação no mosto sem lúpulo com 2,11% teor alcoólico (v/v).

As diferenças entre os resultados já eram esperadas, pois com a distinção de temperatura de mosturação, deve-se ocorrer diferentes ofertas de carboidratos. A 70 °C é a temperatura ótima da enzima α -amilase, que metaboliza o amido presente nos grãos de cevada, produzindo maiores proporções de carboidratos complexos como as dextrinas. Geralmente essa oferta dificulta a assimilação das leveduras que preferem carboidratos mais simples, como os monossacarídeos e dissacarídeos. A temperatura de 66 °C é considerada uma variável ótima de ação da beta amilase, na qual ocorre uma conversão mais efetiva do amido em carboidratos mais simples como glicose e maltose, preferencialmente mais assimiláveis pelas leveduras (SENAC, 2014). Por essa diferença de quantidades de tipos de carboidratos foi que a levedura controle NOT obteve maior rendimento fermentativo a 66 °C quando comparada ao mosto produzido a 70 °C. Os resultados da ERC10B em todas as condições de mosturação foram bem abaixo dos encontrados pela levedura controle, reafirmando sua capacidade de empregabilidade na produção de cerveja de baixo teor alcoólico (BRASIL, 2009).

Quando analisada a presença do lúpulo, os resultados apontam a sua influência no rendimento fermentativo da ERC10B, baixando a produção do teor alcoólico estimado (Figura 8). Esses dados devem ser confirmados em testes quantitativos mais apurados. Atualmente, já está consolidado o papel dos lúpulos na formação dos sabores e aromas das cervejas, sendo um dos principais componentes das receitas atuais. Além desta função, eles

apresentam características bacteriostáticas que permitem a menor competição de bactérias no mosto no momento da fermentação e, conseqüentemente, maior acesso das leveduras aos carboidratos melhorando o desempenho fermentativo (POŁEĆ et al., 2021; LEITE et al., 2013).

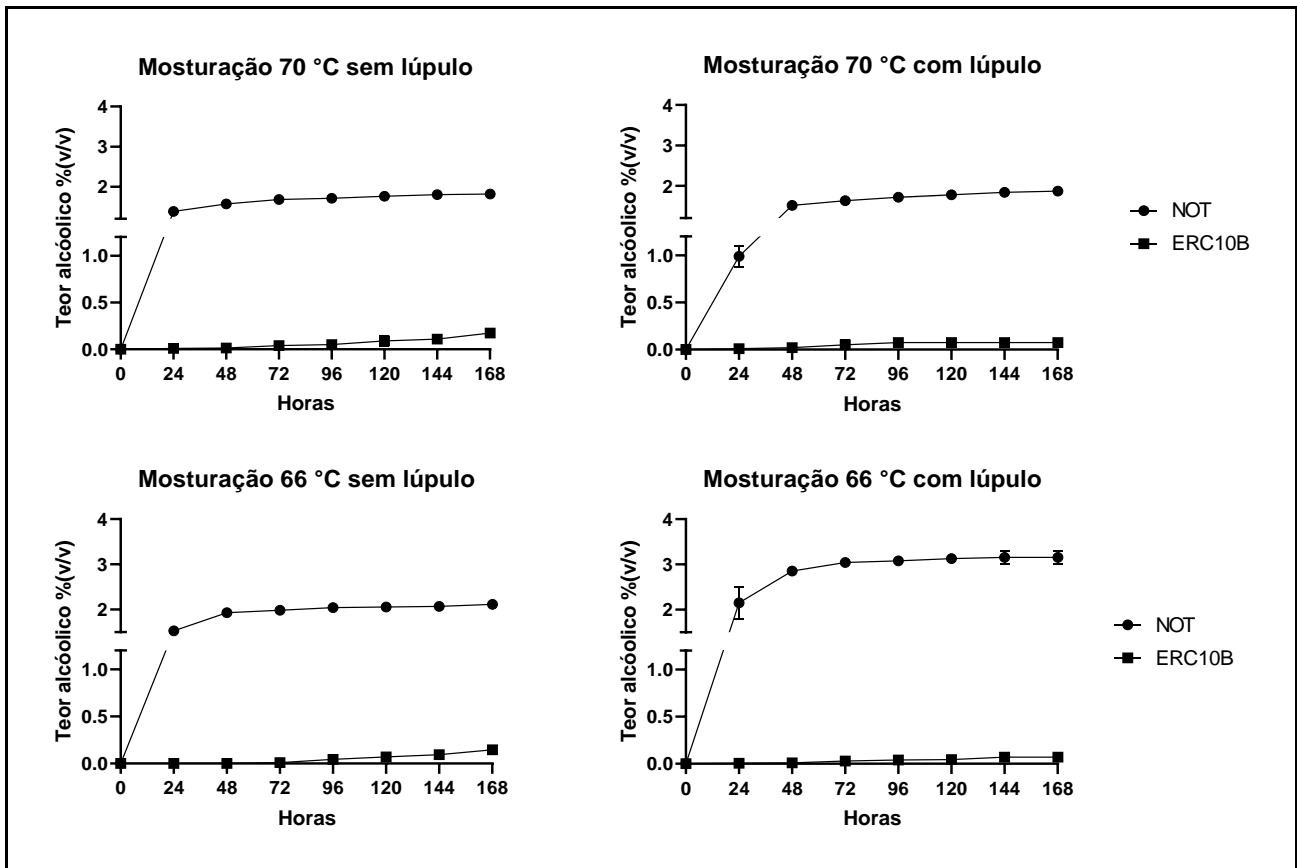


Figura 8: Produção estimada de teor alcoólico em % (v/v) em mosto cervejeiro pelas leveduras ERC10B e levedura controle Nottingham (NOT) por um período de 168 h com diferentes temperaturas de mosturação (66 °C e 70 °C) na presença e ausência de lúpulo.

5.5 - Quantificação do teor alcoólico

Em mosturações a 70 °C, sem a presença de lúpulo a levedura ERC10B produziu 0,45% de teor alcoólico (v/v) enquanto na sua presença produziu 0,6% de teor alcoólico. Nessas condições, a levedura controle NOT produziu respectivamente 1,54% sem o lúpulo e 1,34% de teor alcoólico (v/v) com o lúpulo (Figura 9). Na outra mosturação produzida a 66 °C, os resultados quantificados pela ERC10B em mosto sem lúpulo foram de 0,32% de teor alcoólico (v/v) enquanto na presença obteve 0,11% (v/v). A levedura controle (NOT) produziu sem o lúpulo 2,29% de teor alcoólico (v/v) e com o lúpulo 3,17% teor alcoólico (v/v (Figura 9).

Esses resultados mostraram que a ERC10B produziu porcentagens bem inferiores aos encontrados pela levedura NOT, confirmando seu potencial para produção deste tipo de

cerveja. O melhor rendimento fermentativo quantificado pela ERC10B foi na mosturação a 70 °C na presença de lúpulo, diferente do resultado apresentado pelo teste de estimativa fermentativa por perda de peso. A produção mais baixa de álcool foi em mosturação realizada a 66°C com lúpulo (Figura 9). A levedura controle manteve a mesma linha metabólica comparando com os resultados do teste de estimativa fermentativa em mosto na presença e ausência de lúpulo. A produção de álcool alcançada na mosturação realizada a 70 °C foi mais que o dobro se comparada a mosturação a 66 °C (Figura 9). Isso pode indicar que a ERC10B tem a capacidade de consumir outros carboidratos mais complexos presentes em maior quantidade no mosto produzido a 70 °C. Estudos anteriores já mostraram que o gênero *Meyerozyma* possui a capacidade de quebrar polissacarídeos mais complexos como a xilose e converte-las em moléculas simples utilizando no processo fermentativo (SILVEIRA, 2014, MATOS et al., 2014; CHIRMER-MICHEL et al., 2008).

Para ser considerada cerveja, segundo a IN 65/2019, ela deve conter em sua formação malte de cevada ou extrato de malte, acima de 55%, água, levedura e lúpulo. Nos ensaios que a ERC10B fermentou na presença de todos esses ingredientes, a produção de teor alcoólico foi abaixo de 0,5% (v/v), sendo consideradas cervejas zero álcool (BRASIL, 2019).

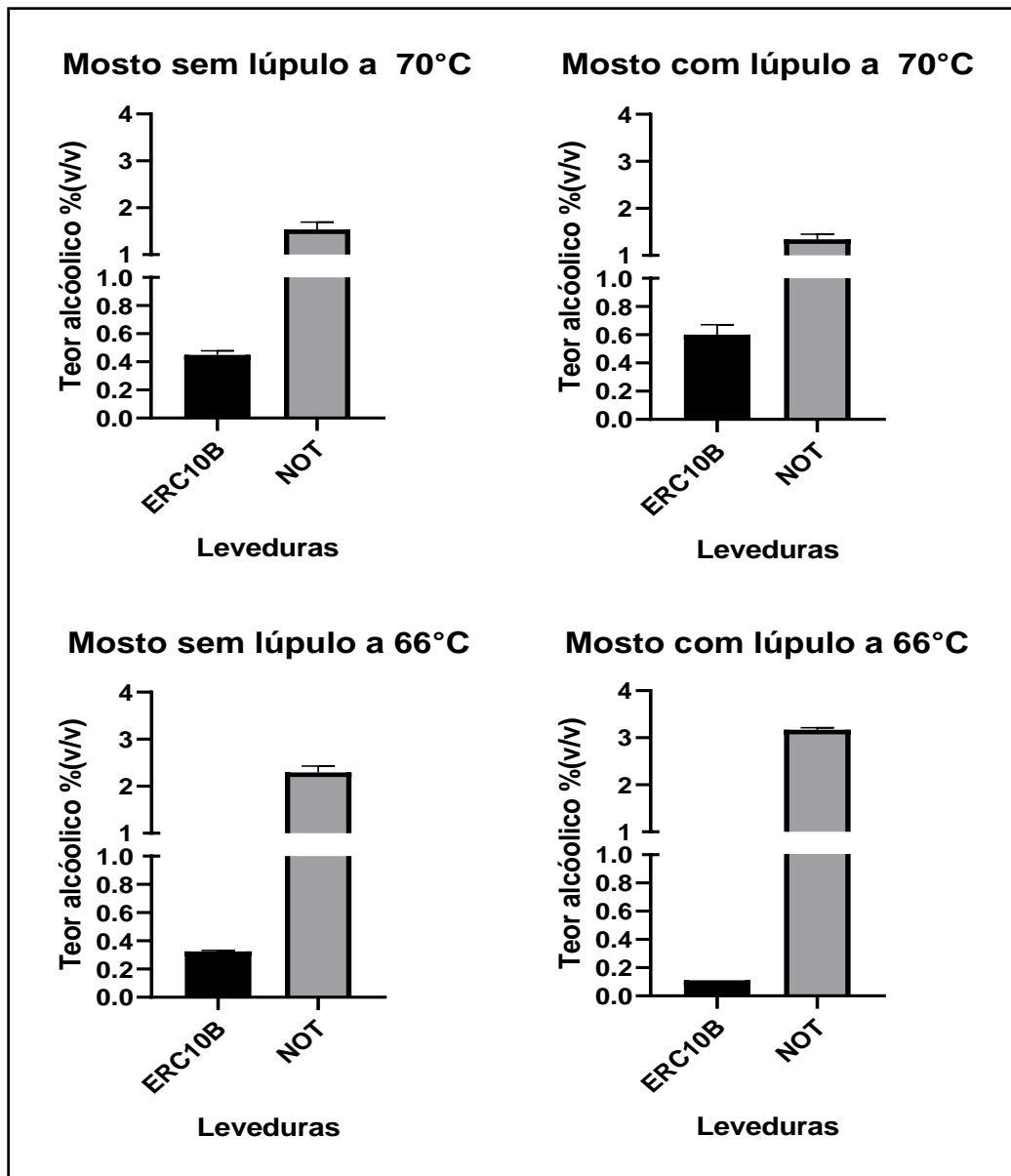


Figura 9: Quantificação de álcool realizada pelo cromatógrafo líquido modelo 8040 – Shimadzu® produzidos nas diferentes mosturações com a presença e ausência de lúpulo.

A influência do lúpulo nos resultados fermentativos mostrou diferença apenas nos mostos produzidos a 66°C. Piraine *et al.*, (2022) aplicaram leveduras não convencionais, isoladas de cavernas na produção de cerveja e verificaram em testes com meios de culturas suplementados com altas concentrações de lúpulo, o equivalente a 90 a 120 IBU (*International Bitter Unit*), um prejuízo no crescimento das cepas testadas. Em outro estudo, Bocquet e colaboradores (2018) utilizaram extrato de lúpulo para o controle de *Zymoseptoria tritici*, uma levedura que ataca o trigo. Os resultados deste estudo mostraram que tanto em meio sintético quanto nas partes do trigo (folhas, rizomas, caule e cones), houve uma diminuição de crescimento destas leveduras. Estudos de D' agostino e colaboradores (2019), procuram

entender ação dos lúpulos na inibição de esporulação ou mesmo em disfunções na membrana plasmática nos processos celulares de fungos. Com modelos de membranas de monocamadas, verificou-se que componentes presentes no extrato de lúpulo (óleo essencial, humulona, mirceno e terpenos) podem alterar a condensação, estabilidade e fluidez dos sistemas, diferindo sua ação de acordo com a quantidade e conteúdo de ergosterol (POŁEC et al., 2019, 2021).

Esses estudos são importantes para entender a relação do lúpulo dentro do processo fermentativo, além da colaboração do sabor e aroma. Os resultados preliminares demonstrados neste estudo indicam que a presença de lúpulo tem algum tipo de ação no metabolismo da levedura ERC10B. Para confirmação destes resultados serão necessários testes mais complexos e em produções maiores, como a escala piloto e industrial.

6 - CONCLUSÃO

Dentre as 4 leveduras testadas JEN11, ERC10B, JUR11 e JUR16, pertencentes ao gênero *Meyerozyma*, a escolhida por ter apresentado o melhor conjunto de resultados para produção de cerveja com baixo teor alcoólico foi a ERC10B, isolada do fruto *Pouteria ramiflora* (curriola). Os resultados fermentativos preliminares e quantificados mostraram que essa levedura é uma excelente candidata pois foi quantificado teor alcoólico abaixo de 0,5% (v/v) e enquadrando em cervejas tipo zero álcool. As concentrações de metabólitos secundários quantificadas responsáveis pelo sabor e aroma mostraram-se em níveis próximos aos encontrados em cervejas com a presença de álcool, produzidas por leveduras convencionais. Os melhores resultados apresentados foram em cervejas produzidas em mosturação a temperatura de 66 °C. Este é outro ponto favorável para o uso da ERC10B, visto que nessa faixa de temperatura são produzidas grande parte das cervejas atuais. A presença do lúpulo indica uma diminuição no metabolismo fermentativo, porém, existe a necessidade de testes mais robustos para confirmar dessa afirmação. Portanto como perspectivas seriam a produção de cervejas em escala piloto com a levedura ERC10B, a fim de quantificar novamente o teor alcoólico presente e realizar uma análise sensorial de aceitação de público.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRARIA- Painel de análise sensorial- [https://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/analise_sensorial -_flavors - port.pdf](https://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/analise_sensorial_-_flavors_-_port.pdf) acessado dia 05/05/21.

ALBERTIN, W., CHASSERIAUD, L., COMTE, G., PANFILI, A., DELCAMP, A., SALIN, F., BELY, M. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. **PLoS One**, v. 9, 2014.

ALMEIDA JÚNIOR, E. B. D., CHAVES, L. J., SOARES, T. N. Caracterização genética de uma coleção de germoplasma de cagaiteira, uma espécie nativa do cerrado. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 246-252, 2014.

ANDRÉS-IGLESIAS, C., BLANCO, C. A., GARCÍA-SERNA, J., PANDO, V., MONTERO, O. Volatile compound profiling in commercial lager regular beers and derived alcohol-free beers after dealcoholization by vacuum distillation. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 11, p. 3230-3241, 2016.

ANVISA- Resolução-RE nº 899. Disponível http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html Acessado 10/04/2020.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 112 f. Dissertação – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

ÁRVORE DA CERVEJA - Disponível <<http://beercast.com.br/leia-o-rotulo/estilos-e-familias/>> Acessado dia 05/05/2021.

ALVAREZ, F., DA MATA CORREA, L. F., ARAÚJO, T. M., MOTA, B. E. F., DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R., DE MIRANDA CASTRO, I., BRANDÃO, R. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 97-104, 2014.

BOCQUET, L., RIVIÈRE, C., DERMONT, C., SAMAILLIE, J., HILBERT, J. L., HALAMA, P., SAHPAZ, S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 290-297, 2018.

BRÁNYIK, T., SILVA, D. P., BASZCZYŃSKI, M., LEHNERT, R., E SILVA, J. B. A. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 4, p. 493-506, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa 13/2005- Disponível <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=76202> acessado em 12/11/2019.

BRASIL. Código de Trânsito Brasileiro – Lei nº9.503/1997, Artigo 165 – Disponível <https://www.jusbrasil.com.br/topicos/10606930/artigo-165-da-lei-n-9503-de-23-de-setembro-de-1997> acessado em 12/11/2019

CAPECE, A., ROMANIELLO, R., SIESTO, G., ROMANO. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018.

CATALISI: O novo mercado de cerveja - Disponível <http://catalisi.com.br/o-novo-mercado-da-cerveja-sem-alcool-comecou-a-chegar-no-brasil-em-2019/> acessado dia 16/08/21.

CÓDIGO DE TRÂNSITO BRASILEIRO – Capítulo XV - DAS INFRAÇÕES- Artigo 165 Disponível www.ctbdigital.com.br/artigo/art165 acessado 05/10/2020.

DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R., SARAIVA, M. A. F., DINIZ, R. H. S., OLIVEIRA, J., BARBOSA, G. D., ALVAREZ, F., BRANDÃO, R. L. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 237-246, 2015.

D'AGOSTINO, M., TESSE, N., FRIPPIAT, J. P., MACHOUART, M., DEBOURGOGNE, A. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3713, 2019.

DE FRANCESCO, G., TURCHETTI, B., SILEONI, V., MARCONI, O., PERRETTI, G. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 113-121, 2015.

EVANS, D. E., COLLINS, H., EGLINTON, J., WILHELMSON, A. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict malt fermentability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, n. 4, p. 185-198, 2005.

EXTRATO DE MALTE: Meios de cultura Kasvi <https://kasvi.com.br/produtos/?ref=K25-1708&desc=extrato-de-malte.-frasco-500-g> acessado dia 4/04/2021.

FONSECA, G. G., DE CARVALHO, N. M. B., GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5055-5067, 2013.

FORBEER –Feira para Indústria da Cerveja: Crescimento de cerveja sem álcool – Disponível <https://www.forbeer.net.br/post/cresce-pelo-mundo-e-no-brasil-o-consumo-da-cerveja-sem-%C3%A1lcool#:~:text=Em%20todo%20o%20planeta%2C%20esse,2%25%20da%20de%20teor%20reduzido> acessado dia 12/08/21.

GÜZEL, N., GÜZEL, M., BAHÇECI, K. S. Nonalcoholic beer. **Trends in Non-alcoholic Beverages**, p. 167-200, 2020.

IMHOF, A., WOODWARD, M., DOERING, A., HELBECQUE, N., LOEWEL, H., AMOUYEL, P., KOENIG, W. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). **European Heart Journal**, v. 25, n. 23, p. 2092-2100, 2004.

JOHNSON, R. A., NGUYEN, M. H. **Understanding membrane distillation and osmotic distillation**. John Wiley & Sons, 2017.

LANDAUD, S., LIEBEN, P., PICQUE, D. Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, n. 2, p. 93-99, 1998.

LEITE, I. R., FARIA, J. R., MARQUEZ, L. D., REIS, M. H., DE RESENDE, M. M., RIBEIRO, E. J., CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 611-618, 2013.

LIGUORI, L., RUSSO, P., ALBANESE, D., DI MATTEO, M. Production of low-alcohol beverages: current status and perspectives. In: **Food Processing for Increased Quality and Consumption**. Academic Press, 2018. p. 347-382.

MADSEN, E. S. BRANDING AND CONSOLIDATION IN THE GLOBAL BEER MARKET. In: **New Developments in the Brewing Industry**. Oxford University Press. p. 192-215.

MALLET, J. **MALTE: UM GUIA PRÁTICO DO CAMPO À CERVEJARIA**. 1ª ED. Editora Krater. 2022.

MANGINDAAN, D., KHOIRUDDIN, K., WENTEN, I. G. Beverage dealcoholization processes: Past, present, and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 36-45, 2018.

MATOS, I. T. S. R., CASSA-BARBOSA, L. A., GALVÃO, R. D. S. M., NUNES-SILVA, C. G., ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, 2014.

MENDES, M. R. D. A., MUNHOZ, C. B. R., SILVA JÚNIOR, M. C. D., CASTRO, A. A. J. F. Vegetation and soil relationship in moist grassland in the National Park of Sete Cidades, Piauí, Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 971-984, 2012.

MÜLLER, M., BELLUT, K., TIPPMANN, J., BECKER, T. Physical methods for dealcoholization of beverage matrices and their impact on quality attributes. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 5, p. 310-326, 2017.

NARZISS, L., MIEDANER, H., KERN, E., LEIBHARD, M. Technology and composition of non-alcoholic beer. Processes using arrested fermentation. **Brauwelt International** (Germany, FR), 1992.

NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. **Molecular microbiology**, v. 5, n. 9, p. 2079-2084, 1991.

NOVAK, S., ZECHNER-KRPAN, V., MARIĆ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 213-218, 2004.

PÉREZ, G., FARINA, L., BARQUET, M., BOIDO, E., GAGGERO, C., DELLACASSA, E., CARRAU, F. A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 47-55, 2011.

PIRAINE, R. E. A., NICKENS, D. G., SUN, D. J., LEITE, F. P. L., BOCHMAN, M. L. Isolation of wild yeasts from Olympic National Park and *Moniliella megachiliensis* ONP131 physiological characterization for beer fermentation. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103974, 2022.

PIRES, E. J., TEIXEIRA, J. A., BRÁNYIK, T., VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014.

POŁEĆ, K., BRONIATOWSKI, M., WYDRO, P., HAĆ-WYDRO, K. The impact of β -myrcene—the main component of the hop essential oil—on the lipid films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 308, p. 113028, 2020.

POŁEĆ, K., OLECHOWSKA, K., MASŁOWIEC, D., WÓJCIK, K., HAĆ-WYDRO, K. The effect of major terpenes of the hop essential oil on the mixed monolayers and bilayers imitating bacteria membranes. In search of the natural pesticides. **Journal of Molecular Liquids**, v. 327, p. 114903, 2021.

SALLES, A. **Anuário 2015**. CEVBRASIL- São Paulo, 2015.

SANNINO, C., MEZZASOMA, A., BUZZINI, P., TURCHETTI, B. Non-conventional yeasts for producing alternative beers. In: *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer, Cham, p. 361-388, 2019.

SCHIRMER-MICHEL, A. C., FLÔRES, S. H., HERTZ, P. F., MATOS, G. S., AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008.

SENAI. Departamento Regional do Estado do Rio de Janeiro, **Tecnologia Cervejeira/SENAI**, Agrária, Centro de Tecnologia SENAI alimentos e bebidas. – Rio de Janeiro: [s.n], 2014.

SILVA, C. H. P. M. **MICROBIOLOGIA DA CERVEJA**: do básico ao avançado, o guia definitivo. 1ª ED. Livraria da Física. 2019.

SILVEIRA, F. A. D. **Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1**. 69 f. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SWANGKEAW, J., VICHITPHAN, S., BUTZKE, C. E., VICHITPHAN, K. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 335-343, 2009.

VAN BERGEN, B., CYR, N., STRASSER, R., BLANCHETTE, M., SHEPPARD, J. D., JARDIM, A. α , β -Dicarbonyl reduction is mediated by the *Saccharomyces* Old Yellow Enzyme. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, 2016

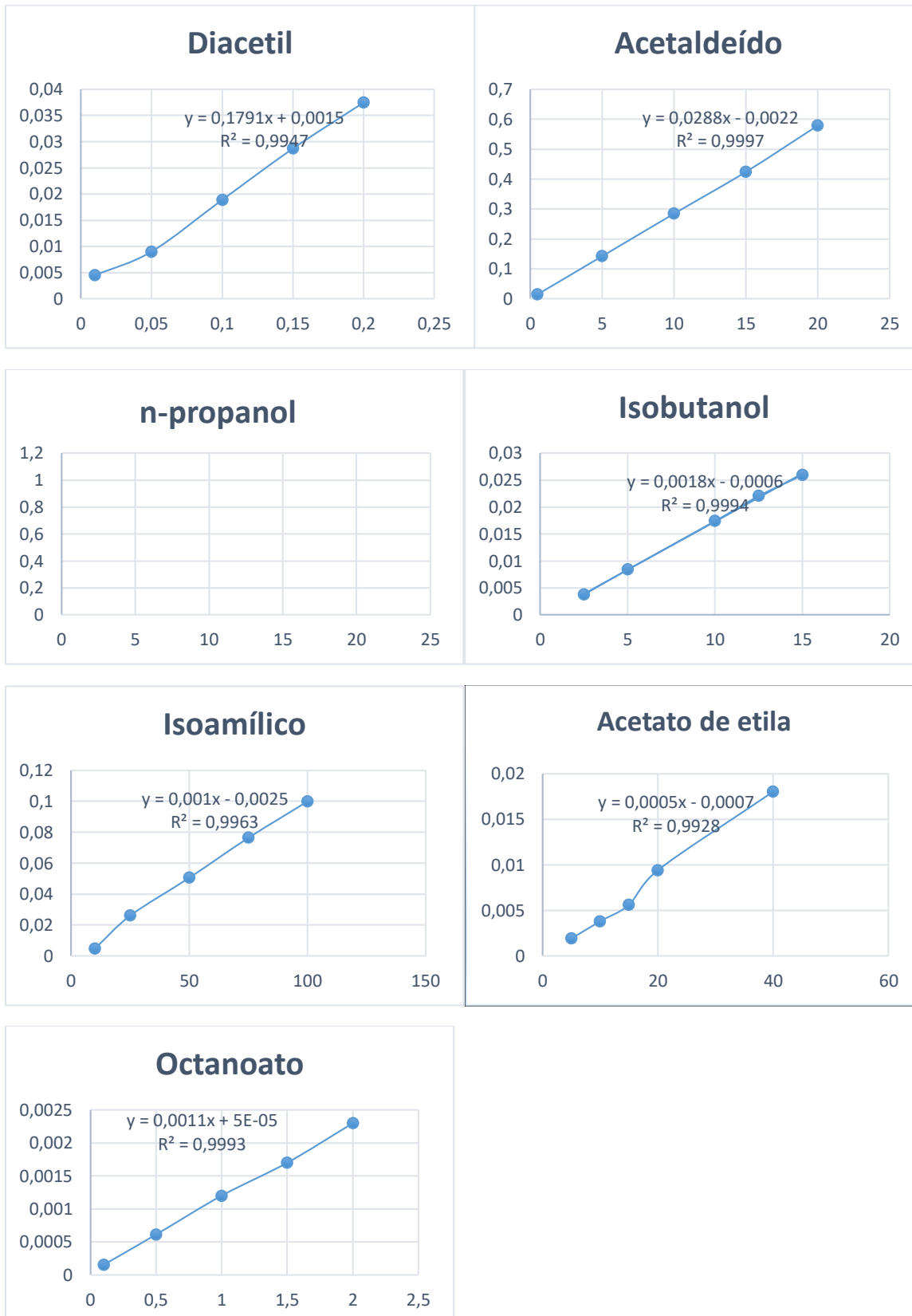
VEJARANO, R. *Saccharomyces ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 71, 2018.

WHITE, C., ZAINASHEFF, J. **Leveduras: guia prático para fermentação de cerveja**. 1 ed. Porto alegre- RS. Editora Krater, 2020.

ZASTROW, C. R., HOLLATZ, C., DE ARAUJO, P. S., STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 34-38, 2001.

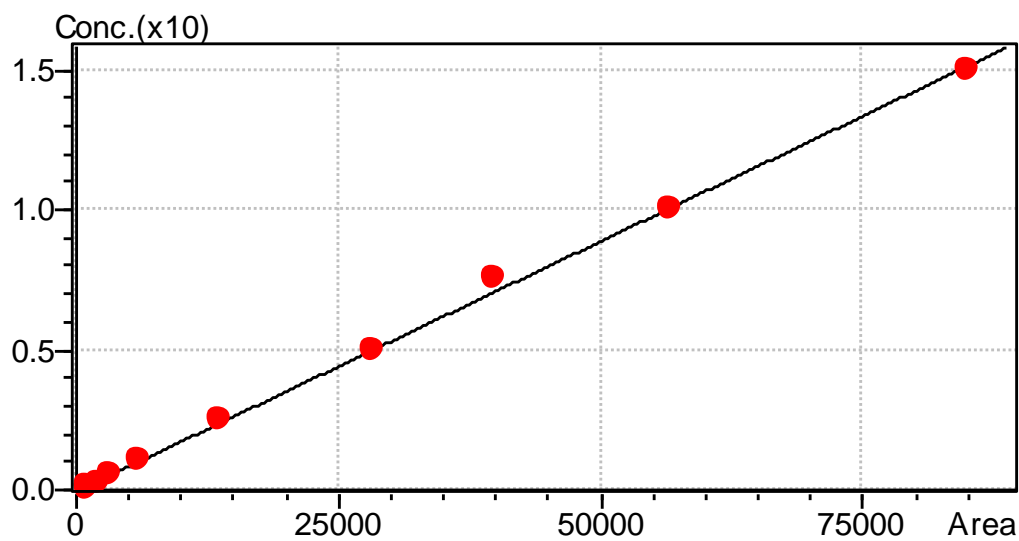
8 - ANEXOS

8.1 - Coeficiente da reta para construção da curva padrão na análise de voláteis



8.2 - Pontos da curva CLAE etanol.

PONTO	CONC	MED. AREA	SD	%RS	AREA 1	AREA2	AREA3
1	0,05	1065	30,0458	2,821352	1 1038	1 1097	1 1059
2	0,1	1234	191,6967	15,52864	1 1092	1 1159	1 1452
3	0,25	2137	99,85188	4,673308	1 2064	1 2096	1 2250
4	0,5	3327	148,7461	4,470789	1 3286	1 3492	1 3203
5	1	6131	393,4963	6,417819	1 6410	1 5853	0
6	2,5	13811	443,2675	3,209486	1 14034	1 14099	1 13301
7	5	28264	557,834	1,973656	1 27991	1 28906	1 27895
8	7,5	39896	1864,799	4,674098	1 42036	1 38615	1 39038
9	10	56594	349,4658	0,617498	1 56993	1 56446	1 56342
10	15	84980	943,9508	1,110792	1 86063	1 84549	1 84329



$a = 1.790623e-004$
$b = -6.165419e-002$
$R^2 = 0.9990395$
$R = 0.9995196$

