



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo de co-cultura entre
Saccharomyces cerevisiae e
Saccharomyces kudriavzevii para
elaboração de uma bebida alcoólica
fermentada à base de Cagaita
(*Eugenia dysenterica* DC.)**

MARCOS FLÁVIO RIBEIRO VALÉRIO JÚNIOR

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Fernanda Ferreira Freitas

COORIENTADOR: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni

DISSERTAÇÃO

GOIÂNIA – 2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

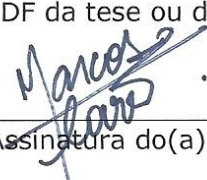
Nome completo do autor: **Marcos Flávio Ribeiro Valério Júnior**

Título do trabalho: **Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.).**

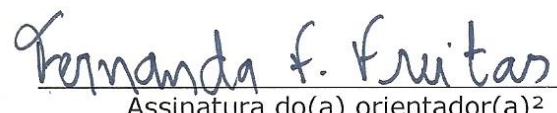
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: **02/10/2018**

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo de co-culturas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.).

MARCOS FLÁVIO RIBEIRO VALÉRIO JÚNIOR

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Fernanda Ferreira Freitas

COORIENTADOR: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Área de concentração:
Desenvolvimento de processos.

GOIÂNIA – 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro Valério Júnior, Marcos Flávio
Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e
Saccharomyces kudriavzevii para elaboração de uma bebida alcoólica
fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) [manuscrito]
/ Marcos Flávio Ribeiro Valério Júnior. - 2018.
108 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Ferreira Freitas; co-orientador
Dr. Gabriel Luis Castiglioni.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química ,
Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. palatabilidade. 2. doçura. 3. fermentado alcoólico. 4.
biodiversidade do cerrado. I. Ferreira Freitas, Fernanda, orient. II.
Título.

CDU 66.0



UFG

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Química

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química do Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás.

Ao dia 27 (vinte e sete) de Agosto do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 14:00 hs (quatorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes membros: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas, Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Prof^ª. Dr^ª. Araceli Aparecida Seolatto e Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez, sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Marcos Flávio Ribeiro Valério Júnior intitulada: “Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.)” como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, o candidato foi arguido pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas: Aprova do

Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni: APROVADO

Prof^ª. Dr^ª. Araceli Aparecida Seolatto: APROVADO

Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez: APROVADO

A seguir, na presença do público e do candidato, o presidente da Banca Examinadora declarou que Marcos Flávio Ribeiro Valério Júnior, candidato ao título de Mestre em Engenharia Química foi:

Aprovado (X); Reprovado ().

Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou o candidato e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Prof. Dr. Christian Gonçalves Alonso, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora.

Goiânia, 27 de Agosto de 2018.

Fernanda F. Freitas

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas (UFG)

Gabriel Luis Castiglioni

Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)

Araceli Seolatto

Prof^ª. Dr^ª. Araceli Aparecida Seolatto (UFG)

Armando Garcia Rodriguez

Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez (UFG)

*“As vezes a vida é má e eu não consigo ver a luz
Um pensamento positivo às vezes não é suficiente
Para fazer alguns erros parecerem certos
O que quer que a vida traga
Eu já passei por tudo
E agora estou de joelhos mais uma vez*

*Mas eu sei que devo seguir em frente
Embora ferido, eu devo ser forte
Porque no fundo eu sei que muitos sentem-se assim*

*Crianças, não parem de dançar
Jamais desistam dos seus sonhos
Acreditem que vocês podem voar
Para longe, bem longe!”*

Don't Stop Dancing – Creed

Dedico esta vitória a você meu
eterno Vô Zú (*in memoriam*) e
a todos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradecer significa, reconhecimento e declaração de se estar grato por algo dado ou feito por outrem; gratidão.

No entanto, primeiramente eu sou grato à Deus, aquele que em sua misericórdia Divina me proporcionou o fato de existir e persistir. A Santo Expedito, santo das causas impossíveis e dos desesperados e a Santa Catarina de Alexandria, santa protetora dos estudantes que sempre ouviram minhas preces.

Ingrato seria, se não agradecesse aqueles que sempre estiveram ao meu lado como pais, meu Pai Hermes e minha Mãe Márzia (Tata). Aquelas que de forma fraternal e amiga me estimularam e sempre me incentivaram, minhas princesas, irmãs Lana e Léia. Em especial a Lana, que esteve comigo nos bons e más momentos em Goiânia me guiando.

No entanto, a vida e Deus me deram outros pais, aqueles que de uma forma ativa colaboraram e muito para meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional, meus avós Ariodê, meu eterno Vô Zú (*in memoriam*), minha Vó Cema e minha Vozinha Sônia que sempre me acobertaram e me mostraram que tudo se é possível quando se tem fé.

Sem esquecer nenhum familiar, agradeço meus tios: Márcia, Maurício, Múcio, Mariana que de uma forma ou de outra sempre me deram aquele “empurrãozinho” pra frente. Meus primos: Dhiêgo, Jennyfer, Maurício Júnior e Brenda, minha afilhada Vitória que sempre será um dos motivos para que eu siga em frente e seja espelho e acima de tudo inspiração.

Agradeço imensamente a quatro irmãos que a vida e Deus me deram, Pedro, Lailla, Camila Pessoa e Gisele, que na falta das meninas estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, acobertando e puxando minha orelha.

À “Família Nutella” que não mediram esforços em me ajudar e estarem comigo, não só em farras, mas também dando apoio moral quando precisei. Muito obrigado, Cukinha, Raissa, Alice, Marina Catani.

Sem esquecer Tatielly, Maike e Rafinha que sempre me apoiaram, em especial a Tati que nos pesar dos pesares esteve junto comigo durante noites viradas para a conclusão do mesmo.

Aqueles que de alguma forma me deram força e animo pra seguir em frente como minha eterna Jenni, meus miugos Joaquim, Max, Ailton, Ana Paula, Thaís Schiavinatto, dentre inúmero outros que sempre me deram apoio e acreditaram em mim.

Agradeço a toda Turma III do mestrado, em especial à Renata Klicia, Juliana Paixão, Carla Lobo e Lisieé que juntos mostramos que a união sempre vencerá. A Carol Winter que cedeu finais de semana e feriado para nos ajudar com aqueles cálculos cinéticos de outro mundo.

Jamais deixaria de esquecer de vocês dois, André Machado e Mayara Vieira, que surgiram em minha vida como seres iluminados, me demonstrando força, humildade, honestidade e acima de tudo, me mostraram que eu sou capaz e que dinheiro não se compra tudo. MUITO OBRIGADO!

A minha orientadora, que chamo de mãe, porque sim, foi uma mãezona durante todo este período. Mãe na hora de ajudar quanto na hora de dar bronca, você minha eterna Prof. Dra. Fernanda Ferreira Freitas, os meus eternos agradecimentos.

Meu co-orientador, Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, que com sua paciência e sem medir esforços me ensinou desde o “ABC” até o final de todo este projeto.

Agradeço a todos os amigos que passaram em minha vida durante esses dois anos, Lara, Larissa, Sirleide e meu cunhado que tanto amo, Bê que de uma forma ou outra me incentivaram e colaboraram com a execução e finalização deste projeto.

Sem esquecer dos técnicos Deives, Ana Paula, Jussara e Bruno que sempre me ajudaram e auxiliaram quando necessário. Aos ICs Maria Carolina, Byanca e Pablo que sempre me salvaram quando necessário. A minha

colega Julie Evany que mesmo “entre tapas e beijos” me ensinou e ajudou bastante.

Não posso esquecer do pessoal de Uberlândia, a Prof. Dra. Vicelma que gentilmente cedeu seu laboratório para realização das minhas análises, a seu orientando MsC. Felipe que não mediu esforços para que as mesmas fossem executadas, ao Igor, hoje também Mestre em Engenharia Química que me guiou e me apresentou a todos no laboratório e aos meus amigos, que me ofereceram e me receberam muito bem em casa Justino Neto, Brigitti e Diego.

Agradeço o aceite e disponibilidade dos professores: Prof^a. Dr^a. Araceli Aparecida Seollato, Prof. Dr. Armando Garcia Rodríguez que me acompanha e me ajuda desde a graduação, Prof^a. Dr^a. Adriana Régia e Prof^a. Dr^a. Inti Doraci por fazerem parte de minha banca como membros internos e externos.

Finalizando, agradeço meus companheiros Venva, Rita, Riva e Zolpi que entre altos e baixos vocês me deram todo apoio fisiológico e psicológico que precisava.

No mais, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro enviado durante doze meses para colaborar com o desenvolvimento deste projeto e a todos que de alguma forma colaboraram para meu aprendizado, meu crescimento acadêmico, pessoal e profissional.

Obrigado, Thanks, Gracias, Mercí!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE QUADROS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
LISTA DE SÍMBOLOS	18
NOMENCLATURAS	19
RESUMO	20
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 O POTENCIAL DO BIOMA CERRADO	26
3.2 CAGAITA (<i>Eugenia dysenterica</i> dc.).....	28
3.3 UTILIZAÇÃO DA CAGAITA	30
3.4 BEBIDAS FERMENTADAS.....	31
3.5 PROCESSO FERMENTATIVO.....	33
i. <i>Produção de Biomassa</i>	36
ii. <i>Produtos da fermentação etanólica: Glicerol</i>	37
3.6 MICRORGANISMO RESPONSÁVEL PELA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	39
3.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VERSUS <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> .	41
3.8 UTILIZAÇÃO DE CO-CULTURAS E CULTURAS MISTAS	46
3.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS (AROMAS).....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 FRUTOS	50
4.2 MOSTO DE CAGAITA	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MOSTO DE CAGAITA.....	52
4.3.1 pH e °Brix (Teor de sólidos solúveis)	52
4.3.2 Chaptalização.....	52
4.3.3 Sulfitação.....	52

4.4	MICRORGANISMO.....	53
4.4.1	Repique e Manutenção das Cepas	53
4.5	MOSTO SINTÉTICO	54
4.6	PREPARO DO INÓCULO	56
4.9	VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS DE CONCENTRAÇÃO CELULAR PARA FERMENTAÇÃO	60
4.10	FERMENTAÇÃO.....	61
4.11	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (SACAROSE, GLICOSE E FRUTOSE), ETANOL, GLICEROL E ÁCIDO ACÉTICO.	61
4.12	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	62
4.13	CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO.....	63
4.13.1	Velocidades específicas de transformação (h^{-1}).....	63
4.13.2	Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$)	64
4.13.3	Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{X/P}$).....	64
4.13.4	Cálculo da Produtividade dos Produtos ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	65
4.13.5	Rendimento (%)	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO DE CAGAITA.....	67
5.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL CENTRAL ROTACIONAL....	67
5.3	PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL 2 ² PARA A FERMENTAÇÃO.....	78
5.4	PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO FATORIAL COMUM 2 ² ADICIONADOS DE 4 PONTOS CENTRAIS.....	82
5.5	VALIDAÇÃO PARA COMPROVAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO.....	91
5.6	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	92
6	CONCLUSÕES	95
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
8	REFERÊNCIAS	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fruto da cagateira. O fruto apresenta formato globoso e achatado, cor amarelo-claro, variando de diâmetro entre 2 – 3 cm, interiormente são encontradas de 1 a 3 sementes de coloração branca, envolvidas por um mesocarpo e endocarpo levemente ácido e succulento, cálice seco aderido e casca de cor brilhante (CARDOSO, 2011). 29
- Figura 2 – Flor e árvore de Cagaita. a) Flor da cagaiteira – apresenta formato axilar, podendo ser encontrada individualmente ou organizada em conjunto de três flores, é hermafrodita e completa, com diâmetro que varia de 1,5 – 2 cm e cor branca. b) Árvore de Cagaita – apresenta tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada e folhas de coloração avermelhada quando jovens (SILVA, 2016). 30
- Figura 3 - Esquema dos tipos de fermentação com a sequência enzimática simplificada da conversão de glicose a etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). 35
- Figura 4 - Efeitos do Ambiente da Fermentação para as Leveduras *S. cerevisiae* (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). 36
- Figura 5 – Ilustração representativa do ciclo celular por brotamento da *S. cerevisiae*. A primeira etapa do ciclo é a fase G1 e precede à síntese de DNA que ocorre na fase S, nessa fase a célula mãe duplica seu material genético e tem-se o início da formação de um broto. Na fase G2 são feitas as checagens para verificação de possíveis erros ocorridos durante a replicação do DNA, logo após é iniciada a mitose que resultará na formação de uma célula filha menor e geneticamente idêntica a célula mãe (LÓPEZ-MALO, 2013). 43
- Figura 6 – Esquematização das relações filogenéticas entre as espécies de *Saccharomyces* e suas utilizações industriais. As espécies envolvidas nos processos e/ou híbridas estão representadas nos quadros amarelos. Os produtos dos processos industriais envolvidos as híbridas e não híbridas estão nos quadros de cor cinza. As setas correspondem às híbridas (Adaptado de DEQUIM e CASAREGOLA, 2011). 43
- Figura 7 – Obtenção da polpa de Cagaita: (a) Frutos de Cagaita congelados; (b) frutos após descongelamento; (c) frutos sendo adicionados à despulpadora; (d) separação da casca e semente e da polpa; (e) polpa e (f) frascos para armazenamento da polpa. 51
- Figura 8 – Tubos de preparo do inóculo com CR-85 e T-73. 57
- Figura 9 – Tubos de Falcon com biomassa desmembrada do meio. 57
- Figura 10 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares nos ensaios 5 ao 7 com as leveduras CR-85 e T-73, durante 168 h, (a) CR-85 e (b) T-73. 68
- Figura 11 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares dos Ensaios 2, 9, 10, 11 e 12 com o co-culturas de

leveduras CR-85 e T-73 durante 168 h, (a) Ensaio 2 e (b) Média dos Ensaios 9, 10, 11 e 12.	72
Figura 12 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares nos Ensaios 1, 3, 4, 6 e 8 em co-culturas de leveduras CR-85 e T-73 durante 168 h. (a) Ensaio 1, (b) Ensaio 3, (c) Ensaio 4, (d) Ensaio 6 e (e) Ensaios 8.....	75
Figura 13 – Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Completo.	81
Figura 14 – Valores Preditos pelo modelo <i>versus</i> Valores Observados no experimento para Etanol à 168 h de Fermentação.....	81
Figura 15 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Etanol a 168 h.....	83
Figura 16 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Biomassa a 168 h.	84
Figura 17 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Glicerol a 168 h.....	84
Figura 18 – Valores Observados <i>versus</i> Valores Preditos para Etanol (a), Biomassa (b) e Glicerol (c) das concentrações das variáveis independentes T-73 e CR-85.....	86
Figura 19 – Superfície de Resposta da Relação Entre a concentração de T-73 e CR-85 na produção de Etanol (a), produção de Biomassa (b) e produção de Glicerol (c) com 168 horas de Fermentação.	88
Figura 20– Regiões de Contorno da Relação Entre a concentração de T-73 e CR-85 na produção de Etanol (a), produção de Biomassa (b) e produção de Glicerol (c) com 168 horas.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores do planejamento experimental 2 ² completos composto central da fermentação alcoólica do mosto de Cagaita.	59
Tabela 2 – Matriz do delineamento com valores das variáveis do planejamento experimental codificados e não codificados.	59
Tabela 3 – Matriz experimental com os níveis codificados e decodificados das variáveis dependentes T-73 e CR-85	60
Tabela 4 – Proporção de <i>S. cerevisiae</i> (x1) e <i>S. kudriavzevii</i> (x2) codificado e decodificado.....	61
Tabela 5 – Parâmetros Cinéticos dos 12 ensaios Durante 168 Horas.....	70
Tabela 6 – Matriz do delineamento experimental com valores codificados e decodificados para variáveis dependentes T-73 e CR-85 em g.L ⁻¹ e concentração de Etanol em g.L ⁻¹ após fermentação no tempo de 168 h.	78
Tabela 7 – Parâmetros da Regressão da Fermentação à 168 h para Etanol.	80
Tabela 8 – Matriz do Planejamento Fatorial Comum 2 ² com valores codificados e decodificados para variáveis dependentes T-73 e CR-85 em g.L ⁻¹ e concentração de Etanol, Biomassa e Glicerol em g.L ⁻¹ após fermentação no tempo de 168 h.	82
Tabela 9 – Parâmetros da Regressão da Fermentação à 168 h para Etanol, Biomassa e Glicerol.....	83
Tabela 10 – Valores Experimentais e Preditos para os Experimentos de Validação do Modelo Linear de Predição dos resultados de produção de Etanol e Biomassa à 168 h de Fermentação.	91
Tabela 11 – Experimentos escolhidos para realização de Cromatografia Gasosa para determinação dos Compostos Voláteis.	92
Tabela 12 – Quantificação dos Compostos Voláteis em percentual.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição do Meio GPY.....	53
Quadro 2 – Composição química do mosto sintético para os macros nutrientes.....	54
Quadro 3 – Composição química da solução de aminoácidos utilizada no preparo do mosto sintético.....	55
Quadro 4 – Composição química da solução de vitaminas utilizada no preparo do mosto sintético.....	55
Quadro 5 – Composição química da solução de elementos traços utilizados no preparo do caldo de cana de açúcar sintético.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	Potencial Hidrogênionico
n.	Número
a.C.	Antes de Cristo
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CO ₂	Dióxido de carbono
ATP	Adenosina Trifosfato
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
PFK	Fosfofrutoquinase
NCYs	Nonconventional yeasts
DNA	Ácido desoxirribonucleico
aCGH	Hibridização do genoma
4MMP	4-mercapto-4-metilpentano-2-um
kDa	Kilo Dalton
SO ₂	Dióxido de Enxofre
GPY	Glucose, peptone, yeast extract
BOD	Biochemical Oxygen Demand
NaOH	Hidróxido de Sódio
UV	Ultravioleta
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NIST	National Institute of Standards and Technology
ART	Açúcares Redutores Totais
R ²	Coeficiente de determinação
Acetil-CoA	Acetil-co-enzima A

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
°Brix	Teor de sólidos solúveis totais
Km	Quilometro
%	Porcentagem
M	Metro
Cm	Centímetro
n.	Número
G	Grama
µm	Micrometro
%(v/v)	Porcentagem volume/volume
L	Litro
Min	Minuto
g.L ⁻¹	Gramas por litro
mL	Mililitro
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro
Nm	Nanômetro
H	Horas
µL	Microlitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
g _{Biomassa} .g _{Substrato} ⁻¹	Gramas de biomassa por gramas de substrato
g _{Etanol} .g _{Biomassa} ⁻¹ . h ⁻¹	Gramas de etanol por gramas de biomassa
g _{Etanol} .g _{Substrato} ⁻¹	Gramas de etanol por gramas de substrato
g _{Etanol} .L ⁻¹ .h ⁻¹	Gramas de etanol por litros por hora
mesh	Número de aberturas por polegada linear de uma peneira

NOMENCLATURAS

μ_x	Velocidade específica de formação de biomassa	$[h^{-1}]$
μ_p	Velocidade específica de formação de produto	$[h^{-1}]$
$\mu_{x\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de formação de biomassa	$[h^{-1}]$
$\mu_{p\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de formação de produto	$[h^{-1}]$
T	Tempo de fermentação	$[h]$
$Y_{X/S}$	Fator de conversão do substrato em células	$[g_{\text{Biomassa}} \cdot g^{-1}]$
$Y_{P/S}$	Fator de conversão do substrato em produto	$[g_{\text{Etanol}} \cdot g^{-1}]$
R^2	Coeficientes de determinação experimental	[adimensional]
R_A^2	Coeficientes de determinação ajustados	[adimensional]
Y_p	Rendimento prático	$[\%]$
Y_T	Rendimento teórico	$[\%]$

Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.)

RESUMO

A produção de fermentados alcoólicos a partir de frutas é uma alternativa atrativa para indústria de alimentos, pois esse tipo de bebida tem recebido forte aceitação por parte dos consumidores. As mudanças climáticas e a busca por vinhos com menor teor alcoólico, concentrações de glicerol mais baixas e melhores aromas, levaram a estudos em co-culturas de leveduras. O Brasil, apresenta-se como um dos maiores produtores mundiais de frutas, incluindo a fruticultura tropical. O bioma Cerrado concentra uma grande variedade de espécies frutíferas com características organolépticas interessantes, entre as espécies típicas do Cerrado, *Eugenia dysenterica* DC, conhecida popularmente como Cagaita, já é utilizada na fabricação de doces, geleias, sorvetes, refrescos, sucos e licores. Com relação ao agente fermentador, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com alto potencial para produção de etanol, e *Saccharomyces kudriavzevii*, notável produtora de glicerol, apresentam características interessante e requerida na indústria de bebidas fermentadas. Dessa forma, o presente trabalho, seguiu um planejamento experimental central rotacional e um planejamento fatorial comum para estipular a concentração das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* T-73 e *Saccharomyces kudriavzevii* CR-85, com intuito de entender como ocorre a interação entre as leveduras diante das respostas etanol, biomassa e glicerol. A partir do DCCR, não foi possível obter modelos significativos, visto que o experimento 5 onde havia cepa pura de CR-85 não produziu etanol e glicerol. A partir desses resultados, seguiu com planejamento fatorial comum, na qual, pôde-se obter modelos matemáticos para a predição da produção de etanol, biomassa e glicerol. Conseguiu-se também identificar que o ensaio com maior concentração de CR-85, houve um acréscimo de glicerol, e o ensaio com maior produção de etanol foi aquele que continha um teor ligeiramente superior de T-73 comparada a CR-85. Quanto aos compostos voláteis, foram identificados álcool isoamílico, responsável pelos aromas na indústria de alimentos, bem como acetato de étila, considerado um éster de acetato que confere a bebidas aromas frutais. Esta pesquisa ainda apresenta o detalhamento da cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de produtos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* T-73 e *Saccharomyces kudriavzevii* CR-85, nas quais, as características inerentes a cada levedura podem influenciar no comportamento dos parâmetros cinéticos, caracterizando a necessidade de aprofundamento de estudos no metabolismo dessas leveduras.

Palavras-chaves: palatabilidade, doçura, fermentado alcoólico, biodiversidade do cerrado.

Study of co-culture between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* for the elaboration of a fermented alcoholic beverage based on Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.).

ABSTRACT

The production of alcoholic ferments from fruit is an attractive alternative for the food industry, as this type of beverage has received strong acceptance from consumers. Climate change and the search for wines with lower alcohol content and a search for a concentration of glycerol and better aromas, led to studies in yeast co-cultures. Brazil is one of the world's largest producers of fruits, including tropical fruit. Among the typical species of Cerrado, *Eugenia dysenterica* DC, popularly known as Cagaita, is already used in the manufacture of sweets, jellies, ice cream, soft drinks, juices and liqueurs. Regarding the fermenting agent, yeast to *Saccharomyces cerevisiae*, with high potential for ethanol production, and *Saccharomyces kudriavzevii*, a notable producer of glycerol, present interesting and required characteristics in the fermented beverage industry. Thus, the present work followed a central rotational experimental planning and a common factorial planning to stipulate the concentration of the strains of *Saccharomyces cerevisiae* T-73 and *Saccharomyces kudriavzevii* CR-85, in order to understand how the interaction between the yeasts occurs ethanol, biomass and glycerol responses. From the DCCR, it was not possible to obtain significant models, since experiment 5 where there was pure CR-85 strain did not produce ethanol and glycerol. From these results, it was followed by common factorial planning, in which mathematical models could be obtained for the prediction of ethanol, biomass and glycerol production. It was also possible to identify that the assay with the highest concentration of CR-85 had an increase of glycerol, and the assay with the highest ethanol production was one that contained a slightly higher content of T-73 compared to CR-85. As for the volatile compounds, isoamyl alcohol was identified, responsible for the aromas in the food industry, as well as ethyl acetate, considered an ester acetate that gives the drinks fruit aromas. This research also presents details of the kinetics of growth, substrate consumption and production of *Saccharomyces cerevisiae* T-73 and *Saccharomyces kudriavzevii* CR-85 yeast products, in which the characteristics inherent to each yeast can influence the behavior of the kinetic parameters, characterizing the need to deepen studies on the metabolism of these yeasts.

Keywords: palatability, sweetness, alcoholic fermented, Cerrado's biodiversity.

1 INTRODUÇÃO

A produção de fermentados alcoólicos a partir de frutas é uma alternativa atrativa para indústria de alimentos, esse tipo de bebida tem recebido forte aceitação por parte dos consumidores (DIAS et al., 2003; SANDHU; JOSHI, 1995;). Além disso, a utilização de sucos de frutas para elaboração de bebidas alcoólicas é uma forma de aproveitamento com o intuito de evitar o desperdício, contribuindo para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis e agregando valor às bebidas regionais (ASQUIERI et al., 2009).

Tradicionalmente, são empregados uvas e maçãs na obtenção de bebidas fermentadas (MUNIZ et al., 2002), entretanto, várias outras frutas podem ser utilizadas para a formulação de mostos que podem, posteriormente, ser submetidos a fermentação alcoólica por ação de leveduras (DIAS et al., 2003). Frutas como a laranja, goiaba, abricó, abacaxi e a manga, já fornecem fermentados bastante apreciados e saborosos (SANDHU; JOSHI, 1995), mas ainda existe um vasto potencial a ser explorado, sobretudo, no que diz respeito as frutas tropicais.

Nesse sentido, o Brasil se apresenta em grande vantagem, pois é um dos maiores produtores mundiais de frutas, incluindo a fruticultura tropical (DIAS et al., 2003). Várias espécies do Cerrado produzem frutas que possuem características sensoriais únicas e altas concentrações de nutrientes, elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos, o que as torna uma excelente alternativa para indústria alimentícia e, atraentes ao consumidor (SILVA et al., 2001). Geralmente essas frutas são consumidas “*in natura*” e sua comercialização é feita informalmente, o que acaba contribuindo para que o consumo se dê apenas localmente.

Entre as espécies típicas do Cerrado *Eugenia dysenterica* DC. pertencente à família *Myrtaceae* e conhecida popularmente como Cagaita, já é utilizada na fabricação de doces, geleias, sorvetes, refrescos, sucos e licores (ROESLER et al., 2007; SILVA et al., 2001). Possui ampla distribuição geográfica e seu fruto tem formato globoso e levemente achatado, e casca fina de coloração amarelo-claro (BENDETTI et al., 2013).

Sua polpa corresponde a aproximadamente 90% do peso do fruto possui alta umidade, é rica em vitamina C e folatos, além de apresentar nutrientes, proteínas, lipídios, carboidratos e fibras, é bastante succulenta e com sabor levemente ácido (BENDETTI et al., 2013; BRITO, et al., 2003; ROESLER, et al., 2007). Segundo Cardoso et al. (2011) as características químicas da Cagaita, como pH ácido, baixa acidez titulável e elevada umidade, tornam o fruto apto para o desenvolvimento de bebidas.

As técnicas para a produção de bebidas fermentadas de frutas assemelham-se àquelas utilizadas na fabricação de vinhos feitos de uvas brancas e tintas (BERTAGNOLLI, 2014). Nesse contexto, as leveduras desempenham um papel fundamental, pois são elas, os micro-organismos que são usualmente empregados para desencadear o processo fermentativo que irá resultar na bebida fermentada. Além disso, as leveduras, por meio da metabolização do mosto podem contribuir para qualidade do produto final, através da geração de metabolitos secundários.

As espécies do gênero *Saccharomyces* tem ampla aplicação industrial, sendo a primeira escolha para a produção de álcool, por possuírem melhor predisposição para fermentar, elevada tolerância ao etanol e outros inibidores, gerados tanto durante o pré-tratamento das matérias-primas, tanto quanto, durante o processo fermentativo e a sua rápida capacidade de crescimento sob as condições aeróbicas distintivamente estabelecidas durante a fermentação em grandes escalas (KNAUF; KRAUS, 2006).

Entre as espécies desse gênero, a levedura a *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em diversos processos de produção de alimentos desde a antiguidade, constituindo-se como o principal micro-organismo utilizado durante a produção de bebidas fermentadas, especialmente vinhos. Contudo, nos últimos anos, a indústria vinícola tem enfrentado desafios, atualmente há uma demanda crescente para a produção de vinhos com níveis de glicerol superiores, devido a seus efeitos positivos sobre as propriedades sensoriais do vinho, e conteúdo de etanol mais baixos, devido aos seus efeitos negativos sobre a saúde (ARROYO-LÓPEZ et al., 2010). Desta forma, novas espécies de leveduras, como a espécie *Saccharomyces*

kudriavzevii, ganharam destaque tendo em vista que apresenta características fisiológicas interessantes que podem contribuir para a superação destes desafios (HENRIQUES et al., 2018).

Tendo em vista o exposto, a abordagem de estudo aprofundado sobre bebidas alcoólicas utilizando como mosto a Cagaita e co-culturas de leveduras *S.cerevisiae* e *S. kudriavzevii* torna-se justificável.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida alcoólica fermentada do fruto da Cagaita utilizando co-culturas de espécies de *Saccharomyces cerevisiae* (T-73) e *Saccharomyces kudriavzevii* (CR-85) a fim de elaborar um modelo que atenda ao mercado e aos consumidores, alcançando um fermentado de alta qualidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a influência das co-culturas na produção de biomassa e dos metabólitos etanol e glicerol;
- Determinar parâmetros fermentativos (Fator de conversão de Substrato em Produto, Velocidade Específica, Produtividade e Eficiência Fermentativa);
- Estudar da interferência das co-culturas no aroma final da bebida;
- Definir a proporção de leveduras adequada para a produção de metabólitos desejáveis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O POTENCIAL DO BIOMA CERRADO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, perdendo em extensão apenas para a floresta amazônica (FERNANDES, 2016; RIBEIRO; WALTER 1998). Sua área original ocupava cerca de dois milhões de km², ocorrendo como um grande bloco contínuo que cortava diagonalmente o país no sentido nordeste-sudoeste, estendendo-se por 15 estados e o Distrito Federal e ainda com áreas adjacentes na Bolívia e Paraguai (FERNANDES, 2016; SAWYER, 2016; MARIMON JUNIOR; HARIDASAN, 2005). Desse total, restam intactos cerca de 356.630 km², ou apenas 20% do bioma original, o que evidencia o grau de ameaça que o bioma vem sofrendo (FELFILI; SOUZA-SILVA; SCARIOT, 2005), isto pode colocar em risco, inclusive, a segura hídrica de diferentes regiões do país, visto que o bioma abriga as cabeceiras das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazonas/Tocantins, São Francisco e Prata) (SAWYER, 2016).

A diversidade de ambientes do Cerrado, conferida por sua heterogeneidade espacial (variação de ecossistemas ao longo do espaço), fazem com que ele apresente uma variedade de paisagens que, são constituídas por diferentes fisionomias de vegetação vinculadas a fatores físicos e fisiográficos como solos, relevo, clima e disponibilidade hídrica (FELFILI; SILVA JÚNIOR, 2005; MACHADO et al, 2004), outros fatores que influenciam na manutenção e distribuição das diferentes fitofisionomias do bioma são a ocorrência de fogo criminoso e as perturbações antrópicas.

Além disso, um mesmo tipo de vegetação, pode apresentar diferentes padrões florísticos também relacionados as condições do meio (FELFILI, SOUZA-SILVA; SCARIOT 2005). No que tange as fitofisionomias, elas englobam formações florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO; WALTER 1998), sendo o cerrado *sensu stricto*, uma vegetação savânica composta por um estrato arbóreo-arbustivo e outro herbáceo-graminoso (Eiten 1994), a vegetação predominante.

A biodiversidade do Cerrado é elevada e muito maior que a de savanas em outros continentes (FERNANDES, 2016). Diversos autores estimam que, no Cerrado, o número de espécies de plantas ultrapasse os 12 mil (FERNANDES, 2016; SAWYER, 2016; MARTINELLI; MESSINA; SANTOS FILHO, 2014; FORZZA et al., 2010) a ocorrência desse grande número de espécies, coloca a flora do bioma Cerrado como a mais rica entre as savanas do mundo (SAWYER, 2016 FELFILI; SOUZA-SILVA; SCARIOT, 2005). Além da riqueza vegetal, estima-se que bioma abrigue quase a metade das aves conhecidas no Brasil, dois terços dos mamíferos, cerca de 210 espécies de anfíbios, 1200 espécies de peixes, além de uma imensa riqueza de invertebrados e microrganismos (FERNANDES et al., 2016), sendo também encontrada uma alta taxa de endemismo em todos os grupos taxonômicos, resultante de uma longa e dinâmica história evolutiva conforme sugerem Silva e colaboradores (2005).

Por essas razões, o Cerrado, passou a ser considerado como um *hot spot*, áreas que possuem grande diversidade biológica, alto grau de endemismo e que sofrem ameaça devido a pressão antrópica, sendo, portanto, áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade mundial (FERNANDES, 2016; FELFILI; SOUZA-SILVA; SCARIOT, 2005).

Além de suas especificidades ambientais, o Cerrado também apresenta grande importância social e econômica. Diversos grupos de povos tradicionais, incluindo grupos indígenas, quilombolas, geraizeiros, ribeirinhos e quebradeiras de coco babaçu, utilizam-se do extrativismo como forma de sobreviver com qualidade de vida, explorando os recursos naturais de forma não predatória e compartilhando o conhecimento tradicional sobre a biodiversidade (SAWYER, 2016).

Quanto as espécies com potencial econômico, Sawyer (2016), destaca que já são conhecidas mais de 220 espécies de uso medicinal, no setor alimentício se sobressaem as espécies frutíferas de diferentes famílias, que produzem frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabores característicos. Dessas existem mais de 58 espécies de frutas nativas do Cerrado conhecidas e utilizadas, já sendo comercializadas em feiras e com grande aceitação popular (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).

O aproveitamento dos frutos nativos do cerrado depende de estudos da composição química dos alimentos para um melhor entendimento da relação entre nutrição e biodiversidade, especialmente em termos do processo de produção de alimentos para a nutrição humana. A convenção sobre diversidade biológica recomenda o uso sustentável da biodiversidade em programas relacionados com segurança alimentar e nutricional da população, bem como estimular a preservação e conservação do bioma natural (ALCÁZAR, 2005).

A utilização de frutos nativos na produção de alimentos e bebidas é importante para popularizar as espécies, agregando-lhes valor e gerando empregos, embora seja insuficiente para conter o desmatamento. É um caminho já percorrido com sucesso no caso de algumas espécies amazônicas, como o açaí, o cupuaçu e a castanha-do-Brasil (RIBEIRO, 2007).

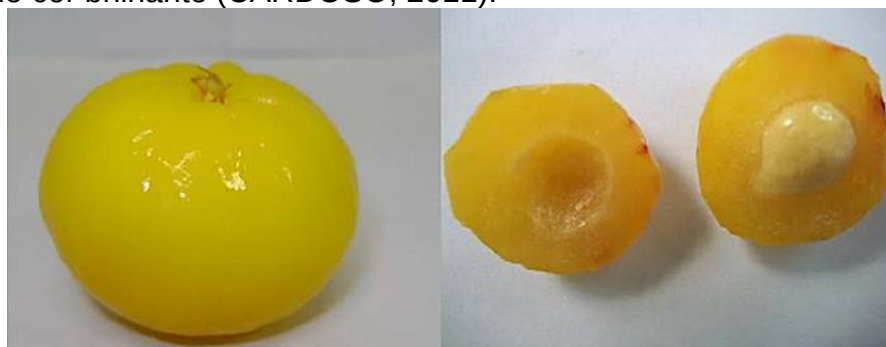
Os desafios para exploração dos frutos nativos existem, entretanto, há um grande potencial a ser buscado, principalmente, para a sua exportação, já que possuem sabores *sui generis* e não são encontrados em outros países (ALMEIDA et al., 1998).

3.2 CAGAITA (*Eugenia dysenterica* DC.)

Várias espécies do Cerrado produzem frutas que possuem características sensoriais únicas e altas concentrações de nutrientes, elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos (SILVA et al., 2001). Estas frutas desempenham papéis importantes, tanto economicamente, com comercialização de seus produtos, quanto nutricionais, com seu consumo. A Cagaitera (*Eugenia dysenterica* DC.) é um exemplo de espécie típica do Cerrado que se adéqua ao perfil descrito. Pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como “Cagaita”, a árvore “cagaitera” pode chegar a até 10 m de altura, possui tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada, tendo distribuição bastante ampla, sendo mais comum nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia, ocorrendo em cerrados e cerradões (CARDOSO et al., 2011; NAVES et al., 1999).

A estrutura da árvore é composta de copa extensa, ramos quadrados e lisos, com exceção aos botões, pedicelos, folhas e ramos juvenis que são considerados pubérulos. Pinata decídua, heliófita e setiva xerófila com folhas membranáceas, distintas, ovadooblongas, simples, com pecíolos curtos e subsésseis, glabras, com aroma e caducas no período de florescimento, com flores de formato sempre axilares, podendo ser vistas sozinhas ou organizadas em arranjos com três flores, hermafroditas e completas, diâmetro de 1,5-2 cm, com sua cobertura de pétalas de cor branca. Possui fruto (Figura 1) de formato globoso e achatado, cor amarelo-claro, variando de diâmetro entre 2-3 cm, interiormente são encontradas de 1 a 3 sementes de coloração branca, envolvidas por um mesocarpo e endocarpo levemente ácido e suculento, cálice seco aderido e casca de cor brilhante (DONADIO et al., 2002; LORENZI, 2000).

Figura 1 – Fruto da cagateira. O fruto apresenta formato globoso e achatado, cor amarelo-claro, variando de diâmetro entre 2 – 3 cm, interiormente são encontradas de 1 a 3 sementes de coloração branca, envolvidas por um mesocarpo e endocarpo levemente ácido e suculento, cálice seco aderido e casca de cor brilhante (CARDOSO, 2011).



Sua propagação é sexuada, apresentando tanto autofecundação quanto fecundação cruzada sendo a polinização, realizada principalmente no período matutino (SILVA, 1999; PROENÇA; GIBBS, 1994). O florescimento ocorre em meados de julho a início de agosto, no meio da estação seca, sendo simultâneo ao surgimento de folhas novas com coloração avermelhada (Figura 2) e iniciando sua frutificação a partir do quarto ou quinto ano de idade, com média do início da formação dos frutos e maturação de, aproximadamente, 4 semanas, sendo que a maturação é relativamente rápida e coincide com o início do período chuvoso variando de

outubro a dezembro, conforme o ano e o local (BRITO et al., 2003; SILVA et al., 1992).

Figura 2 – Flor e árvore de Cagaita. a) Flor da cagaiteira – apresenta formato axilar, podendo ser encontrada individualmente ou organizada em conjunto de três flores, é hermafrodita e completa, com diâmetro que varia de 1,5 – 2 cm e cor branca. b) Árvore de Cagaita – apresenta tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada e folhas de coloração avermelhada quando jovens (SILVA, 2016).



Com produção de frutos de grande potencial e com pouca oscilação na cadeia produtiva, podem ser encontradas inúmeras árvores com um montante de até 1.500 frutos na mesma safra. Seus frutos são considerados aptos para consumo quando os mesmos caem ao chão ou apresentarem coloração entre verde e amarelo, desprendidos das árvores ao sacudir com leveza os ramos (MARTINOTTO et al., 2008).

3.3 UTILIZAÇÃO DA CAGAITA

Considerada grande produtora de frutos e com potencial para utilização de planta ornamental, como fornecedora de cortiça, possui sua madeira também empregada para obras da construção civil, lenha e carvão (DUARTE et al., 2009).

Entretanto, é preciso precaução quanto a quantidade ingerida, uma vez os frutos podem ter efeito laxativo, enquanto o chá das folhas possui efeito antitérmico (MARTINOTTO et al., 2008; ROESLER et al., 2007). Em estudos ainda das folhas, Costa e colaboradores (2000), verificaram grande atividade antifúngica no óleo hidrolisado para o controle de *Cryptococcus neoformans*.

A Cagaita é uma fonte de alimento para diversos animais da fauna do bioma Cerrado como jabutis, veados, caititus, entre outros, correspondendo a um dos poucos alimentos disponíveis durante o período de estiagem e, em muitos casos, sendo a única fonte de líquido disponível (BRITO et al., 2003).

O rendimento de seu fruto para a produção de polpa irá depender da qualidade do fruto. Com frutos de boa qualidade e maduros, pode-se obter rendimentos superiores à 72% de polpa. A polpa possui alta umidade e observa-se na sua caracterização a presença de nutrientes como proteínas, lipídios, carboidratos e fibras (ROESLER et al., 2007; BRITO et al., 2003).

Oliveira et al., (2011) alcançaram em seus estudos fermentativos excelentes resultados ao elaborarem uma bebida fermentativa com sua polpa utilizando células livres e imobilizadas, com boa aceitação sensorial indicando que esta pode ser uma alternativa para o aproveitamento e a transformação dos frutos.

Carvalho et al., (2017) objetivando ampliar a escala de produção de etanol com sementes de Cagaita e caracterizar os perfis cinéticos de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em um biorreator mecanicamente agitado com volume efetivo de 5 litros, obtiveram resultados que comprovaram bons coeficientes de conversão e um rendimento volumétrico máximo de 3,02% de etanol com as sementes pré-tratadas com alfa-amilase. Os resultados comprovam a viabilidade técnica do aproveitamento desses resíduos da indústria alimentar como substrato em processos fermentativos.

3.4 BEBIDAS FERMENTADAS

O Brasil é um país com grande produção de frutas tropicais com potencial para ser utilizado pela indústria de alimentos. Nesse setor existe espaço para a otimização de diferentes métodos de processamento que visem minimizar as perdas de produção, além de permitir a introdução de novas fontes que sirva para o desenvolvimento de novos produtos (DUARTE et al., 2009; DIAS et al., 2007). Nesse sentido, as bebidas fermentadas apresentam-se como alternativa no desenvolvimento de tecnologias para a

obtenção de produtos derivados com maior período de vida útil e maior valor agregado (MUNIZ, 2002).

Aliados ao sabor agradável, os fermentados de frutas, podem conter uma grande variedade de compostos bioativos que atuam como antioxidantes. Atualmente, os compostos fenólicos têm se destacado e chamado atenção como agentes potenciais para a prevenção e o tratamento de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, agregando desta forma maior valor ao produto (SOUZA, 2015).

A produção de fermentados de frutas que não sejam obtidos através de uvas, tem tido grande aumento nos últimos anos (DUARTE et al., 2010), sendo possível a utilização de um variado número de frutas, para a elaboração de mostos que podem ser submetidos à fermentação (DIAS et al., 2007).

Algumas frutas como a laranja, goiaba, abricó, abacaxi e a manga (SANDHU; JOSHI, 1995) já fornecem fermentados bastante apreciados e saborosos. Mas existem inúmeras espécies de frutos tropicais como cajá, cacau, siriguela, graviola, camu-camu, acerola, kiwi e a Cagaita, cujo potencial pode ser explorado, algumas dessas com resultados promissores demonstrados em diversos estudos, como o de Dias et al., (2007) que obtiveram um fermentado com alta aceitabilidade sensorial a partir através de uma seleção de leveduras do gênero *S. cerevisiae* e do mosto de cacau (*Theobroma cacao* L.). Assim, o processo de fermentação pode ser uma excelente opção para o aproveitamento desses recursos e para geração de bebidas com valor nutricional agregado (AZEVEDO et al., 2007).

A legislação brasileira, em seu Decreto nº. 6871 de 04/06/2009 que regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas, em seu artigo de número 44, denomina que o fermentado de fruta é a bebida obtida através da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura de uma espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos ser adicionado de água com graduação alcoólica de 4-14% em volume, a 20 °C, onde na mesma poderá haver a adição de açúcares durante o processo (BRASIL, 2009).

Para produção de bebidas fermentadas de frutas, são utilizadas técnicas que se comparam àquelas realizadas na fabricação de vinhos feitos de uvas brancas e tintas. Existem duas diferenças: é ligeiramente mais difícil a extração de açúcar e outros materiais solúveis da polpa de alguns frutos em comparação com a extração do mesmo em uvas e, os sucos obtidos da maioria dos frutos possuem baixos teores de açúcar e uma taxa maior de ácidos (BERTAGNOLLI, 2014).

A legislação brasileira limita a concentração de sacarose apenas para sidra, o que permite estudos tecnológicos para o aproveitamento de frutos com baixas concentrações de açúcares, para elaboração de bebidas alcoólicas fermentadas. Entretanto, a adição de sacarose em concentrações superiores aos do fruto pode ocasionar perda de suas características, levando à necessidade de estudos em relação aos limites para correção do açúcar para cada espécie utilizada para elaboração de bebida alcoólica fermentada (MAEDA; ANDRADE, 2003). No que se trata de tecnologia voltadas especificamente a elaboração de fermentados de frutas, é necessário que se estabeleça parâmetros claros quanto à leveduras a ser utilizada, temperatura ideal de fermentação, o tratamento que deve ser aplicado para a obtenção do mosto, ou que a própria fruta, deve sofrer na fase pré-fermentativa (DIAS; SCHAWN; LIMA, 2003). Todas essas carências justificam o fato de que as técnicas de elaboração de bebidas fermentadas de frutas, devam se assemelhar àquelas para a produção de vinhos, vinificação.

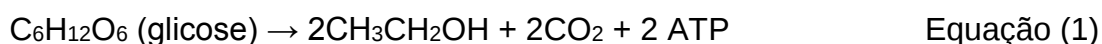
3.5 PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo é uma das reações bioquímicas conhecidas pelo homem desde a antiguidade. No Egito antigo, em torno de 5.000 a.C., já se usava a fermentação, porém, sem conhecimento científico sobre o processo. Os primeiros produtos eram feitos com base na fermentação natural de sucos de frutas, que deram origem aos primeiros tipos de vinhos, desde então as bebidas alcoólicas podem ser obtidas de fontes naturais de açúcares e amiláceos, como frutas, cana-de-açúcar dentre outros (AQUARONE et al., 2001; GAVA et al., 2010).

Apesar do processo fermentativo ser utilizado desde a antiguidade, foi em 1860 que o químico francês Louis Pasteur demonstrou cientificamente que a fermentação alcoólica ocorria devido células de levedura (BARNETT, 2003). Com o advento dos estudos a fermentação alcoólica, ao final do século XIX, a produção de etanol já era um processo amplamente utilizado, inclusive para fins combustíveis; tanto que Henry Ford, pioneiro da indústria automobilística, projetou automóveis para rodar com etanol (SONGSTAD et al., 2009).

A fermentação alcoólica é um processo catabólico e anaeróbico que não envolve cadeia respiratória ou citocromos. Nesse processo ocorre a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de um microrganismo (leveduras ou bactéria) até a formação de etanol e dióxido de carbono, havendo liberação de energia química e térmica. Além de diversas outras reações e transformações que ocorrem no mosto, acabando por produzir um caldo alcoólico muito aromatizado (NELSON; COX, 2014; RODRÍGUEZ-BENCOMO, 2012).

A estequiométrica da fermentação alcoólica da glicose é dada pela Equação (1):

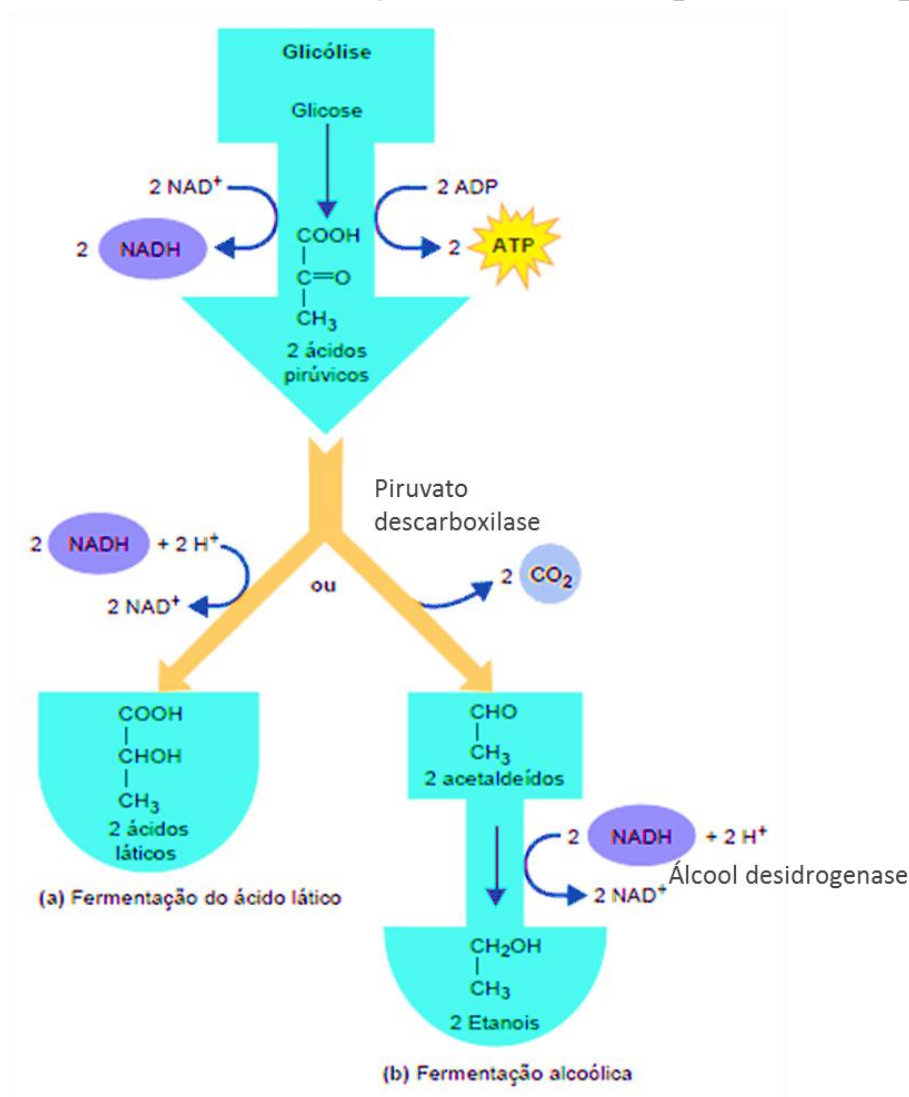


Em leveduras, essa transformação da glicose (ou outro monossacarídeo) em duas moléculas de álcool e dióxido de carbono é feita graças à presença de certas enzimas intracelular. As leveduras, além de outras enzimas, produzem a invertase, responsável pela transformação da sacarose em uma molécula de glicose e uma de frutose, ambas com a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Após a inversão, a primeira reação, o piruvato é descarboxilado, produzindo acetaldeído e liberado dióxido de carbono. Na segunda reação, o acetaldeído é, então, reduzido para produção de etanol e paralelamente uma molécula de NADH é oxidada a NAD^+ para cada molécula de etanol produzida (Figura 4) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O esquema da reação, junto com a equação global, é dado na Figura 4. Há uma grande redução na complexidade entre o início, com moléculas maiores (açúcares fermentescíveis), ao fim, resultando em

produtos mais simples (etanol e gás carbônico). Essa diferença de energia interna é que torna o processo fermentativo termodinamicamente favorável na qual parte dessa energia é utilizada pelo o micro-organismo para seu metabolismo como parte de obtenção primária de energia (NELSON; COX, 2011; TORTORA et al., 2012).

Figura 3 - Esquema dos tipos de fermentação com a sequência enzimática simplificada da conversão de glicose a etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).



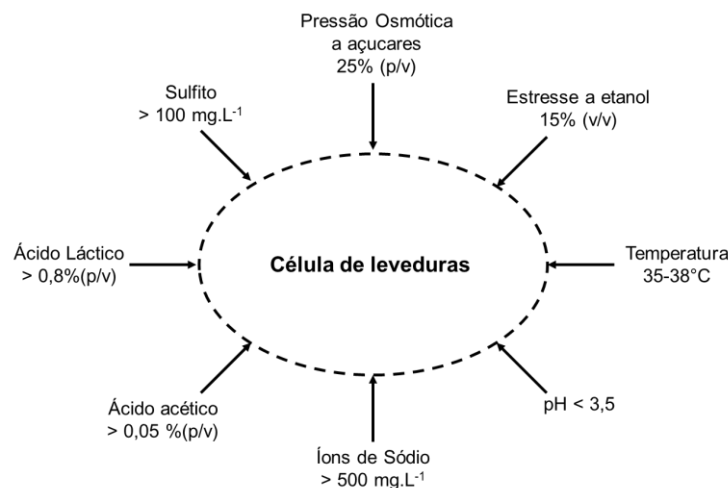
A nível bioquímico a fermentação é definida como um processo que:

a) libera energia a partir de açúcares ou outras moléculas orgânicas (aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas) como suprimento de

energia para manutenção e crescimento; b) não necessita de oxigênio; d) usa uma molécula orgânica comoceptor final de elétrons; e e) produz pequena quantidade de ATP (adenosina trifosfato), somente uma ou duas moléculas de ATP para cada molécula de matéria inicial, porque grande parte da energia original na glicose permanece nas ligações químicas dos produtos orgânicos finais, como o ácido láctico ou o etanol (PÉTER; ROSA, 2005; TORTORA et al., 2012).

No decorrer das fermentações, as leveduras sofrem inúmeras tensões, algumas na ordem ambiental (deficiência de nutrientes, alta temperatura e contaminação) ou até mesmo do metabolismo (inibição do etanol ao crescimento e produção de etanol). A Figura 4 resume algumas dessas tensões. Algumas delas são sinérgicas, afetando as células de levedura mais severamente do que de forma única, levando a redução da viabilidade e vigor das leveduras, bem como menor produção de etanol (BAI et al., 2008).

Figura 4 - Efeitos do Ambiente da Fermentação para as Leveduras *S. cerevisiae* (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).



i. Produção de Biomassa

A atividade da via TCA (ciclo de Krebs) é mantida durante a fermentação para reações biosintéticas fornecendo matéria-prima com compostos de quatro e cinco carbonos, nomeadamente oxaloacetato e 2-oxoglutarato, precursores de aspartato e glutamato. A síntese desses

aminoácidos é precursora do componente de constituição da biomassa resultante ativamente na formação líquida de NADH na matriz mitocondrial (VISSER et al., 1994). Essa via não só funciona para fins sintéticos de constituintes de biomassa, mas também como produção de ácidos orgânicos. E se tratando de rendimentos, tipicamente em cultivos com glicose em condições respiratórias o rendimento de biomassa é de 0,5 g de biomassa por g de glicose, enquanto o rendimento de biomassa de fermentação anaeróbia é 5 vezes menor (VERDUYN, 1991).

Na prática, a formação de biomassa é acompanhado de um consumo líquido de NADPH e um produção líquida de NADH. Durante o crescimento respiratório, o excesso de NADH produzido, na assimilação e na produção de metabólitos, é reoxidada pela respiração mitocondrial e contribui para satisfazer a exigência global de ATP do crescimento. No entanto, como a fermentação alcoólica de glicose é um processo redox-neutro, a formação de etanol não pode ser responsável pela reoxidação das NADH, para isso utiliza-se da redução da glicose em glicerol ($\text{glicose} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{glicerol} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 2\text{NAD}^+$) (BAKKER et al., 2001).

ii. Produtos da fermentação etanólica: Glicerol

Além de etanol e CO₂, vários subprodutos também são produzidos durante a fermentação alcoólica. O glicerol, produzido a um nível de cerca de 1,0% (p/v) para a maioria das fermentações com etanol, é o principal destes subprodutos (LIU et al., 2008).

As reações que levam a produção de glicerol são dadas pela redução do fosfato de dihidroxiacetona em glicerol-3-fosfato seguido por uma desfosforilação de glicerol-3-fosfato em glicerol. O primeiro passo é catalisado pela glicerol-3-fosfato desidrogenase que transforma o NADH em NAD⁺, enquanto que a segunda reação é catalisada pela atividade de glicerol-3-fosfatase (ERIKSSON et al., 1995; LARSSON et al., 1993).

A produção do glicerol na fermentação é uma forma de satisfazer o balanço redox durante o crescimento sob condições anaeróbicas, uma vez que oxidam enzimaticamente o NADH intracelular a NAD⁺. Assim, além dessa biomolécula servi como osmorregulador para as leveduras (VAN

DIJKEN; SCHEIRS, 1986), a biossíntese de glicerol em condições anaeróbias, está principalmente ligado ao metabolismo redox (VAN GULIK; HEIJNEN, 1995).

Subsequente às reações enzimáticas de produção de ATP, e intrínsecas à formação de etanol, as rotas metabólicas alternativas aparecem para promover a formação de materiais necessários à constituição da biomassa, bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência do microrganismo. Desta maneira, juntamente com o álcool e o dióxido de carbono, o metabolismo anaeróbio permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), além de outros compostos de menor significado quantitativo (AQUARONE et al., 2001).

Teoricamente, o rendimento fermentativo é de 0,511 g de etanol e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada. Dois ATPs produzidos na glicólise são utilizados para direcionar a biossíntese de macromoléculas, o que envolve uma grande variedade de reações que requerem energia. Sem o consumo contínuo de ATPs pelas células em crescimento, o metabolismo glicolítico é interrompido imediatamente, pois o acúmulo intracelular de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas mais importantes envolvidas na regulação da glicólise (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

No processo de fermentação de vinhos a conclusão se dá quando os açúcares (glicose e frutose) são completamente consumidos. Em tempos remotos, a obtenção do vinho, era realizado em barris de madeira e ou tanques de concreto. Contudo, na atualidade, dornas de aço inoxidável são frequentemente utilizados, pois permitem o controle da temperatura (principalmente resfriamento) durante o processo (FLEET, 1997).

O glicerol é também um subproduto derivado da fermentação alcoólica, porém, em alíquotas menores quando comparado ao álcool, é considerado quantitativamente mais importante depois do álcool e do dióxido de carbono. A formação do glicerol é influenciada por muitos fatores, como, substrato inicial, concentração de biomassa, pH, temperatura, fonte de

nitrogênio, taxa de aeração, adição de dióxido sulfúrico e taxa de inoculação. Vários estudos demonstraram que o aumento na temperatura leva a uma maior produção de glicerol (REMIZE, SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000; ALBERS et al., 1996).

A viscosidade (corpo) do vinho está diretamente ligado ao etanol que atua como fixador de aroma, considerado como principal componente. Enquanto o glicerol, não contribui diretamente para o aroma, contudo, contribui significativamente para a qualidade final do vinho, proporcionando doçura, suavidade e plenitude (OZBAS, 2008; MINGORANCE-CAZORLA et al., 2003;). Dessa forma salienta-se a importância da produção de etanol e glicerol para bebidas fermentadas, para garantir qualidades requeridas.

3.6 MICRORGANISMO RESPONSÁVEL PELA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Rosa e Péter (2006) relatam que historicamente, um dos primeiros usos das leveduras foi durante a Primeira Guerra Mundial quando a Alemanha usou células de *S. cerevisiae* como um substituto de carne para consumo humano.

Atualmente, as leveduras são os principais microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica, embora outras variedades como bactérias possam também produzir álcool (PACHECO et al., 2002). A bactéria *Zymomonas mobilis*, por exemplo, vem despertando muito interesse nos últimos 15 anos (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009). Leveduras selvagens como as dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* e *Metschnikowia* podem ser encontradas em processos de produção de cerveja (JESPERSEN, 1998), fermentação espontânea de vinhos, fermentados naturais de alimentos e bebidas obtidas por fermentação natural em países da África e Ásia (AIDOO et al., 2006).

As leveduras são descritas como fungos unicelulares se diferenciando das bactérias em sua morfologia por possuírem maior comprimento celular, apresentando células de formato oval, alongadas, elípticas ou com corpo celular esférico, variando entre 5 a 8 µm de diâmetro.

Algumas são bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores, possuem particularidades que podem levar à formação de um micélio verdadeiro, quando após divisão celular, as células mantêm-se unidas. São encontradas espalhadas na natureza, colonizando ambientes terrestre, aéreos e aquáticos, tal fato está intimamente relacionada com a sua adaptabilidade fisiológica a um ambiente altamente variável (JAY, et al., 2005; FRANCO, 2004; FLORES, et al., 2000).

As *Saccharomycetales* fazem parte de uma riqueza de dados funcionais e diversidade em sua genética, abrangendo 500 – 1000 milhões de anos de evolução (DUJON, 2010; TAYLOR; BERBEE, 2006; DUJON et al., 2004; PISKUR; LANGKJAER, 2004). Este grupo de microrganismos teve papel significativo nas atividades humanas por milênios, sendo relatada a sua utilização para a fermentação de cerveja e para a fabricação de pão no Oriente Médio, bem como na China onde há cerca de 8000 – 10000 anos atrás (McGOVERN et al., 2004).

Em virtude disso, na grande maioria das vezes, as leveduras são citadas e lembradas pela espécie *S. cerevisiae* e pela sua capacidade de produção de bebidas alcoólicas através de processos bioquímicos de fermentação. Todavia, este microrganismo, considerado domesticado, representa apenas uma proporção da vasta biodiversidade e variedade de potenciais biotecnológicos das leveduras no mundo. Estudos da diversidade metabólica realizados nas últimas décadas das chamadas leveduras não convencionais (*Nonconventional yeasts* – NCYs), revelaram abundantes e promissoras propriedades biotecnológicas onde as vias metabólicas ligadas ao metabolismo central de carbono são basicamente idênticas entre diferentes espécies de leveduras, sugerindo que esses microrganismos podem constituir um grupo metabólico homogêneo. No entanto, os mecanismos de absorção de nutrientes, o número de diferentes isoenzimas e, sobretudo, a regulação da fermentação e da respiração diferem e tornam as leveduras um grupo metabólico altamente heterogêneo e complexo substancialmente (FLORES et al., 2000).

Em leveduras, tal como outros organismos heterotróficos, a energia e o metabolismo de carbono estão intimamente interligados, isto é, o

anabolismo é acoplado com catabolismo. O ATP é fornecido pela oxidação de moléculas orgânicas que também atuam como fontes de carbono para a biossíntese e, em última análise, é usado como moeda energética para todos os tipos de trabalho celular (RODRIGUES et al., 2006). Dessa forma um estudo que envolve dois tipos de leveduras pode levar uma maior compreensão da cinética de crescimentos e produção de metabólitos durante a produção de bebida fermentada.

3.7 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VERSUS *SACCHAROMYCES KUDRIAVZEVII*

As leveduras, singularmente as do gênero *Saccharomyces*, industrialmente são consideradas, de acordo com Knauf e Kraus (2006) a primeira escolha para a produção de álcool, por possuírem melhor predisposição para fermentar, elevada tolerância ao etanol e outros inibidores, gerados tanto durante o pré-tratamento das matérias-primas tanto quanto durante o processo fermentativo e a sua rápida capacidade de crescimento sob as condições aeróbicas distintivamente estabelecidas durante a fermentação em grandes escalas.

Existem cerca de 25 cepas de *S. cerevisiae* que possuem propriedades fisiológicas diferentes e que são de grande relevância para aplicação biotecnológica. Muitas delas, antes, eram consideradas de outras espécies (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011; RAINIERI et al., 2003).

No quesito taxonômico, Vaughan-Martini e Martini (2011) relatam que, as *S. cerevisiae*, participam ao domínio dos *Eukaryoto*, reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, de ordem *Saccharomycetales* e da família *Saccharomycetaceae* pertencentes do gênero *Saccharomyces*. Possuem formato esférico, esferas elípticas, ovais, não flageladas, formam colônias cremosas, brilhantes com bordas regulares e crescimento apical. Existe uma variação nos tamanhos das células haploides e diploides. As diploides são elipsoides de 5x6 µm, enquanto as células haploides esferoides de 4 µm de diâmetro (SHERMAN, 2002).

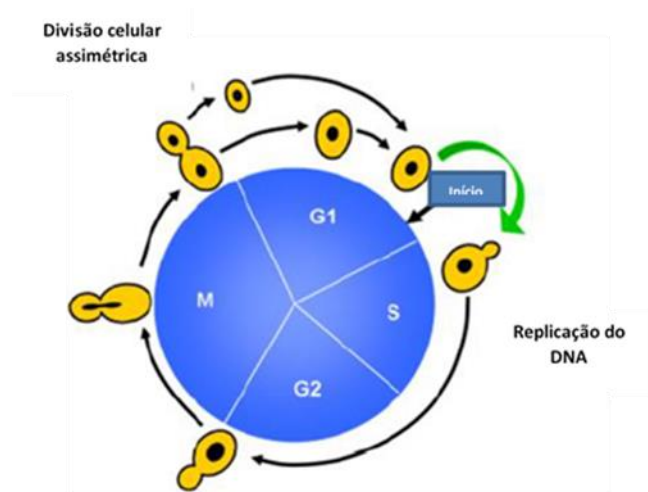
Quanto à constituição celular, as células de *S. cerevisiae*, apresentam: citoplasma, parede celular e núcleo. A parede celular, cuja

função é dar proteção as células, apresenta-se como uma camada fina e flexível nas células jovens e espessa e rígida em células mais velhas, sendo permeável para inúmeros compostos em soluções, nela também são observadas numerosas cicatrizes circulares e elípticas de onde derivaram as células filhas (BECZE, 1955).

A parede celular da *S. cerevisiae* representa um considerável emprego bioquímico, constituindo 15 a 30% do peso seco das células vegetativas. Até três camadas de parede celulares podem ser isoladas por microscopia eletrônica. Possui mitocôndrias, mas não cloroplastos. Quando os nutrientes estão abundantes, ela se reproduz quase tão rapidamente como uma bactéria. Como o seu núcleo contém apenas cerca de 2,5 vezes mais DNA do que *Escherichia coli*, essa levedura também é um bom modelo para análise genética. Mesmo que o seu genoma seja pequeno (para os padrões eucarióticos), *S. cerevisiae* realiza todas as tarefas básicas que cada célula eucariótica deve realizar diferindo em sua composição química, e a arquitetura relativamente simples da parede de *S. cerevisiae* é considerada um modelo para outros fungos (ALBERTS et al., 2017; MOLINA et al., 2000; de NOBEL et al., 2000).

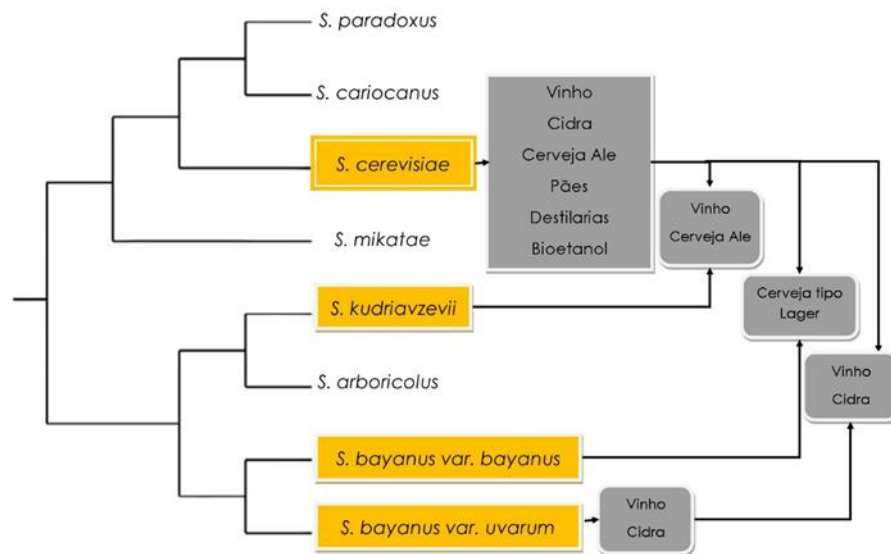
No que se refere a reprodução, ela pode ser assexuada, por brotamento, ou sexuada (TORTORA et al., 2017). A reprodução por brotamento da *S. cerevisiae*, ilustrada na Figura 5, acontece quando às condições nutricionais se encontram favoráveis, fazendo com que a levedura dobre sua massa a cada 90 min. O ciclo de divisão celular em multiplicação vegetativa é composto por quatro fases: G1 (período no qual precede a síntese do DNA), S (síntese do DNA), G2 (período que precede a mitose) e M (mitose) durante a fase S um broto é formado pela célula chamada de “célula mãe” que cresce originando uma célula (“célula filha”) de formato elipsoidal. Os 17 cromossomos da célula haploide são dobrados no ciclo celular mitótico e posteriormente distribuídos para cada uma das células. A célula considerada “filha” é razoavelmente menor comparada a “célula mãe” que possui seu tamanho aumentado antes do início da próxima duplicação cromossômica (ROSA; PÉTER, 2006; TAXIS, 2005; PHAFF, 2001; HERSKOWITZ, 1988).

Figura 5 – Ilustração representativa do ciclo celular por brotamento da *S. cerevisiae*. A primeira etapa do ciclo é a fase G1 e precede à síntese de DNA que ocorre na fase S, nessa fase a célula mãe duplica seu material genético e tem-se o início da formação de um broto. Na fase G2 são feitas as checagens para verificação de possíveis erros ocorridos durante a replicação do DNA, logo após é iniciada a mitose que resultará na formação de uma célula filha menor e geneticamente idêntica a célula mãe (LÓPEZ-MALO, 2013).



Apesar do uso mais difundido da *S. cerevisiae*, outras espécies do gênero *Saccharomyces* como a *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces paradoxus* e cepas híbridas como a *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* (GONZÁLES et al., 2008; NAUMOV et al., 2000) e *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum* (ZHANG et al., 2015; DEMUYTER et al., 2004), tem sido também associadas com o ambiente biotecnológico, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Esquematização das relações filogenéticas entre as espécies de *Saccharomyces* e suas utilizações industriais. As espécies envolvidas nos processos e/ou híbridas estão representadas nos quadros amarelos. Os produtos dos processos industriais envolvidos as híbridas e não híbridas estão nos quadros de cor cinza. As setas correspondem às híbridas (Adaptado de DEQUIM e CASAREGOLA, 2011).



A levedura *S. kudriavzevii* tem sido principalmente isolada em ambientes naturais e matéria orgânica, como folhas em decomposição e em amostragens ambientais recentes, *S. kudriavzevii* foi associada a árvores de carvalho em simpatizantes associações com *S. cerevisiae* em todo território do Mediterrâneo. Contudo, é importante observar que *S. kudriavzevii* nunca foi descrita em vinícolas e só foi isolado de habitats naturais no Japão. Se esses híbridos são originários de eventos ocorridos no ambiente de produção, ou na natureza é desconhecido (SAMPAIO; GONÇALVES 2008; GONZÁLEZ et al., 2007; NAUMOV et al., 2000).

Fisiologicamente, como a *S. bayanus*, sua caracterização mostra criotolerância, tendo seu crescimento a baixas temperaturas (10 – 15°C) (GONZALEZ et al., 2006; LOPANDIC et al., 2007).

Belloch e colaboradores (2009) citam que, além disso, as experiências comparativas de hibridização do genoma (aCGH) combinadas com análise de conteúdo de DNA forneceram evidências de rearranjo cromossômico e reorganização do genoma em vários desses híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Para obter uma compreensão mais detalhada da dinâmica do genoma de um híbrido de levedura de vinho, Bradbury e colaboradores (2006) sequenciaram o genoma da levedura de vinhos

comerciais VIN7, que, com base em microsatélite e genotipagem de ITS, foi previamente sugerido que *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* é um híbrido natural interespecífico.

Esta cepa, recentemente ganhou popularidade entre muitos produtores de vinhos devido à sua capacidade de liberar quantidades muito maiores de 4-mercapto-4-metilpentano-2-um (4MMP) tiol frutado de precursores não-aromáticos derivados de uva do que outras cepas de leveduras comerciais de vinho (SWIEGERS et al., 2009).

Os híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* possuem capacidades fermentativas em mostos à baixas temperaturas, demonstrando esta capacidade de boa fermentação sob 14, 18 e 22 °C, menor produção de etanol, aumento na produção de glicerol sem aumentar as taxas de ácido acético (GONZÁLEZ et al., 2007).

Os dados fisiológicos sugerem que os híbridos *Saccharomyces* podem ter herdado a capacidade de crescer a altas temperaturas (30-37 °C) e tolerância ao etanol de seus parentes de *S. cerevisiae* e capacidade de crescer a baixas temperaturas (10-16 °C) do parentesco entre *S. bayanus* e *S. kudriavzevii*. Estudos semelhantes foram realizados com híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. uvarum* indicaram que eles possuem a capacidade criotolerante oriunda da *S. uvarum* e a tolerância ao etanol da *S. cerevisiae* (TRONCHONI, et al., 2014; SALVADÓ et al., 2011).

Portanto, algumas dessas novas espécies alternativas à *S. cerevisiae* poderiam ajudar a enfrentar os desafios que enfrenta a indústria do vinho, como o causado por problema das mudanças climáticas. A mudança climática afeta a viticultura de uma maneira direta, pois, devido ao aumento da temperatura, ocorre uma maturação excessiva da uva, que gera mostos com maior concentração de açúcares, onde sucessivamente, vinhos com maiores teores alcoólicos (JONES et al., 2005).

O maior problema que enfrentam as espécies *S. kudriavzevii* e *S. uvarum*, é que existe uma dificuldade da realização da fermentação com cepas puras por elas mesmas, contando que no fato em que esta fermentação ocorre, apresenta uma microbiota natural que contém estirpes de *S. cerevisiae* que se sobressaem ao resto graças à sua alta capacidade

de fermentação e tolerância ao etanol. A *S. kudriavzevii* pode respirar mais tempo e também a sua fermentação não é tão eficaz, por isso requer a via de glicerol para compensar o potencial redox que ocorre com a glicólise (GONZALÉZ et al., 2007).

Portanto, *S. kudriavzevii* aumenta o teor de glicerol e produz uma maior quantidade de biomassa. Este fato demonstra uma diferença importante na regulação do metabolismo respiro-fermentativo entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (OLIVEIRA, 2016).

3.8 UTILIZAÇÃO DE CO-CULTURAS E CULTURAS MISTAS

Atualmente a maioria dos produtos derivados da biotecnologia industrial são produzidos através da utilização de uma única espécie microbiana. No entanto, existem inúmeros casos em que a utilização de co-culturas mostra ser vantajosa quando comparada a utilização de uma única cultura. Isto se dá devido ao potencial sinérgico das vias metabólicas de todas as cepas que são envolvidas no processo utilizando co-culturas (BADER et al., 2010).

As co-culturas são definidas como a incubação anaeróbica ou aeróbica de diferentes cepas microbianas especificadas em condições assépticas. Já as culturas mistas podem ser definidas como a incubação anaeróbica ou aeróbica de diferentes microrganismos, por vezes não especificados e podem ser conduzidas em condições sépticas. Onde, a degradação e metabolização dos substratos se dá devido a atividade metabólica combinada, ou não, das cepas microbianas.

Em geral espécies de leveduras dos gêneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* conseguem sobreviver junto com as do gênero *Saccharomyces*, com predominância dependente da fase do processo. A sobrevivência e persistência dessas espécies irá depender de sua co-interação, e também das condições fermentativas empregadas a elas. Quando em co-culturas com *S. cerevisiae*, as leveduras não-*Saccharomyces* parecem ser menos tolerantes a baixas concentrações de oxigênio. O crescimento e consequente consumo de oxigênio por *S. cerevisiae* nos primeiros estágios da fermentação pode

contribuir para a morte precoce das outras leveduras presentes (FLEET, 2003).

Quando se trata da tolerância a concentrações superiores à 5-7% (v/v) de etanol, grande parte de leveduras não-*Saccharomyces* não se mostram tolerantes, o que explica a sua morte de acordo com o avanço do processo fermentativo acima de seu estágio mediano. Em contrapartida, culturas mistas com agregação de *S. cerevisiae* e *I. orientalis*, Kim e colaboradores (2008) foram capazes de produzir 7,8%_{v/v} de etanol na produção de vinho e reduzir em até 70% de ácidos orgânicos como o ácido málico do produto final.

Recentemente, o interesse pelo desempenho de cepas não-*Saccharomyces* vem aumentada durante o processo de fermentação alcoólica de mosto de uva. Estudos mostraram que estas cepas podem impactar a composição química do vinho e que sua contribuição para a vinificação é bastante significativa (COMITINI et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2009).

A fermentação de vinhos quando conduzida através da flora natural, pode levar a diminuição do produto obtido ao fim do processo e a instabilidades na qualidade final do vinho. À vista disto, processos alternativos vêm ganhado relevância no que se refere ao processo tradicional de fermentação, a exemplo daqueles que fazem o uso de culturas iniciais não-*Saccharomyces* juntamente com cepas de *Saccharomyces*. Os inóculos mistos contendo estripes não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* evidenciaram reproduzir a fermentação natural, evitando o risco de fermentações bloqueadas (CIANI et al., 2006; JOLLY et al., 2006; ROJAS et al., 2003; ROMANO, 2003; HEARD, 1999; BISSON; KUNKEE, 1993).

Um exemplo desse tipo de abordagem foi realizado por Bely e colaboradores (2008), que com utilização de co-culturas entre *Torulaspora delbrueckii* e *S. cerevisiae* obtiveram uma produção de acidez menos volátil e acetaldeído em fermentação com alto teor de açúcar. Santos (2017) ao avaliar o estudo da competência de *S. cerevisiae* em co-culturas para a produção de etanol, verificou que a maioria das combinações entre três leveduras apresentam comportamento metabólico semelhante. A partir do

delineamento de mistura pôde elaborar modelos matemáticos que predizem a quantidade de etanol, biomassa, glicerol, ácido acético e sacarose residual nas misturas das quatro leveduras. O estudo também conseguiu identificar que o ensaio com a mistura de leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e PEDRA-2 apresentou maior produção de etanol na proporção de 1:1 da concentração de inóculo, e ainda neste cultivo a CAT-1 se sobressaiu em quantidade de leveduras.

3.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS (AROMAS)

Cada dia mais os consumidores de vinhos e bebidas fermentadas educam-se e buscam por produtos de alta qualidade. Nesse sentido, a composição química e as características das matérias-primas utilizadas na fabricação influenciam diretamente na qualidade do produto final, dando-lhes personalidade e particularidades que podem ser o seu diferencial. A procura por vinhos de qualidade justifica-se pela busca do consumo de um produto capaz de conferir uma sensação imediata e complexa, nos planos visual, gustativo e olfativo (GUERRA, 2002).

Entre os diversos fatores que influenciam na qualidade das bebidas fermentadas, os compostos fenólicos revestem-se de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente com a qualidade dos vinhos (GUERRA et al., 2006). Tais compostos estão relacionados com a cor, corpo e adstringência dos vinhos e são de fundamental importância para diferenciação dos tipos de vinhos.

No que se refere aos compostos que estão relacionados diretamente a formação dos aromas, eles possuem como característica comum o baixo peso molecular, geralmente inferior a 400 daltons. Atualmente, já foram identificados mais de 800 compostos voláteis em vinhos e sabe-se que somente algumas dezenas são aromas ativos para finalidades de diferenciação. Estes compostos pertencem a diversas classes químicas e estão presentes em concentrações que vão desde nanogramas a miligramas por litro (OLIVEIRA, 2015).

Entre essas classes químicas estão os hidrocarbonetos, terpenos, alcoóis, cetonas e os ésteres, dentre outros. Eles atuam em conjunto

formando misturas complexas que desencadeiam a sensação do aroma (MOLINA, 2016).

Nem todos os compostos voláteis presentes são aromas, na verdade trata-se de um conjunto formado de misturas complexas que geram a sensação de aroma. Visto que observado que nem todos os compostos voláteis são aromas, e que se tratam de um conjunto formado de misturas complexas gerando assim a sensação de aroma. Desta forma, conhecer quais levedura leva a maior geração de compostos voláteis requisitado pelo consumidor gera informações que pode ser utilizadas para a escolha da cepa e característica requerida da bebida fermentada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada em duas etapas, uma delas ocorreu no laboratório de Engenharia Bioquímica e Laboratório MultiLab da Regional Goiânia – Campus Samambaia localizados na Universidade Federal de Goiás, campus Goiânia e outra na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, campus Santa Mônica, Uberlândia, Minas Gerais.

4.1 FRUTOS

Os frutos de Cagaita (*E. dysenterica* DC.) foram coletados no mês de outubro de 2016 em Goiânia, Goiás, Brasil na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (16°35'45" S, 49°16'49,9" W e 724 m de altitude). Os frutos amadurecidos de cor amarelada, de caducidade espontânea que estavam caídos sob o solo foram coletados manualmente, aqueles que estavam em bom estado para coleta e presos aos troncos, receberam leves impulsos para que fossem coletados. Posteriormente, foi realizada uma pré-seleção visual dos frutos para que fossem descartados aqueles que apresentassem injúrias mecânicas, biológicas ou que não se encontrassem em estado apropriado para utilização. Em seguida, foi feito o acondicionamento dos frutos em baldes de polietileno para o transporte até a planta piloto de processamento de Vegetais situado na Faculdade de Engenharia de Alimentos.

4.2 MOSTO DE CAGAITA

Após a colheita e transporte em baldes de polietileno com volume de 11 L, os frutos foram escolhidos de acordo com a maturação e aspecto, foram selecionados frutos sem injúria física, podridão ou contaminação física/biológica visíveis, os demais foram descartados.

Logo depois os frutos foram lavados em um tanque de aço inoxidável com solução de detergente neutro (Limpol, Bombril S.A., São Bernardo do Campo, São Paulo), enxaguados com água corrente e imersos em solução

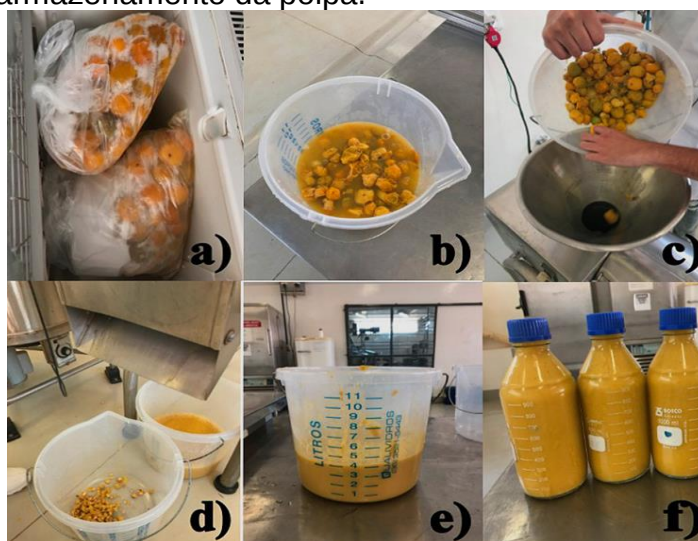
de hipoclorito de sódio a 0,03 % (Ypê, Química Amparo Ltda., Amparo, São Paulo) por 30 min e seguido de novo enxágue com solução clorada à 0,001%, com intuito de eliminar possíveis microrganismos. Em seguida os frutos foram congelados em sacos plásticos para futuro processo de despulpamento.

Todos os utensílios e equipamentos utilizados foram limpos com solução de detergente neutro (Limpol, Bombril S.A., São Bernardo do Campo, São Paulo), enxaguados em água corrente em abundância e em seguida foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,03 % por 30 min, posteriormente foram enxaguados com solução clorada à 0,001 % e congelados para utilização nas etapas subsequentes.

Para o preparo do mosto, os frutos foram descongelados a temperatura ambiente de um dia para o outro e em seguida foram transferidos para o recipiente previamente higienizado e sanitizado.

A polpa foi obtida por meio de despulpamento mecânico através de despulpadora rotativa em aço inoxidável (ITAMETAL® BONINA 0.25 df MODELO 025DFA8), utilizando peneira 10 mesh (2 mm), para separação da casca e caroço da polpa. A polpa foi transferida para frascos de vidro de volume de 1 L previamente higienizados e esterilizados conforme Figura 7.

Figura 7 – Obtenção da polpa de Cagaita: (a) Frutos de Cagaita congelados; (b) frutos após descongelamento; (c) frutos sendo adicionados à despulpadora; (d) separação da casca e semente e da polpa; (e) polpa e (f) frascos para armazenamento da polpa.



4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MOSTO DE CAGAITA

4.3.1 pH e °Brix (Teor de sólidos solúveis)

Após homogeneização da polpa, foi retirada uma alíquota para aferição do pH através de pHmêtro (THERMO SCIENTIFIC ORION® 3 STAR) e o teor de sólidos solúveis (°Brix) foi quantificado em refratômetro digital (HANNA HI96801).

4.3.2 Chaptalização

Após a leitura do °Brix, aferido em refratômetro, o passo subsequente foi a chaptalização do mosto para correção do teor de sacarose segundo Dias et al., (2003, 2007). Foi adicionada solução de Sacarose P.A (DINÂMICA® - Diadema, São Paulo) diluída em um béquer de 1 L com auxílio de um bastão de vidro em água destilada estéril para reduzir a turbidez e ajustar a concentração de açúcar final em aproximadamente 20 °Brix.

4.3.3 Sulfitação

Para não perder as características desejáveis da polpa, que poderia ocorrer através de desnaturação provocada pelo aumento da temperatura, o mosto não passou por esterilização convencional em autoclave. A inibição do crescimento bacteriano, foi realizado pelo processo de sulfitação de acordo com DIAS et al., (2003), utilizando metabissulfito de potássio P.A. (NEON® 96,0% - Suzano, São Paulo), a partir de solução estoque com 200 g.L⁻¹. Uma alíquota de 1,5 mL da solução estoque foi acrescida em 1,5 L de mosto.

Ressaltando que, a concentração máxima permitida de SO₂ total em vinhos permitida por lei, é de 350 mg.L⁻¹ de acordo com a norma referente a 'complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do vinho' (BRASIL, 1988).

4.4 MICRORGANISMO

Foram utilizadas duas espécies, isoladas e puras de *Saccharomyces*. *S. cerevisiae* T73 e *S. kudriavzevii* CR-85 pertencente ao banco de cepas do LEB – UFG (Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Goiás) gentilmente cedidas pelo IATA - Instituto Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Valência, Espanha), e mantidas sob congelamento a 0°C a com solução glicerizada 15%.

4.4.1 Repique e Manutenção das Cepas

Para o repique das cepas, foi preparado meio Glicose-Peptona-Levedura conforme Quadro 01.

Quadro 1 – Composição do Meio GPY.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona (HIMEDIA®-RM001)	5
Extrato de Levedura (HIMEDIA®-RM027)	5
D-(+)-Glicose anidra P.A	20
Ágar Tipo 1 (HIMEDIA®-RM666)	20

Na preparação do meio de manutenção, foram pesados todos os componentes acima, e diluídos em 1,0 L de água destilada a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado o Agar para que se obtivesse sua integral diluição, com intuito de evitar a ebulição e conseqüentemente a não caramelização do meio.

O meio foi transferido para frascos *erlenmeyer* de 250 mL e fechados com algodão estéril para que o meio fosse esterilizado em autoclave (QUIMIS®, modelo Q190M23 50L, Diadema, São Paulo) por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm.

Em seguida, o meio foi colocado na capela de fluxo laminar (Capela de Segurança Biológica Classe II AI - QUIMIS®, modelo, 0216F22RA1, Diadema, São Paulo), limpa previamente com álcool 70% e luz ultravioleta por 15 min. O meio foi vertido em placas de Petri estéreis até que cobrisse o fundo das mesmas, permanecendo abertas até a solidificação do meio. Posteriormente foram fechadas e levadas a BOD (do inglês *Biochemical*

Oxygen Demand, TECNAL® modelo, T-371, Piracicaba, São Paulo) a 4°C por 24 h.

O repique das cepas foi realizado dentro de capela de fluxo laminar previamente esterilizada. As leveduras T-73 e CR-85 condicionados em banco de trabalho em meio sólido inclinado, foram repicadas com um auxílio de uma alça de platina e bico de Bunsen, e estriadas em placas de Petri contendo meio GPY sólido. Posteriormente as placas foram mantidas em estufa incubadora refrigerada tipo BOD à 30° C por 48 h.

4.5 MOSTO SINTÉTICO

Com intuito de evitar contaminação durante a adaptação e crescimento da biomassa, optou-se por preparar o inóculo em mosto sintético, previamente caracterizado pelo IATA.

Para o preparo do mosto sintético, utilizou os componentes descritos nos Quadros 2, 3, 4 e 5.

Primeiramente os macros nutrientes descritos no Quadro 2 foram pesados e diluídos em 1 L de água estéril em frasco de vidro. Logo após foi feita a esterilização em autoclave por 20 min a 121 °C e 1,1 atm.

A solução de aminoácidos, vitaminas e elementos traços descritos nos Quadros 3, 4 e 5 foram preparados com água destilada e esterilizada, em capela de fluxo, e a solução foi esterilizada com filtro de respiro estéril de 0,2 µm (Millex®, modelo SLFG025LS, Madri, Espanha).

Após o resfriamento da solução de macros nutrientes compostos pelos componentes do Quadro 02, foram acrescidas 36,8 mL da solução de aminoácidos, 1 mL da solução de vitaminas e 10 mL da solução de elementos traços. Foi feito o ajuste do pH com solução de NaOH para que o pH do mosto chegasse a 5,4.

Quadro 2 – Composição química do mosto sintético para os macros nutrientes.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
D-(+)-Glicose Anidra P.A (VETEC®)	10
D-Fructose P.A (VETEC®)	10

D(+)-Sacarose P.A (VETEC®)	210
DL-Ácido Málico P.A (VETEC®)	1,80
Ácido Cítrico P.A (VETEC®)	8,0
Fosfato de Potássio Monobásico P.A (NEON®)	0,75
Sulfato de Potássio P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,5
Sulfato de Magnésio Heptahidratado P.A (VETEC®)	0,25
Cloreto de Cálcio Dihidratado P.A (VETEC®)	0,155
Cloreto de Sódio P.A (VETEC®)	0,20

Quadro 3 – Composição química da solução de aminoácidos utilizada no preparo do mosto sintético.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
D-Biotina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,0000375
Cálcio-D-Pantotenato P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,00075
Ácido Nicotínico P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,00075
myo-Inositol P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,01875
Cloridrato de Tiamina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,00075
Cloridrato de Piridoxal P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,00075
Ácido p-Aminobenzóico P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,00015

Quadro 4 – Composição química da solução de vitaminas utilizada no preparo do mosto sintético.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Tirosina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,74
Isoleucina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	1,72
Ácido Aspartico P.A (SIGMA-ALDRICH®)	4,11
Ácido Glutâmico P.A (SIGMA-ALDRICH®)	4,40
Arginina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	1,79
Leucina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	3,36
L-Treonina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,16
Glicina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	3,18
Alanina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	2,93

Valina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	2,84
Metionina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,36
Fenilalanina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	1,73
Serina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	2,20
Histidina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	0,66
Lisina P.A (SIGMA-ALDRICH®)	1,18

Quadro 5 – Composição química da solução de elementos traços utilizados no preparo do caldo de cana de açúcar sintético.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
EDTA Sal Dissódico P.A (VETEC®)	0,005
Sulfato de Zinco Heptahidratado P.A (NEON®)	0,0015
Cloreto de Maganêns (II) P.A (NEON®)	0,00033
Cloreto de Cobalto Hexahidratado P.A (VETEC®)	0,0001
Sulfato de Cobre II P.A (NEON®)	0,000101
Molibdato de Sódio Dihidratado P.A (NEON®)	0,0001346
Cloreto de Cálcio Dihidratado P.A (VETEC®)	0,0015
Sulfato de Ferro II P.A (VETEC®)	0,001
Ácido bórico P.A (VETEC®)	0,00033
Iodeto de Potássio P.A (VETEC®)	3,36667E ⁻⁵

4.6 PREPARO DO INÓCULO

Após a manutenção e crescimento das colônias, as placas foram retiradas da BOD e levadas a capela de fluxo laminar, e com o auxílio de uma alça de platina foi feita raspagem superficial das colônias obtendo a maior quantidade possível de biomassa para o preparo do inoculo. Subsequente a raspagem, foram vertidos 50 mL do mosto sintético em dois fracos de vidro de volume de 100 mL, identificados com o código de cada cepa conforme Figura 8.

Figura 8 – Tubos de preparo do inóculo com CR-85 e T-73.



Em seguida, os frascos foram agitados em *shaker* (TECNAL® modelo, TE – 4200, Piracicaba, São Paulo) por 24 h a 150 rpm e 25 °C. Após a agitação, os tubos foram retirados e centrifugados em tubos de Falcon estéreis em centrífuga (FANEN, modelo, EXCELSA® II 206 BL, São Paulo, São Paulo) a 4000 rpm por 4 min, com função de separar a biomassa do sobrenadante, na qual toda matéria sólida (biomassa) se acumulou ao fundo do tubo conforme Figura 9.

Figura 9 – Tubos de Falcon com biomassa desmembrada do meio.



4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração celular foi realizada por espectrofotometria, através da leitura da absorbância do meio de cultura a 600 nm, utilizando espectrofotômetro (BIOSPECTRO®, modelo SP – 220 – UV, Curitiba, Paraná). Todas as amostras foram diluídas e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e colocadas em cubetas de vidro para leitura da absorbância. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado como branco para eliminar a interferência de coloração do meio de cultivo.

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis e duas variáveis, acrescido de 4 réplicas centrais, 2^2 ensaios mais 4 ensaios distribuídos ortogonalmente (pontos axiais) a uma distância α e $-\alpha$ do ponto central, totalizando 12 experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010) foi utilizado para estabelecer a concentração de cada levedura utilizadas na fermentação de concentração celular para T-73 e CR-85. As variáveis independentes foram *S. cerevisiae* T-73 (x_1) e *S. kudriavzevii* CR-85 (x_2) e as variáveis dependentes (respostas) os açúcares redutores totais, etanol e glicerol.

Os fatores do planejamento fatorial foram descodificados de acordo com a concentração celular (g.L^{-1}) através da equação obtida de curvas padrões das leveduras, previamente elaboradas descritos na Tabela 1. Para os experimentos cujo possuíam concentrações de ambas leveduras, uma média aritmética entre as curvas das leveduras isoladas foi calculada. As Equações referentes às curvas padrões são 2, 3 e 4.

$$Y = 0,248x \quad \text{Equação 2}$$

$$Y = 0,216x \quad \text{Equação 3}$$

$$Y = 0,232x \quad \text{Equação 4}$$

No qual, a Equação 2 é referente à cepa T-73, a Equação 3 à cepa CR-85 e a Equação 4 a média das duas. Sendo:

$$Y = \text{valor de concentração celular (g.L}^{-1}\text{)};$$

x = valor de absorbância a 600 nm lidas em espectrofotômetro.

O *software* Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, Tulsa, EUA) forneceu a matriz de experimentos do planejamento fatorial conforme Tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Fatores do planejamento experimental 2^2 completos composto central da fermentação alcoólica do mosto de Cagaita.

Fatores	Valor dos Níveis (-1; 1)	Ponto Central (0)	$\pm\alpha$
T-73 (X_1) (g.L⁻¹)	-1 (0,22) 1 (1,33)	0,78	+ α (1,56) - α (0)
CR-85 (X_2) (g.L⁻¹)	-1 (0,19) 1 (1,16)	0,68	+ α (1,36) - α (0)

Tabela 2 – Matriz do delineamento com valores das variáveis do planejamento experimental codificados e não codificados.

Nº do Ensaio	Níveis das variáveis independentes codificadas e descodificadas	
	T-73 (X_1) (g.L ⁻¹)	CR-85 (X_2) (g.L ⁻¹)
1	+1 (1,33)	-1(0,19)
2	-1(0,22)	-1(0,19)
3	+1(1,33)	+1(1,16)
4	-1(0,22)	+1(1,16)
5	- α (0)	0(0,68)
6	+ α (1,56)	0(0,68)
7	0(0,78)	- α (0)
8	0(0,78)	+ α (1,36)
9	0(0,78)	0(0,68)
10	0(0,78)	0(0,68)
11	0(0,78)	0(0,68)
12	0(0,78)	0(0,68)

Após a realização do DCCR, constatou-se que o modelo obtido não foi significativo por apresentar resultados não satisfatório (será apresentado no item resultados), da qual a cepa *S. kudriavzevii* CR-85 com 100 % de concentração celular não gerou produtos como etanol e glicerol. Com isto, optou-se em realizar um planejamento fatorial comum 2^2 com 4 pontos centrais conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Matriz experimental com os níveis codificados e decodificados das variáveis dependentes T-73 e CR-85

Nº do Ensaio	Níveis das variáveis independentes codificadas e decodificadas	
	T-73 (g.L ⁻¹)	CR-85 (g.L ⁻¹)
1	+1 (1,33)	-1(0,19)
2	-1(0,22)	-1(0,19)
3	+1(1,33)	+1(1,16)
4	-1(0,22)	+1(1,16)
5	0(0,78)	0(0,68)
6	0(0,78)	0(0,68)
7	0(0,78)	0(0,68)
8	0(0,78)	0(0,68)

Todas as análises foram realizadas a um nível de significância de 10%, com intervalo de confiança de 90%, utilizando o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, Tulsa, EUA).

O tempo ideal de fermentação foi de 168 h por se tratar de um momento onde as leveduras já haviam consumido totalmente os açúcares (sacarose, glicose e frutose) e convertidos em produtos.

4.9 VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS DE CONCENTRAÇÃO CELULAR PARA FERMENTAÇÃO

Executou-se três experimentos, em triplicata, a fim de comprovar a validade dos modelos. Na Tabela 4 são apresentadas Matriz do Delineamento com Valores das Variáveis da Validação Codificados e Não Codificados.

Tabela 4 – Proporção de *S. cerevisiae* (x1) e *S. kudriavzevii* (x2) codificado e descodificado.

Experimento	Codificado		Descodificado	
	T-73	CR-85	T-73 (g.L ⁻¹)	CR-85 (g.L ⁻¹)
V ₁	-1	-0,8	0,22	0,29
V ₂	-0,4	0,4	0,56	0,87
V ₃	0,8	0,6	1,22	0,96

4.10 FERMENTAÇÃO

As fermentações foram elaboradas em frascos de vidro de 100 mL com volume útil de mosto de Cagaita de 50 mL. A concentração de inóculo utilizada em cada experimento foi determinada pelo planejamento conforme Tabela 2 e 3.

Em todos experimentos, a fermentação foi conduzida a 25 °C, pH 4,3 em um *shaker* (TECNAL® modelo, TE – 4200, Piracicaba, São Paulo) sob agitação de 150 rpm durante 168 h. A cada intervalo de 24 horas, nos tempos 0, 24, 48, 72, 120 e 168 h, a fermentação foi interrompida e sob condições estéreis com auxílio de uma micropipeta de volume 100 – 1000 µL (SCILOGEX, modelo X00155LPBD, Rocky Hill, Connecticut, EUA) foram retiradas uma alíquota de 1 mL de cada amostra, transferidas para *ependorfs* de 1,5 mL. No termino de cada coleta, os frascos foram fechados e retornados ao *shaker*.

Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas em vórtex onde seguinte passo coletava-se 0,5 µL de cada amostra diluídas em 1 mL de água destilada e levadas a espectrofotômetro a 600 nm para realização da leitura da absorbância das mesmas.

4.11 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (SACAROSE, GLICOSE E FRUTOSE), ETANOL, GLICEROL E ÁCIDO ACÉTICO.

Para realização das análises cromatográficas, contamos com o apoio do Laboratório de Bioquímica da Escola de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As amostras foram estocadas em tubos de *ependorf* de 2 mL em refrigerador a temperatura de 10 °C. Primeiramente, as amostras foram retiradas do refrigerador e colocadas sob

a bancada até atingirem temperatura ambiente. Depois da temperatura já estabilizada, com auxílio de uma micropipeta 100 µL das amostras, as amostras referente aos tempos 0, 24 e 48 h foram diluídas 100 vezes (1:100) com solução de fase móvel (H_3PO_4 – 0,1%), enquanto que as amostras referente aos demais tempos, 72, 120 e 168 h foram retiradas 200 µL e diluídas 50 vezes (1:50) com solução de fase móvel ácido fosfórico (H_3PO_4 – 0,1%) e filtradas individualmente com seringas de 1 mL acopladas a filtros de nylon de 0,45 µm, marca SYMTA (Madrid, Espanha). Foram utilizados 1 mL da amostra para a corrida cromatográfica, injetadas manualmente em uma coluna HPLC da marca SHIMADZU (Shimadzu Corp., Japão) modelo LC-20^a *Prominence*, equipada com detectores de índice de refração modelo RID – 10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai acoplada a uma coluna SUPELCOGEL modelo C-610H utilizando como fase móvel ácido fosfórico H_3PO_4 – 0,1 %, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 32 °C e com volume de injeção de 20 µL.

Após cada corrida referente a cada amostra, a quantificação foi realizada a partir das curvas de calibração realizadas previamente.

4.12 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

As amostras de vinho foram analisadas segundo a metodologia de Costa (2018) (pendente de publicação) em cromatografia a gás *Agilent* 7890B-GC acoplado a um espectrômetro de massa *Agilent* 7000D-MSMS no qual a ionização da amostra foi realizada por impacto de elétrons. O volume de injeção foi de 2,5 mL e a razão de divisão foi de 1:50. As temperaturas do injetor, linha de transferência e fonte de íons foram definidas em 300, 280 e 280 °C, respectivamente. O forno foi ajustado para o seguinte programa de temperatura: isotérmico a 100 °C por 1 min, aquecimento a 10 °C min⁻¹ até 200 °C, isotérmico a 200 °C por 2 min, aquecimento a 3,5 °C min⁻¹ até 260 °C, e isotérmico a 260 °C até atingir um tempo total de execução de 50 min. Os espectros de massa foram adquiridos a cada 0,5 s na faixa de massa de 17-380 m/z. Os componentes foram identificados por comparação de seus tempos de retenção com padrões analíticos (mistura FAME C4-C24, Supelco®) ou por interpretação de seus espectros de massa, cujo índice de

similaridade foi investigado usando o banco de dados espectral NIST (National Institute of Standards and Technology).

4.13 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO

4.13.1 Velocidades específicas de transformação (h^{-1})

Com objetivo de calcular as velocidades específicas de crescimento celular ($\mu_{xmáx}$) foram levadas em consideração as concentrações celulares atingidas durante todo o tempo de fermentação. No que se refere as velocidades específicas de formação de produto ($\mu_{Pmáx}$), considerou-se as concentrações de etanol.

Para calcular os valores de ($\mu_{Pmáx}$) e ($\mu_{xmáx}$), utilizou o intervalo de tempo (t) da maior inclinação da reta tangente à curva de crescimento celular e também a média da biomassa (X) nesse intervalo representado nas Equações 5 e 6 adaptadas de SCHMIDELL et al., (2001).

$$\mu_{xmáx} = \frac{1}{\left(\frac{x_1+x_2}{2}\right)} \times \left(\frac{x_2-x_1}{t_2-t_1}\right) \quad \text{Equação 5}$$

$$\mu_{Pmáx} = \frac{1}{\frac{x_1+x_2}{2}} \times \frac{P_2-P_1}{t_2-t_1} \quad \text{Equação 6}$$

Na qual:

X_1 = concentração celular no início do intervalo analisado ($g.L^{-1}$);

X_2 = concentração celular no final do intervalo analisado ($g.L^{-1}$);

P_1 = concentração de etanol no início do intervalo analisado ($g.L^{-1}$);

P_2 = concentração de etanol no final do intervalo analisado ($g.L^{-1}$);

t_1 = instante inicial do intervalo analisado (h);

t_2 = instante final do intervalo analisado (h).

4.13.2 Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$)

Para o cálculo do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), foi expresso pela diferença entre as concentrações iniciais de biomassa e substrato pelas concentrações finais de ambos, de acordo com a Equação 9 adaptada de SCHMIDELL et al., (2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 9}$$

Na qual:

X_0 = concentração celular inicial (g.L^{-1});

X_f = concentração celular final (g.L^{-1});

S_0 = concentração inicial do substrato (g.L^{-1});

S_f = concentração residual do substrato (g.L^{-1}).

4.13.3 Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{X/P}$)

O fator de conversão de substrato em produto, o etanol, foi calculado por a diferença entre as concentrações iniciais de produto e substrato pelas concentrações finais, conforme Equação 10 adaptada de SCHMIDELL et al., (2001).

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação 10}$$

Na qual:

P_f = Concentração final de etanol (g.L^{-1});

P_0 = Concentração inicial de etanol (g.L^{-1});

S_f = Concentração de açúcar final (g.L^{-1});

S_0 = Concentração inicial de açúcar (g.L^{-1}).

4.13.4 Cálculo da Produtividade dos Produtos (g.L⁻¹.h⁻¹)

A produtividade de etanol foi calculada a partir das concentrações iniciais e finais dos mesmos dividido pelo tempo total do processo fermentativo conforme Equação 11 adaptada de SCHMIDELL et al., (2001).

$$Produtividade = \frac{P_f - P_i}{t_f} \quad \text{Equação 11}$$

Na qual:

P_i = Concentração de etanol inicial (g.L⁻¹);

P_f = Concentração de etanol final (g.L⁻¹);

t_f = Tempo total de fermentação (h);

P = Produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹).

4.13.5 Rendimento (%)

O rendimento da fermentação foi calculada a partir do rendimento teórico de *Gay-Lussac* (1815) e rendimento prático obtido.

O rendimento prático foi determinado pela massa de etanol obtida no final da fermentação, dividida pela quantidade de açúcares redutores totais (ART) inicial (Equação 12).

$$\text{Rendimento prático (Yp)} = \frac{\text{g de etanol obtidos no vinho}}{\text{g de ART}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Quanto ao rendimento teórico, este foi determinado baseado na estequiometria de *Gay-Lussac* (1815) em que para cada 100 g de sacarose 53,73 g de etanol é formado.

$$\text{Rendimento teórico (Yt)} = \frac{53,73 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 = 53,73\%$$

Dessa forma a eficiência fermentativa foi calculada pela Equação 13:

$$\eta_{P(\%)} = \frac{\text{Rendimento prático}}{\text{Rendimento teórico}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

A unidade de medida de etanol %_(V/V) representa o volume de etanol em mL para 100 mL de solução. Como o rendimento é calculado pela massa de etanol, admitiu-se que a densidade do etanol a 20 °C foi de 0,789 g.mL⁻¹, multiplicou-se o volume correspondente ao %_(V/V) pela densidade e foi encontrada a quantidade de massa de etanol em 100 mL de mosto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO DE CAGAITA

A polpa após o processo de extração do mosto de Cagaita o °Brix atingiu o valor de 9,5 e pH inicial de 3,37, caracterizando uma poupa ácida. Esse valor foi semelhante ao encontrado no trabalho de Oliveira (2010), pH 3,21 e 8,3 °Brix. Para a correção, o mosto passou por processo de chaptalização, ajuste do °Brix, com adição de sacarose até atingir aproximação 20 °Brix.

5.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL CENTRAL ROTACIONAL

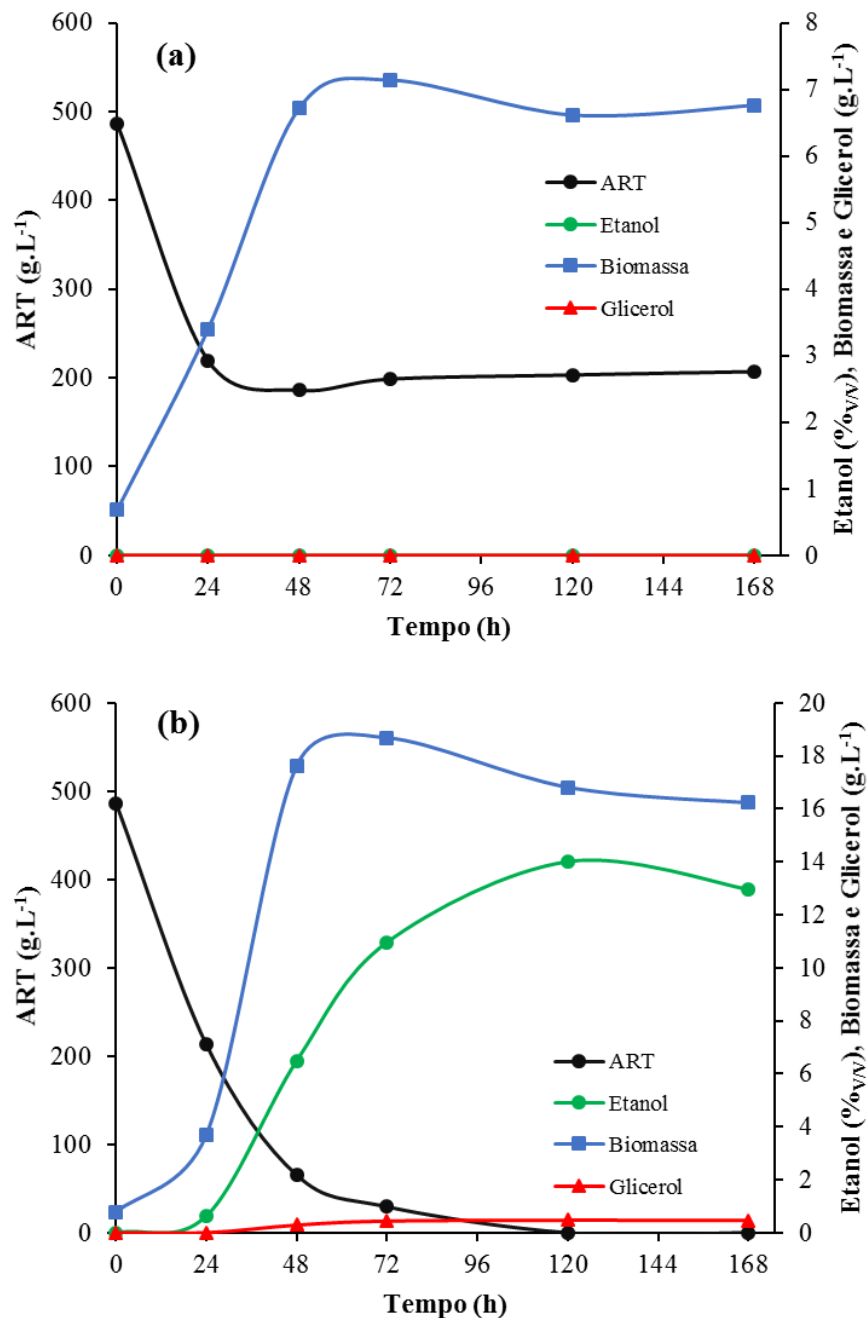
De acordo com o objetivo do trabalho, uma bebida alcoólica fermentada do fruto da Cagaita foi desenvolvida utilizando co-culturas de estirpe diferentes de *Saccharomyces*, T-75 e CR-85.

Inicialmente realizou-se um estudo preliminar por meio do Planejamento Experimental Central Rotacional (DCCR) em co-culturas de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*, com intuito de entender a cinética de crescimento, o consumo de substrato e a síntese de produtos.

Com propósito de dinamizar as discussões sobre os 12 ensaios do DCCR, eles foram agrupados e avaliados em 3 grupos distintos. A primeira avaliação foi feita nos ensaios 5 e 7, dos quais foram utilizadas culturas puras. Na segunda parte, realizou-se avaliação dos experimentos 9, 10, 11 e 12, com proporções iguais ou aproximadas das duas espécies de leveduras. Os demais ensaios foram agrupados em um terceiro grupo.

Na Figura 10 são ilustradas as curvas de concentração celular, produção de etanol e glicerol, e consumo de Açúcares Redutores Totais (ART) obtidos com base nos cultivos puros (CR-85 e T-73). A partir destes resultados foram feitas as comparações em relação ao comportamento cinético e fisiológico dos demais experimentos.

Figura 10 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares nos ensaios 5 ao 7 com as leveduras CR-85 e T-73, durante 168 h, (a) CR-85 e (b) T-73.



Com relação à concentração celular, os dois ensaios apresentaram comportamento semelhante, evidenciando as etapas que normalmente são esperadas para uma curva de crescimento microbiano padrão. Um aspecto relevante, no qual as duas cepas divergiram durante o processo fermentativo foi a existência da fase *lag*, a cepa T-73 apresentou um pequeno tempo de

adaptação nas primeiras horas da fermentação, o que não foi notado para a cepa CR-85 que, logo após a inoculação no mosto já iniciou a multiplicação exponencial. Para Tronchoni e colaboradores (2012) a fase *lag* representa um aspecto tecnológico importante na produção de vinhos, pois determina a adaptação das células de levedura após a sua inoculação no mosto.

A fase exponencial de crescimento foi observada nas primeiras 48 h, com velocidade específica de crescimento máxima e constante de $0,056 \text{ h}^{-1}$ e $0,054 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 5), para as cepas CR-85 (Figura 10a) e T-73 (Figura 10b), respectivamente, essa semelhança está aliada principalmente as características do gênero de leveduras e não apenas com as condições ambientais, como constatado pela a concentração máxima de biomassa, para ambos os ensaios, foi atingida no tempo de 72 h, sendo de $7,14 \text{ g.L}^{-1}$ para o ensaio 5 (CR-85) e de $18,69 \text{ g.L}^{-1}$ o ensaio 7 (T-73), evidenciando que as leveduras crescem na mesma velocidade, no entanto, a cepa T-73 conseguiu se adaptar melhor as condições ambientais e assim aumentar o número de indivíduos muito mais do que a cepa CR-85. Após as 48 h houve uma desaceleração do crescimento e, por fim, no tempo de 72 a 168 horas observou-se a fase estacionária.

O fator de conversão de substrato em células, $Y_{X/S}$, retrata bem quanto o microrganismos direciona o substrato para a produção de biomassa, o com maior produção de biomassa o ensaio 7 foi também o maior na conversão de substrato em células (ensaio 7: $0,032 \text{ g}_{\text{Biomassa}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$), quando comparado com o ensaio 5: $0,022 \text{ g}_{\text{Biomassa}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$ (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros Cinéticos dos 12 ensaios Durante 168 Horas.

Variáveis da fermentação	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Média dos Ensaios 9, 10, 11 e 12
Biomassa													
Maior produção (g.L ⁻¹)	16,88	17,12	16,94	16,80	7,14	18,90	18,69	18,94	18,90	17,75	17,86	17,54	18,01
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,053	0,056	0,060	0,048	0,056	0,061	0,054	0,043	0,048	0,046	0,047	0,047	0,047
$Y_{X/S}$ (g _{Biomassa} .g _{Substrato} ⁻¹)	0,030	0,030	0,029	0,031	0,022	0,031	0,032	0,029	0,030	0,030	0,032	0,030	0,030
Etanol													
Maior produção (%v/v)	13,90	13,70	12,93	13,15	0,00	13,49	14,01	13,47	13,18	13,75	13,28	13,21	13,35
$\mu_{P\text{máx}}$ (g _{Etanol} .g _{Biomassa} ⁻¹ . h ⁻¹)	0,057	0,031	0,101	0,033	0,000	0,101	0,032	0,036	0,036	0,041	0,034	0,039	0,037
$Y_{P/S}$ (g _{Etanol} .g _{Substrato} ⁻¹)	0,202	0,222	0,198	0,215	0,000	0,214	0,210	0,201	0,214	0,212	0,210	0,210	0,212
Produtividade (g _{Etanol} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,585	0,643	0,574	0,618	0,000	0,619	0,609	0,582	0,619	0,614	0,603	0,609	0,612
Rendimento (%)	41,70	41,08	38,79	39,44	0,00	40,45	42,03	40,41	39,53	41,23	39,82	39,62	40,05
ART													
Final (%)	0,00	0,00	0,00	0,60	42,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92	0,00	0,23
Glicerol													
Maior produção (g.L ⁻¹)	0,36	0,43	0,41	0,49	0,00	0,51	0,47	0,43	0,48	0,45	0,50	0,43	0,46

A respeito do etanol, a Figura 10 mostra que no ensaio 7, a cepa T-73, foi a maior produtora de etanol entre todos os ensaios do DCCR, produzindo 14,01 %_{V/V} de etanol em 72 h, com velocidade específica de produção de etanol de 0,032 g_{Etanol}.g_{Biomassa}⁻¹.h⁻¹, produtividade 0,609 g_{Etanol}.L⁻¹.h⁻¹ e eficiência fermentativa de 42,03% (Tabela 5), em contra partida, consumiu totalmente o ART e produziu 0,47 g.L⁻¹ de glicerol, enquanto que, no ensaio 5, a CR-85 não produziu etanol e glicerol e o ART foi parcialmente consumido, evidenciando que o substrato foi utilizado, principalmente, para a produção de biomassa, visto que é uma alternativa encontrada pelos microrganismos quando estão em ambiente hostil promovido por algum composto inibidor. Este comportamento foi muito diferente dos observados nos processos fermentativos, o que sugere estudos mais aprofundados para identificar as causas dos bloqueios de rotas metabólicas desta espécie em relação a aplicação de leveduras da espécie *S. kudriavzevii* (CR-85) em mosto de Cagaita.

Analisando os dados obtidos a partir dos ensaios com as culturas puras é possível perceber que a levedura *S. cerevisiae* (T-73) alcançou um melhor desempenho, quando comparada com a levedura *S. kudriavzevii* (CR-85), obtendo resultados mais expressivos para todos os parâmetros avaliados (Tabela 5). De acordo com Guerra e Barnabé (2005) os principais fatores que afetam a fermentação alcoólica são os açúcares, álcool, compostos nitrogenados, oxigênio, dióxido de carbono e temperatura (HENRIQUE et. al., 2018; FLEET e HEARD, 1993). Portanto, no presente estudo, a fisiologia da levedura *S. kudriavzevii*, pode também ter contribuído para a inibição da produção de etanol, visto que a estirpe tem melhores resultados em fermentações realizadas em baixas temperaturas (ALONSO-DEL-REAL; LAIRO´N-PERIS, et al., 2017; GONZÁLEZ; QUIRÓS; MORALES, 2013).

Em estudos que avaliaram a competência fermentativa entre *S. cerevisiae* e *S. uvarum* e também entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* utilizando mosto sintético de uva (ARROYO-LÓPEZ et al., 2011), foi verificado que a *S. cerevisiae* se sobressaía a *S. kudriavzevii* em fermentações a 17, 24 e 31 °C, levando a um maior imposição na

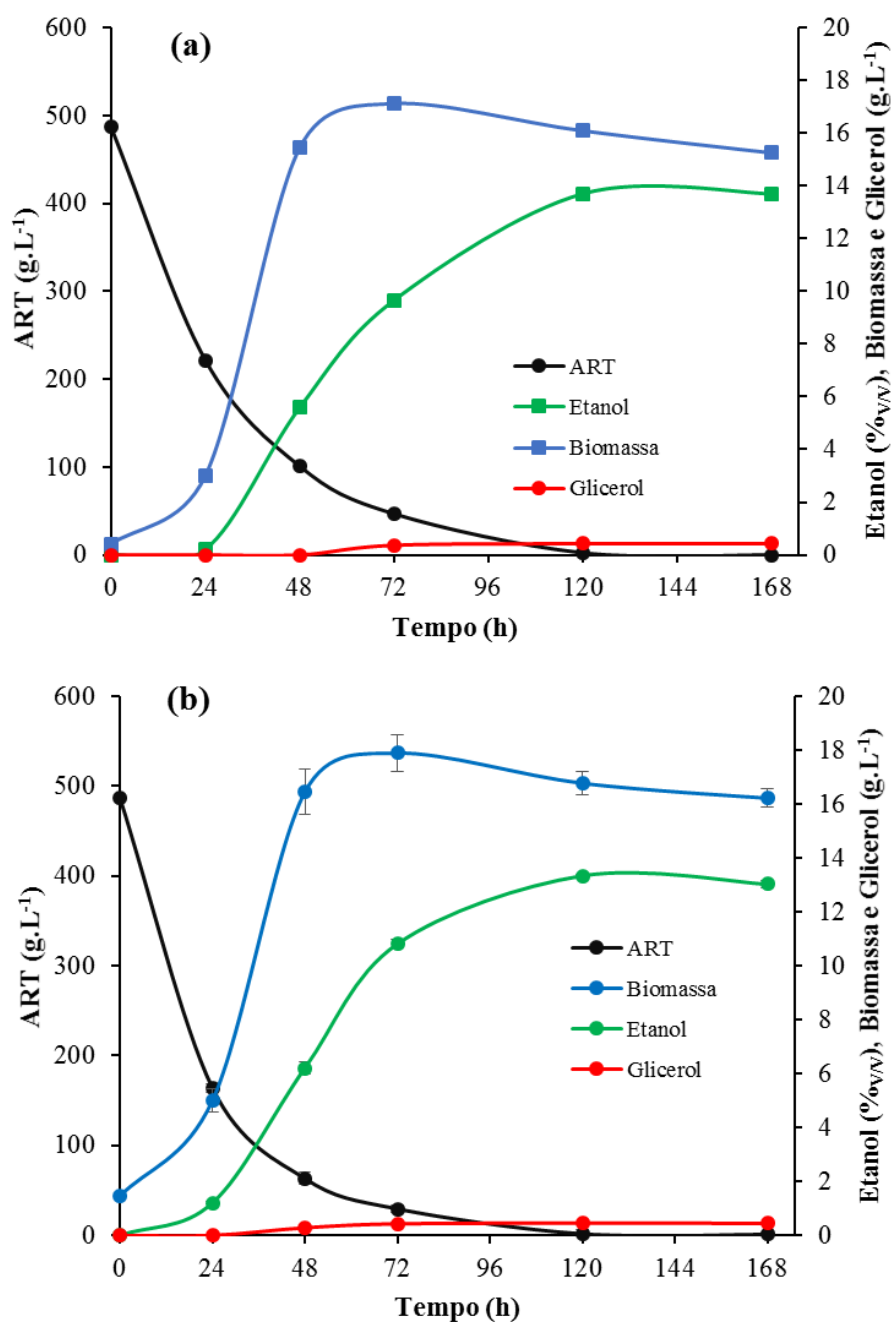
temperatura mais elevada, já a espécie de *S. kudriavzevii* se impõe a *S. cerevisiae* em fermentações realizadas à 8 °C, tendo em vista que a cepa de *S. cerevisiae* não é capaz de crescer adequadamente a temperaturas tão baixas (ALONSO DEL REAL et al., 2017).

Quando se trata do consumo de açúcares, a temperatura também parece ter um papel decisivo para *S. kudriavzevii*, Trochoni et al., (2012), avaliaram o desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* em diferentes temperaturas constatou que em 28 °C a levedura *S. kudriavzevii* levou o dobro do tempo necessário para consumir o mesmo percentual de açúcares que *S. cerevisiae*. Demonstrando desta forma que a cepa *S. kudriavzevii* é dependente da temperatura para o bom desempenho fermentativo do consumo de substrato.

Em estudos realizados com mosto de uva e mosto de uva sintético, González e colaboradores (2006) descreveram que outras espécies do gênero *Saccharomyces*, como *S. uvarum* ou *S. kudriavzevii*, ou seus híbridos naturais apresentaram propriedades fisiológicas interessantes, tais como o adaptação a fermentações em baixas temperaturas, com menor produção de etanol, aumento na produção de glicerol sem aumento nos níveis de produção de ácido acético. Portanto, com este trabalho, reforça-se a ideia da dependência da cepa CR-85 à temperatura baixa para produção de etanol, tendo em vista que a fermentação aconteceu a temperatura superior à 12 °C (25 °C), quanto a possível inibição de crescimento por algum componente contido no mosto de Cagaita.

Na Figura 11 são ilustrados os comportamentos cinéticos dos cultivos mistos, utilizando proporções iguais e aproximadas das cepas CR-85 e T-73.

Figura 11 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares dos Ensaios 2, 9, 10, 11 e 12 com o co-culturas de leveduras CR-85 e T-73 durante 168 h, (a) Ensaio 2 e (b) Média dos Ensaios 9, 10, 11 e 12.



A diferença entre os experimentos da Figura 11 foi dada pela quantidade de células presente no início da fermentação. A Figura 11a representa um cultivo com ambas leveduras, CR-85 e T-73 (ensaio 2), iniciadas com 0,19 g.L⁻¹ e 0,22 g.L⁻¹ de inóculo, respectivamente. Enquanto a Figura 11b, as quantidades de leveduras foram de 0,78 g.L⁻¹ (T-73) e 0,68 g.L⁻¹ (CR-85) (ensaio 9, 10, 11 e 12) (Tabela 2). No entanto, as proporções das leveduras são equivalentes, variando apenas a quantidade inicial de número de células. Apesar dessa diferença de número inicial de células

entre os experimentos, os parâmetros fermentativos são semelhantes. A principal diferença entre os parâmetros fermentativos pôde ser notada na concentração celular, como era de se esperar, o cultivo iniciado com maior número de células atingiu o maior pico de biomassa, no entanto, o ensaio iniciado com menor quantidade de levedura atingiu maior velocidade específica de crescimento $0,056 \text{ h}^{-1}$. Com relação ao fator de conversão substrato em biomassa ambos os experimentos atingiu o mesmo valor de $0,030 \text{ g}_{\text{Biomassa}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$, portanto, a proporção equivalentes da cepas, mesmo que as quantidade total de inóculo sejam diferentes, direciona da mesma forma o substrato para a produção de biomassa.

A Figura 11 mostra ainda a curva da produção de etanol durante a fermentação de 168 h. O Ensaio 2 (Figura 11a) produziu $13,70 \text{ \%v/v}$ de etanol em 168 h, com velocidade específica de produção de etanol de $0,031 \text{ g}_{\text{Etanol}}.\text{g}_{\text{Biomassa}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, fator de conversão substrato em produto $0,222 \text{ g}_{\text{Biomassa}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$, produtividade $0,643 \text{ g}_{\text{Etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e eficiência fermentativa de $41,08\%$ (Tabela 5). Enquanto que nos ensaios 9, 10, 11 e 12 produziram em 72 h $13,35 \text{ \%v/v}$ com velocidade específica de produção de etanol de $0,037 \text{ g}_{\text{Etanol}}.\text{g}_{\text{Biomassa}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, fator de conversão substrato em produto $0,212 \text{ g}_{\text{Etanol}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$, produtividade $0,612 \text{ g}_{\text{Etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e eficiência fermentativa de $40,05\%$. Apesar dos ensaios 9, 10, 11 e 12 possuírem maior quantidade de biomassa não foram os ensaios que consumiram totalmente o substrato, assim como não foram os ensaios que produziram mais etanol. Desta forma o ensaio iniciado com quantidade de inóculo menor metabolizou totalmente o açúcares e ainda foi o maior produtor de etanol. Quanto ao glicerol, os ensaios 9, 10, 11 e 12, produziu mais biomassa bem como mais glicerol, já o ensaio 2 que produziu maior concentração de etanol sintetizou menor quantidade de biomassa e glicerol.

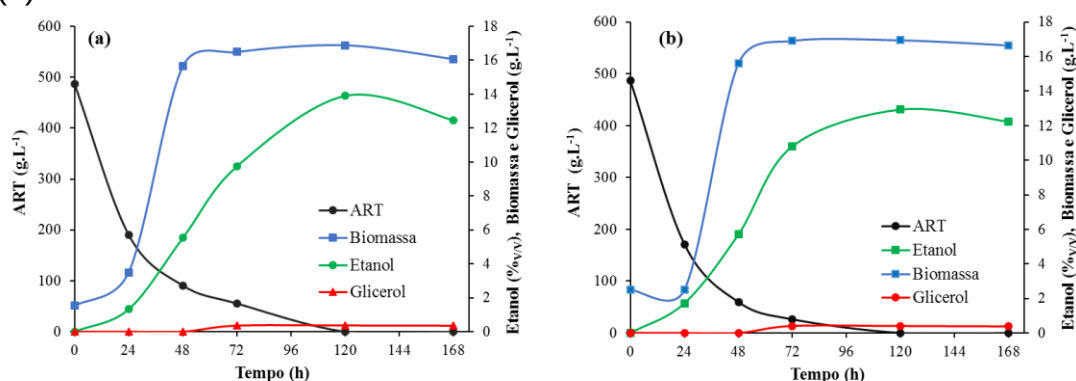
Em fermentações que utilizaram co-cultura a metabolização do substrato, ocorre pela ação metabólica combinada, ou não, das estirpes microbianas (SANTOS et al., 2017). Comparando o ensaio 1, com 6 vezes mais a levedura T-73 e quantidade igual de CR-85, com o ensaio 2, observa-se que a cepa T-73 tem maior papel durante a fermentação para a produção de etanol, visto que nesse cultivo atingiu maior concentração de etanol e

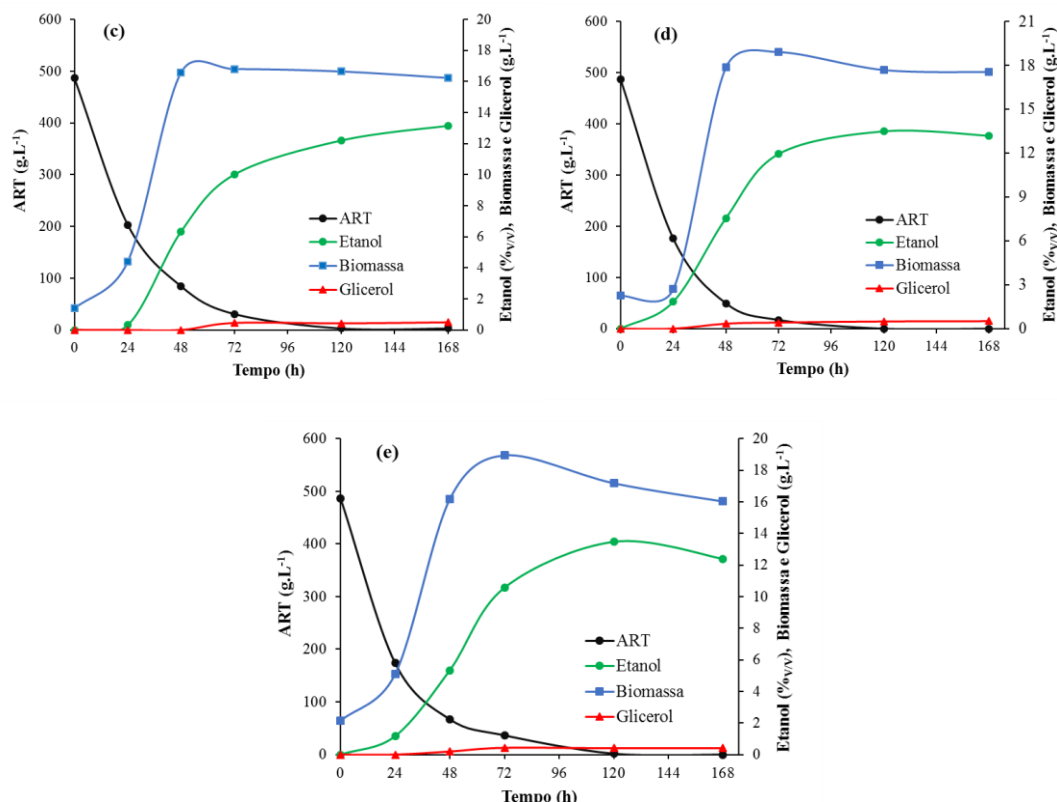
menor quantidade de glicerol. De acordo com Alonso-del-Real e colaboradores (2017), *S. cerevisiae* é competitiva e pode predominar em relação a outras espécies de leveduras utilizadas para a fermentação de vinhos.

Em outro estudo utilizando as cepas T-73 e CR-85 para geração de modelos preditivos, Henriques et al. (2018) avaliaram as diferenças de comportamento existente entre as espécies. Os autores destacaram que essas duas cepas atuam de maneira complementar e podem ter um grande potencial na indústria vinícola quando utilizadas em co-culturas, porém, para que isso ocorra é necessário que se estabeleça um modelo no qual se observe a faixa de temperatura e a inoculação iniciação, tendo em vista que o rendimento e o conteúdo do produto final são bastante sensíveis a estas duas variáveis.

Na Figura 12 são ilustrados os comportamentos cinéticos dos cultivos mistos agrupados no último grupo para discussão.

Figura 12 – Resultados de concentração celular, etanol, glicerol e consumo de açúcares nos Ensaios 1, 3, 4, 6 e 8 em co-culturas de leveduras CR-85 e T-73 durante 168 h. (a) Ensaio 1, (b) Ensaio 3, (c) Ensaio 4, (d) Ensaio 6 e (e) Ensaios 8.





As diferenças observadas entre os experimentos da Figura 12 ocorreram em virtude da quantidade de células presente no início da fermentação e do tipo de cepa utilizada. De acordo com os parâmetros fermentativos descritos na Tabela 5, nota-se que a fermentação em co-culturas em que a proporção da levedura CR-85 foi 2,6 vezes maior que a da cepa T-73 (ensaio 8), a concentração celular máxima foi atingida (18,94 g.L⁻¹) em 72 horas e foi a maior entre os ensaios analisados. Quando a co-cultura das leveduras apresentaram, 1,5 a mais de T-73 (ensaio 6) a quantidade de biomassa foi bem próxima da encontrada ao ensaio 8, com maior produção de biomassa. Quanto aos parâmetros fermentativos, o ensaio 6, com segundo maior pico de biomassa obteve também a maior velocidade específica de crescimento (0,061 h⁻¹) e fator de conversão substrato em biomassa de 0,031 g_{Biomassa}.g_{Substrato}⁻¹. No cultivo com 7,7 vezes mais de CR-85 (ensaio 4) observou-se a menor produção de biomassa, Henriques et al. (2018) apontam que as fermentações conduzidas por *S. kudriavzevii*, são tipicamente mais lentas, necessitando a espécie de tempos maiores para atingir uma boa produção de biomassa.

A Figura 12 ainda mostra a curva da produção de etanol durante a fermentação de 168 h. O ensaio 1, com T-73 4,4 vezes maior, em número de células, que a da cepa CR-85, produziu 13,9 %_{v/v} de etanol em 120 h, com velocidade específica de produção de etanol de 0,057 g_{Etanol}.g_{Biomassa}⁻¹.h⁻¹, fator de conversão substrato em produto 0,202 g_{Etanol}.g_{Substrato}⁻¹, produtividade 0,585 g_{Etanol}.L⁻¹.h⁻¹ e eficiência fermentativa de 41,70% (Tabela 5), destacado como o ensaio com maior eficiência fermentativa para o etanol, seguido pelo ensaio 8, com CR-85 2,6 vezes maior que a da cepa T-73, que também atingiu a segunda maior produção de biomassa. Enquanto que o ensaio 3, com CR-85 1,3 vezes maior que a da cepa T-73, produziu em 120 h 12,93 %_{v/v} com velocidade específica de produção de etanol de 0,101 g_{Etanol}.g_{Biomassa}⁻¹.h⁻¹, fator de conversão substrato em produto 0,198 g_{Etanol}.g_{Substrato}⁻¹, produtividade 0,574 g_{Etanol}.L⁻¹.h⁻¹ e eficiência fermentativa de 38,79%, caracterizado como o ensaio com a menor produção de etanol.

Quanto o consumo de açúcares, a Figura 12 mostra que as leveduras consumiram totalmente o substrato em 120 h, menos o ensaio 4. Também pôde ser observado que ao longo da fermentação verificou-se um aumento na concentração de glicerol para todos os ensaios, entretanto, esse aumento não foi superior a 0,51 g.L⁻¹.

De modo geral, o ensaio 1 com 7 vezes mais quantidade da cepa T-73 do que CR-85 obteve maior quantidade de etanol e menor quantidade de glicerol quando comparado com o cultivo que possuía 5,3 vezes mais CR-85 (ensaio 4), na qual apresentou menor teor alcoólico com maior quantidade de glicerol. Este fato pode estar ligado a maior competitividade da espécie *S. cerevisiae* (ALONSO DEL REAL et al., 2017). Esses mecanismos na maioria das vezes não são mutuamente exclusivos, mas complementares. Este fato foi evidenciado nas fermentações conduzidas por Henriques et al. (2018) que verificaram que a taxa de crescimento específica e o transporte de hexoses nos tempos iniciais foram maiores para *S. cerevisiae*, enquanto *S. kudriavzevii* desvia mais fluxo para produção de glicerol e manutenção celular.

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL 2² PARA A FERMENTAÇÃO.

De acordo com o planejamento fatorial completo do tipo composto central, conforme descrito na metodologia, foram realizadas as fermentações e quantificados a concentração de etanol, biomassa e glicerol (g.L⁻¹). A Tabela 5 mostra as variáveis independentes, concentração de inóculos das cepas T-73 e CR-85 codificadas e decodificadas (g.L⁻¹), e as variáveis dependente, concentrações de etanol (g.L⁻¹) no tempo de 168 h. A escolha do tempo de 168 h foi reflexo do momento na fermentação onde os açúcares já tinham sido totalmente consumidos como sugere Fleet (1997) em processos de obtenção de fermentados de frutas.

Tabela 6 – Matriz do delineamento experimental com valores codificados e decodificados para variáveis dependentes T-73 e CR-85 em g.L⁻¹ e concentração de Etanol em g.L⁻¹ após fermentação no tempo de 168 h.

Experimentos	T-73 (g.L ⁻¹)	CR-85 (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
1	1(1,33)	-1(0,19)	98,29
2	-1(0,22)	-1(0,19)	108,08
3	1(1,33)	1(1,16)	96,49
4	-1(0,22)	1(1,16)	103,76
5	-1,4142(0)	0(0,68)	0
6	+1,4142(1,56)	0(0,68)	104,03
7	0(0,78)	-1,4142(0)	102,31
8	0(0,78)	+1,4142(1,36)	97,78
9	0(0,78)	0(0,68)	103,97
10	0(0,78)	0(0,68)	103,20
11	0(0,78)	0(0,68)	101,38
12	0(0,78)	0(0,68)	102,39

A maior resposta de produção de etanol foi obtida no Ensaio 2, na qual ambas variáveis independentes possuíam o mesmo nível (-1) com concentrações de biomassa equivalentes a (0,22 g.L⁻¹) para T-73 e (0,19 g.L⁻¹) para CR-85 em co-culturas.

Foram observados que nos quatro experimentos iniciados com números de células da estirpe T-73 superior às de CR-85 (Ensaio 2, 6, 7, 9, 10, 11 e 12), apresentaram maior produção de etanol comparado aos ensaios em que a concentração de CR-85 foram maiores do que a

quantidade de biomassa inicial de T-73. A levedura *S. cerevisiae*, assim como a cepa T-73, é geralmente o principal microrganismo responsável pelo processo de fabricação de vinhos, possuindo vigorosa capacidade fermentativa mesmo na presença de oxigênio, tornando-a uma levedura de grande eficiência na produção de etanol, estratégia que permite sua imposição sob o restante dos microrganismos durante a fermentação devido a toxicidade deste composto (PIŠKUR et al., 2006; THOMSON et al., 2005; PIŠKUR; LANGKJAER, 2004; PRETORIUS, 2000). O presente trabalho mostra a utilização de co-culturas com mosto de Cagaita, no entanto, não foi possível atingir explicações profundas visto que não há outras pesquisas por se tratar de algo nunca estudado antes com essa fruta do cerrado. Contudo, possuem outros estudos prévios que avaliaram a competência entre *S. cerevisiae* (T-73) e *S. kudriavzevii* (CR-85) em mosto de uva sintético, no qual pôde-se certificar o quanto a cepa T-73 sobressaia rapidamente à cepa CR-85 (ALONSO DEL REAL et al., 2017), assim como foi observado nesta pesquisa.

Nos experimentos com cultura pura de CR-85 (Ensaio 5) e T-73 (Ensaio 7) observou-se que nestes cultivos a cepa T-73 produziu $102,3 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, enquanto que a cepa CR-85 não produziu nada. Apesar dos esforços com estudos iniciais com híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*, tais leveduras ainda não tiveram suas características enológicas comprovadas. Gonzáles e colaboradores (2007), na tentativa de analisar a influência do híbrido quanto a temperatura durante a fermentação de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* em mosto de uva branca e tinta conseguiu identificar que a melhor performance foi à 14, 18 e 22°C, dessa forma isso pode justificar a ineficiência fermentativa da CR-85, visto que os ensaios foram realizados a temperatura superior.

Em estudo paralelo com a presente pesquisa utilizando as mesmas condições de fermentação, com mosto de Jabuticaba (*Plinia cauliflora*) e concentrações de açúcares iniciais similares, foi observado pela pesquisadora, uma produção de $2,65 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol e $1,47 \text{ g.L}^{-1}$ glicerol no tempo de 140 h de fermentação (CARNEIRO, pendente de publicação). Como comprovado por Salvadó e colaboradores (2011), a cepa CR-85

apenas sobressai em produção de etanol à T-73 em temperaturas inferiores a 25 °C, mas mesmo assim produz considerável quantidade de etanol, no entanto, o presente trabalho foi feito a 25 °C e houve produção de 0 g.L⁻¹, que sugere uma possível inibição do crescimento da levedura CR-85 ou desvio de rota metabólica devido o fruto utilizado, Cagaita, desfavorecendo assim, a conversão do substrato (mosto de Cagaita) em produtos (etanol e glicerol).

A partir dos resultados da variável resposta etanol obtidos na fermentação foi realizado uma regressão múltipla das variáveis independentes através do *software* Statistica 7.0, resultando os termos isolados, as interações e os termos quadráticos de cada uma das variáveis, T-73 (*S. cerevisiae*), CR-85 (*S. kudriavzevii*) como fatores independentes, e como variável resposta Etanol a 168 h apresentados na Tabela 6. Na Tabela 7 e Equação 12 é exibido o modelo de regressão múltiplo completo com R² de 51%. Como o planejamento do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) não foi significativo, foi discutido apenas a regressão para a variável resposta etanol.

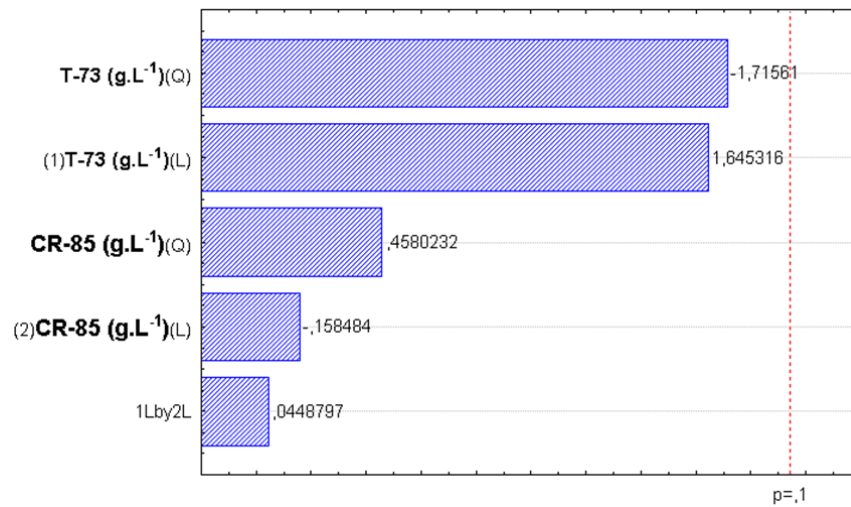
Tabela 7 – Parâmetros da Regressão da Fermentação à 168 h para Etanol.

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Termo Independente	102,7351	0,000324
T-73 (g.L⁻¹)(X₁) (L)	16,2578	0,151007
T-73 (g.L⁻¹)(X₁²) (Q)	-18,9535	0,137053
CR-85 (g.L⁻¹)(X₂) (L)	-1,5660	0,879275
CR-85 (g.L⁻¹)(X₂²) (Q)	5,0601	0,663055
T-73*CR-85(X₁*X₂) (L)	0,6272	0,965660
	R ² =0,51	

$$Etanol = 102,7351 + 16,2575X_1 - 18,9535X_1^2 - 1,5660X_2 + 5,0601X_2^2 + 0,6272X_1X_2 \quad \text{Equação 12}$$

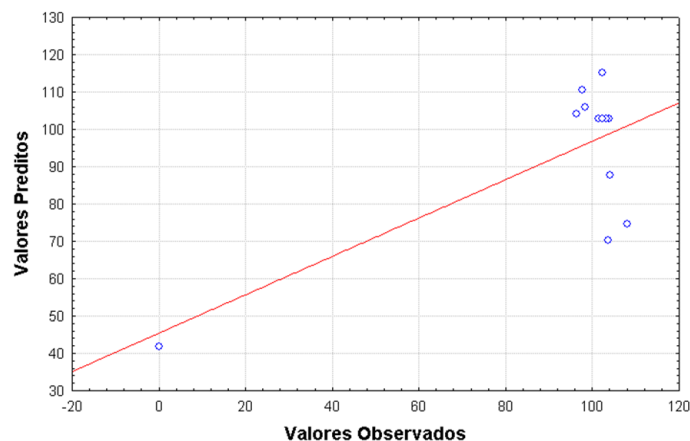
No intuito de determinar os fatores relevantes para o modelo, foi realizado a análise de Pareto, apresentada na Figura 13. A análise de Pareto mostra visivelmente quais são os fatores significativos para o modelo, e quão significativos eles são a (p<0,10). Podendo ser notado que nenhum fator de concentração de T-73 e CR-85, quadrático e linear e sua interação foram significativos para o modelo ao nível de significância (p<0,10).

Figura 13 – Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Completo.



Além dos valores de significância (p) e análise de Pareto, pôde-se observar que não houve aproximação entre os resultados obtidos experimentalmente e os obtidos pelo modelo de ajuste, indicando que não houve uma boa relação entre o modelo e os pontos experimentais conforme Figura 14, justificando o baixo valor obtido para o coeficiente de determinação (R^2).

Figura 14 – Valores Preditos pelo modelo *versus* Valores Observados no experimento para Etanol à 168 h de Fermentação.



A partir do primeiro planejamento experimental proposto, acima discutido, observou-se não houve produtividade e correlação significativa, justificada estatisticamente pelos coeficientes dos modelos com ($p < 0,10$) de significância. Dessa forma, optou-se por um planejamento fatorial comum 2^2 adicionados de quatro pontos centrais com o intuito de obter um modelo que

melhor descrevesse o comportamento metabólico das cepas atuando em co-culturas.

5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO FATORIAL COMUM 2² ADICIONADOS DE 4 PONTOS CENTRAIS.

Após verificar a não correlação significativa através do modelo obtido através do delineamento central composto rotacional, foi elaborado um planejamento fatorial comum, 2² adicionados de 4 pontos centrais. A Tabela 8 ilustra as variáveis independentes T-73 e CR-85 codificadas e decodificadas (g.L⁻¹) e as concentrações de etanol, biomassa e glicerol no tempo de 168 h de fermentação.

Tabela 8 – Matriz do Planejamento Fatorial Comum 2² com valores codificados e decodificados para variáveis dependentes T-73 e CR-85 em g.L⁻¹ e concentração de Etanol, Biomassa e Glicerol em g.L⁻¹ após fermentação no tempo de 168 h.

Nº do Ensaio	T-73 (g.L ⁻¹)	CR-85 (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)
1	+1 (1,33)	-1(0,19)	98,29	3,72	0,40
2	-1(0,22)	-1(0,19)	108,07	3,53	0,43
3	+1(1,33)	+1(1,16)	96,49	3,86	0,41
4	-1(0,22)	+1(1,16)	103,76	3,76	0,49
5	0(0,78)	0(0,03)	103,97	3,72	0,46
6	0(0,78)	0(0,03)	103,20	3,73	0,44
7	0(0,78)	0(0,03)	101,37	3,87	0,44
8	0(0,78)	0(0,03)	102,38	3,70	0,42

A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial comum, foi realizado a regressão linear através do *software* Statistica 7.0, tendo como fatores isolados as concentrações de T-73 e CR-85 e a interação entre elas e como variáveis respostas as concentrações obtidas de etanol, biomassa e glicerol no tempo de 168 h de fermentação na Tabela 8. Na Tabela 9 apresenta os coeficientes do modelo de regressão linear completa das

Equações 14 para etanol, Equação 15 para biomassa e Equação 16 para glicerol.

Tabela 9 – Parâmetros da Regressão da Fermentação à 168 h para Etanol, Biomassa e Glicerol.

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Etanol (g.L⁻¹)	Termo Independente	102,19	0,000000
	T-73 (g.L⁻¹) X₁	-4,26	0,000977
	CR-85 (g.L⁻¹) X₂	-1,52	0,056149
	R²	0,91	
Biomassa (g.L⁻¹)	Termo Independente	3,79	0,000000
	T-73 (g.L⁻¹) X₁	0,071	0,12
	CR-85 (g.L⁻¹) X₂	0,089	0,07
	R²	0,68	
Glicerol (g.L⁻¹)	Termo Independente	0,44	0,000000
	T-73 (g.L⁻¹) X₁	-0,026	0,034
	CR-85 (g.L⁻¹) X₂	0,018	0,08
	T-73*CR-85 X₁*X₂	-0,012	0,20
	R²	0,81	

$$Etanol = 102,1960 - 4,2638X_1 - 1,5288X_2 \quad \text{Equação 14}$$

$$Biomassa = 3,742450 + 0,071340X_1 + 0,089900X_2 \quad \text{Equação 15}$$

$$Glicerol = 0,440511 - 0,026268X_1 + 0,018774X_2 - 0,012742X_1X_2 \quad \text{Equação 16}$$

Segundo Calado e Montgomery (2003) o diagrama de Pareto, apresenta de forma rápida e clara dos efeitos que são estatisticamente importantes. Os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória, devem ser considerados no modelo matemático. Dessa forma, foi feito uma análise de Pareto para determinar os fatores relevantes aos modelos das Equação 13, 14 e 15, e apresentados nas Figura 15 para etanol, Figura 16 para biomassa e Figura 17 para glicerol.

Figura 15 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Etanol a 168 h.

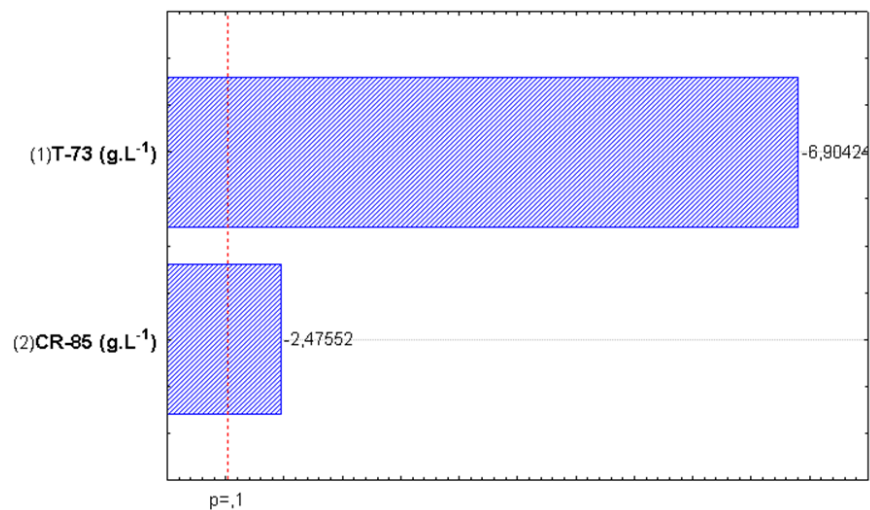


Figura 16 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Biomassa a 168 h.

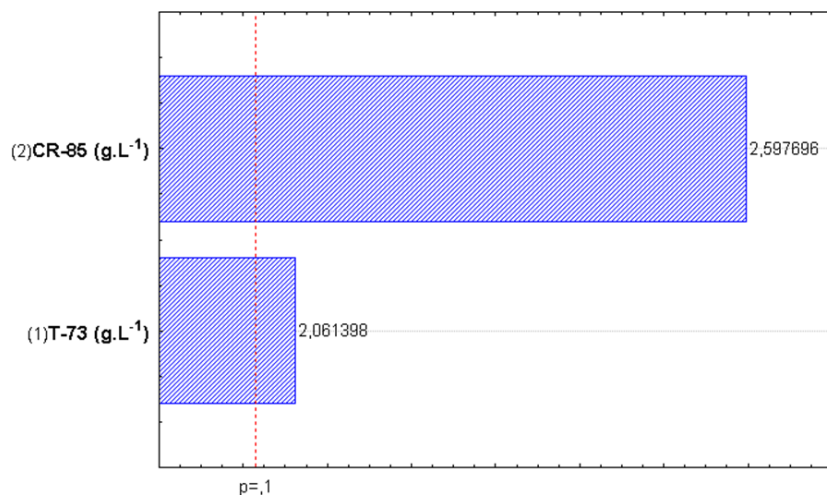
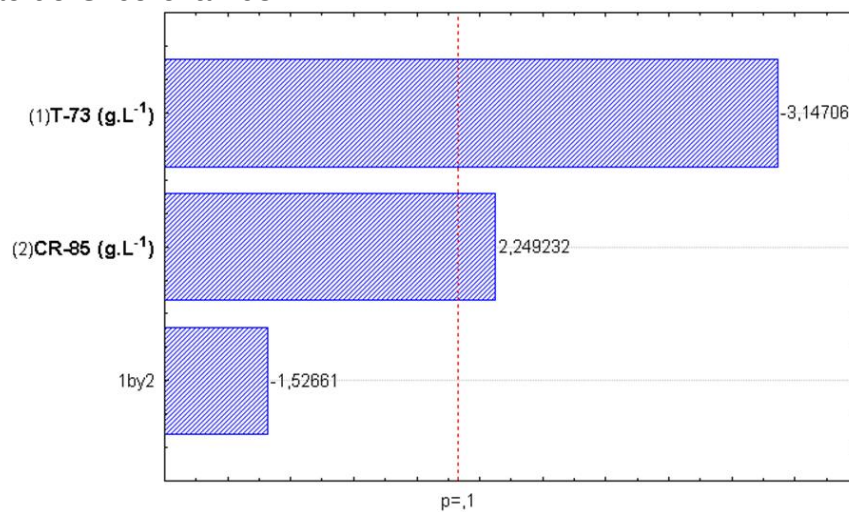


Figura 17 – Gráfico de Pareto das Variáveis T-73 e CR-85 do modelo para produção de Glicerol a 168 h.



Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística de *test t*, obtidos na janela dos efeitos principais gerados pelo *software* Statistic (CALADO E MONTGOMERY, 2003).

Ao observar o diagrama de Pareto da Figura 15, correspondente a variável resposta etanol, os termos do modelo linear foram todos significativos. Dessa forma o modelo foi reduzido entre as interações (X_1X_2) para melhor ajuste do modelo a um nível de $p=0,10$ de significância.

A Figura 16, correspondente ao diagrama de Pareto do modelo para produção de biomassa, demonstrou que fator CR-85 obteve maior influência no modelo gerado para a variável dependente biomassa. Notou-se também que o modelo completo, quando gerado obteve os fatores T-73 e a interação (X_1X_2) estatisticamente não significativas a $p=0,10$ optando assim pela retirada da interação entre os fatores, tornando o fator T-73 significativo a $p=0,10$.

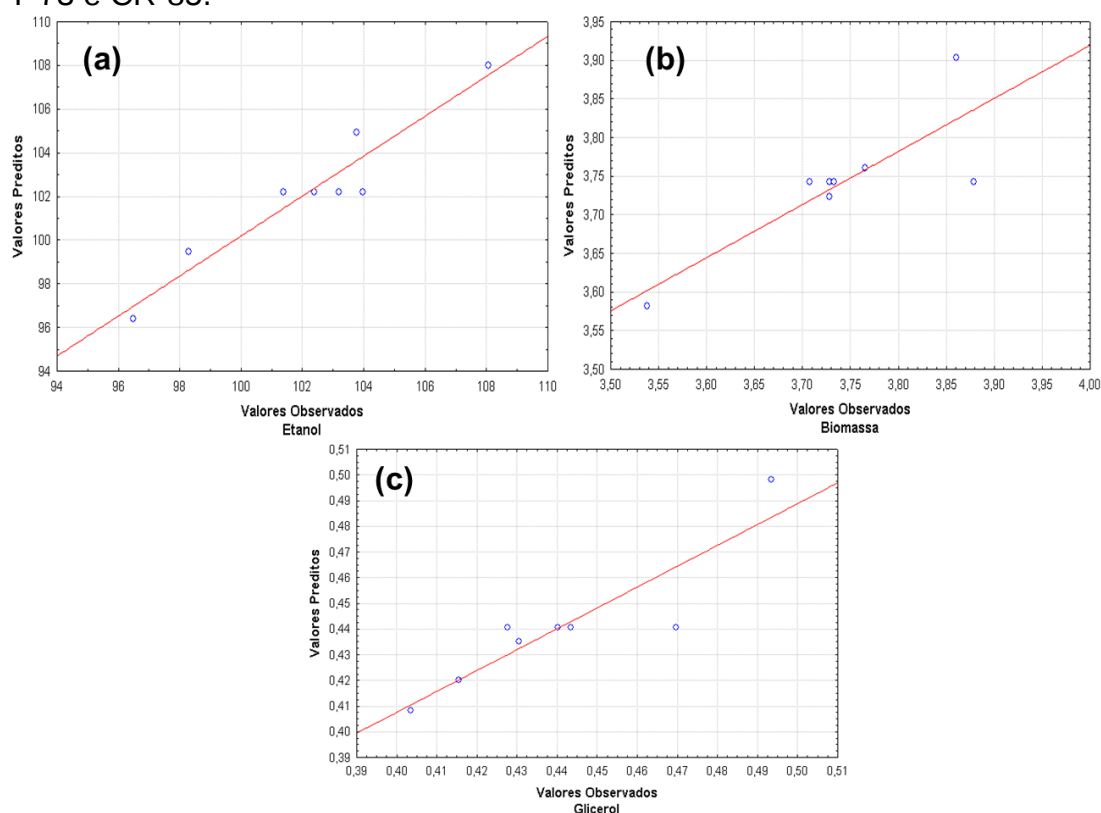
Concluindo a análise dos diagramas de Pareto, na Figura 17, demonstra o diagrama de Pareto do modelo referente a produção de glicerol. Observou-se que o fator que atingiu maior efeito sobre o modelo, a $p=0,10$ de significância, foi a cepa T-73. A cepa CR-85, também possuiu efeito significativo no modelo ao nível de $p=0,10$. Se tratando do fator interação entre os dois fatores analisados (X_1X_2), o mesmo não possuiu relevância significativa ao nível de $p=0,10$ para o modelo. Contudo, neste caso a retirada do fator de interação não melhorou a qualidade do ajuste, então o modelo completo foi mantido com todos os fatores.

Além do valor de significância (p) e do valor do coeficiente de determinação (R^2), conforme descrito por Rodrigues e Lemma (2005) na qual o mesmo quantifica a qualidade do ajustamento por fornecer uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, possuindo variação entre 0 – 100%, verificou-se após análise a ($p<0,10$) que o coeficiente de determinação para a variável etanol foi de 91%, demonstrando excelente qualidade do ajuste do modelo. A variável biomassa, possuiu valor inferior a variável etanol, com 68% de confiabilidade, mesmo após o ajuste do modelo com retirada de interação obteve-se valor significativo ($p<0,10$) para cepa T-73. Para a última

variável dependente do modelo, o glicerol atingiu 81% de coeficiente de determinação, considerando ótima qualidade do ajuste do modelo.

A análise de ajuste dos modelos também foi realizada utilizando gráficos de valores observados experimentalmente *versus* valores preditos pelo modelo matemático linear obtido, exibidos pela Figura 18a para a variável resposta etanol, 18b para a variável resposta biomassa e 18c para a variável resposta glicerol.

Figura 18 – Valores Observados *versus* Valores Preditos para Etanol (a), Biomassa (b) e Glicerol (c) das concentrações das variáveis independentes T-73 e CR-85.



*a linha diagonal de cor vermelha representa a concordância exata.

Os pontos são distribuídos ao acaso próximos da linha, demonstrando ótima concordância entre os dados para etanol. Entretanto, ao analisar os gráficos referente a biomassa notou-se a existência de pontos com distâncias superiores considerando-os como sendo aqueles que menos se adequaram ao modelo e novamente demonstrando que o modelo possuiu nível de coeficiente de determinação menor (68%). Na análise dos valores observados *versus* preditos referentes ao glicerol nota-se que alguns pontos

estão distribuídos à maiores distâncias da reta, que também demonstraram que foram os pontos que menos se adequaram ao modelo, entretanto, seu coeficiente de determinação foi considerado bom atingindo um valor de 81%.

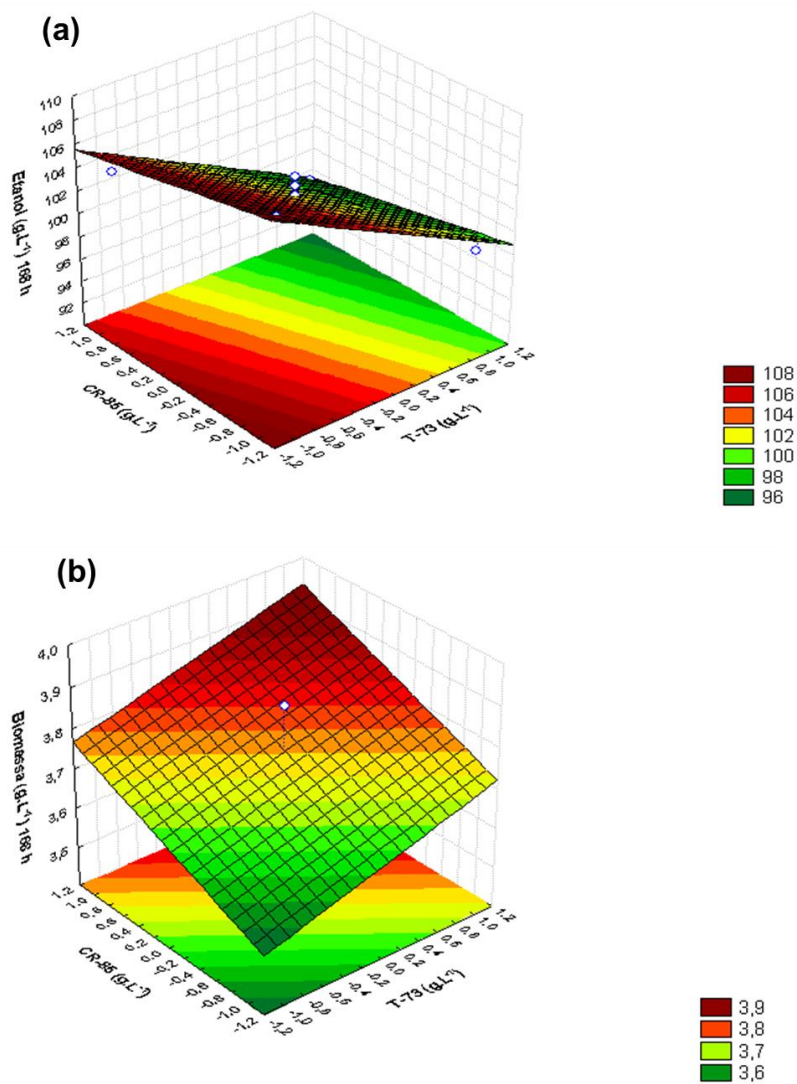
Os parâmetros gerados pelo modelo são capazes de influenciar efeitos tanto positivos quanto negativos para as diferentes respostas, tais efeitos mostram como o metabolismo das leveduras responderam sobre as interações em co-culturas. Observou-se interação positiva durante os experimentos com níveis inferiores para ambas cepas T-73 (0,22 g.L⁻¹) e CR-85 (0,19 g.L⁻¹) possui efeito positivo na produção de etanol (108,07 g.L⁻¹). Esse comportamento já foi observado em outros trabalhos (PISKUR e LANGKJAER, 2004) visto que a *S. cerevisiae* possui vigorosa capacidade fermentativa mesmo na presença de oxigênio, tornando-a uma levedura de grande eficiência na produção de etanol.

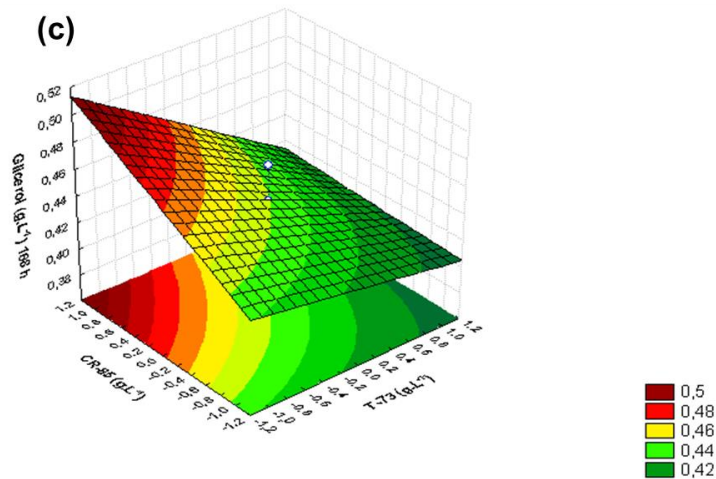
Quanto na produção de biomassa foi encontrado a maior produção quando houve interação positiva dos pontos centrais (0), (0,7812 g.L⁻¹) para T-73 e (0,0324 g.L⁻¹) para CR-85. Esse comportamento de aumento de biomassa já foi comprovado por Salvadó et al., (2011), na qual salienta uma grande vantagem da cepa *S. cerevisiae* sobre as outras espécies quanto a eficiência no crescimento em uma ampla gama de temperaturas, especialmente em altas temperaturas (32°C).

Com relação a variável Glicerol, notou-se maior produção (0,49 g.L⁻¹) quando a levedura CR-85 atuou no experimento em níveis maiores que a T-73 (1,16 g.L⁻¹), o que pôde ser explicado por Oliveira (2016), em que a rota metabólica da *S. cerevisiae* com a transformação do piruvato em etanol, o potencial redox se equilibra e, no entanto, a mesma não requer da rota do glicerol limitando a produção de biomassa em favor da fermentação e obtenção de etanol. Em troca *S. kudriavzevii* pode estar respirando por maior tempo e no entanto sua fermentação não é tão efetiva, pois requer da rota do glicerol para compensar o potencial redox que se produz com a glicólise. Assim, *S. kudriavzevii* aumenta a produção de glicerol e produz menor quantidade de biomassa, demonstrando uma importante diferença na regulação do metabolismo respiro-fermentativo entre ambas leveduras.

A Figura 19 apresenta as superfícies de resposta, resultante do modelo linear gerado para a produção de Etanol (a), Biomassa (b) e Glicerol (c) em função das diferentes quantidades de T-73 e CR-85.

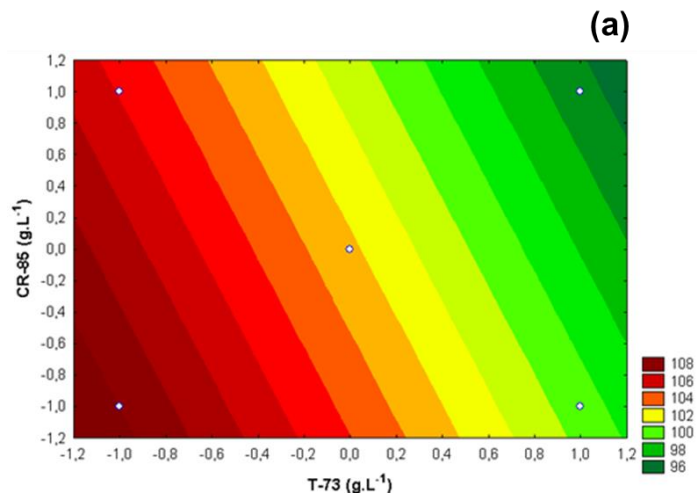
Figura 19 – Superfície de Resposta da Relação Entre a concentração de T-73 e CR-85 na produção de Etanol (a), produção de Biomassa (b) e produção de Glicerol (c) com 168 horas de Fermentação.

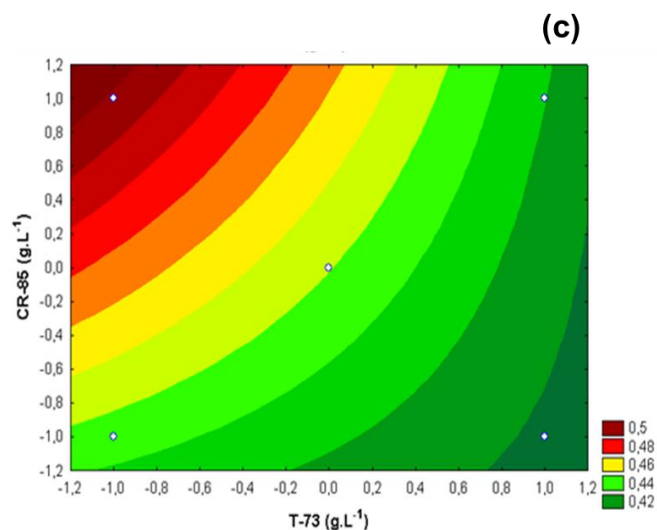
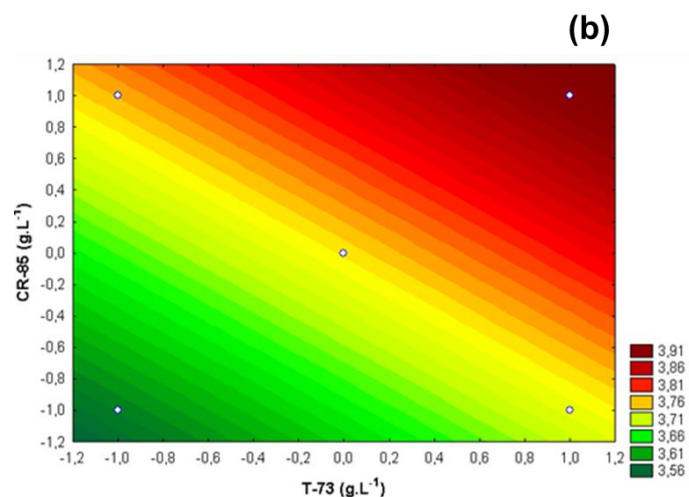




A Figura 20 a, b e c, demonstram as regiões de contorno de resposta para a produção de etanol (a), biomassa (b) e glicerol (c) em relação a diferentes quantidades de T-73 e CR-85 na fermentação.

Figura 20– Regiões de Contorno da Relação Entre a concentração de T-73 e CR-85 na produção de Etanol (a), produção de Biomassa (b) e produção de Glicerol (c) com 168 horas





As curvas de nível de cor verde foram as regiões onde as respostas possuem menores valores numéricos. Observa-se que nas Figuras 19 (a) e Figura 20 (a), referente a variável etanol, atingiu menor valor numérico correspondente ao ensaio 3 conforme Tabela 7, na qual possuía (1,33 g.L⁻¹) de T-73 e (1,16 g.L⁻¹) de CR-85 produzindo uma concentração de (96,49 g.L⁻¹) de etanol. Já para biomassa, o ensaio 2, com (0,22 g.L⁻¹) de T-73 e (0,19 g.L⁻¹) de CR-85, produziu (3,53 g.L⁻¹) de biomassa e o ensaio 1, com (1,33 g.L⁻¹) de T-73 e (0,19 g.L⁻¹) de CR-85, produziu (0,36 g.L⁻¹) de glicerol. Comprovando que todos os pontos verdes na curva comprova ter sido os menores valores numéricos encontrados.

As curvas de nível de cor vermelha estão localizadas nas regiões onde as respostas possuíam os maiores valores numéricos referentes as

variáveis respostas etanol, biomassa e glicerol, comprovada através da Tabela 7. Os maiores valores numéricos encontrados foram para o ensaio 2, (0,22 g.L⁻¹) de T-73 e (0,19 g.L⁻¹) de CR-85, com produção de etanol (108,07 g.L⁻¹). Carneiro (pendente de publicação) ao utilizar a mesma co-culturas obteve o maior ponto de etanol (115 g.L⁻¹) quando possuía ponto (0) de T-73 e ponto axial positivo para CR-85, utilizando quantidade da cepa CR-85 superior a cepa T-73. O Ensaio 3, (1,33 g.L⁻¹) de T-73 e (1,16 g.L⁻¹) de CR-85, produziu (3,86 g.L⁻¹) de biomassa, enquanto que o ensaio 4, (0,22 g.L⁻¹) de T-73 e (1,16 g.L⁻¹) CR-85, produziu (0,49 g.L⁻¹) de glicerol.

5.5 VALIDAÇÃO PARA COMPROVAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO

Para a validação do modelo foram utilizados três experimentos em triplicata escolhidos a partir dos pontos ótimos nas melhores regiões de contorno obtidas para cada variável resposta.

Foi verificado para a variável etanol, conforme Tabela 9, apenas dois pontos experimentais próximo aos valores preditos. O Experimento de validação 2 com (98,9 g.L⁻¹) de etanol atingiu 4% de erro e o Experimento de validação 3 com (98,48 g.L⁻¹) de etanol atingiu 1% de erro. Para biomassa, o Experimento de validação 1 alcançou um valor experimental de 3,60 g.L⁻¹ e o Experimento de validação 3 obteve 3,70 g.L⁻¹ de biomassa, ambos com erro menor que 1%.

Tabela 10 – Valores Experimentais e Preditos para os Experimentos de Validação do Modelo Linear de Predição dos resultados de produção de Etanol e Biomassa à 168 h de Fermentação.

Variável Resposta (g.L⁻¹)	Experimento	Observado	Predito	Erro (%)
Etanol	V₂	98,9	103,03	4
	V₃	98,5	97,60	1
Biomassa	V₁	3,60	3,59	0,16
	V₃	3,70	3,74	1

Esses modelos gerados apresentaram grande possibilidade para iniciar estudos mais aprofundados sobre o comportamento metabólico entre mais de uma levedura. Santos (2017), verificou em co-culturas de duas leveduras *Saccharomyces* empregada na produção de etanol combustível, que os modelos gerados para a predição de Etanol, Biomassa e Glicerol se mostrou significativos, porém ressalta a impotência de realizar um trabalho que investigue a interação das rotas bioquímicas entre as leveduras e adiciona-las como fatores aos modelos. No trabalho de Arroyo-López (2010), utilizando as cepas *S. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* observou-se também que os modelos gerados não foram significativos a ($p>0.05$), mas são apropriados para descrever os efeitos das variáveis ambientais sobre a produção de etanol.

5.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Através da metodologia descrita para compostos voláteis para dois experimentos escolhidos descritos na Tabela 10, foram determinados em escala de porcentagem de área dos picos encontrados após leitura das mesmas por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 11 que demonstra a quantidade (%) da somatória de compostos detectados.

Tabela 11 – Experimentos escolhidos para realização de Cromatografia Gasosa para determinação dos Compostos Voláteis.

Experimento	Quantidade de Biomassa (g.L ⁻¹)	
	T-73	CR-85
1	0,56	0,87
2	1,22	0,96

Tabela 12 – Quantificação dos Compostos Voláteis em percentual.

Compostos	Experimento 1 (%)	Experimento 2 (%)
Dióxido de Carbono	7,2	3,2
Alcano	8,4	6,1
Hexano	20,7	12,6
Metil-ciclo-pentano	3,21	1,8

Acetaldeído	7,6	4,0
Isobutanal	1,77	1,0
Acetato de etila	3,75	2,5
Metanoato de Etila	2,07	1,2
Mirceno	0	0,5
Limoneno	0	0,4
Álcool isoamilico	0	34,0
1-pentanol	45,3	32,6
Total (%)	100	100

Nos resultados obtidos pela análise de compostos voláteis foi notório a presença de alcanos, que fazem parte dos hidrocarbonetos, atingindo o percentual de (8,4 e 6,1 %) para o Alcano, (20,7 e 12,6%) Hexano, e (3,21 e 1,8%) metil-ciclo-pentano, para os Experimentos 1 e 2, respectivamente, com relação a composição total dos compostos voláteis. Compostos do tipo álcoois superiores também foram detectados, álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) (0 – 34%). De acordo com Stribny e colaboradores (2015), esse álcoois são importantes componentes de sabor e aroma na indústria alimentícia, e quando se trata de bebidas alcoólicas, estes compostos são produzidos pelas leveduras durante a fermentação. Nesse mesmo estudo demonstrou também que a cepa de *S. kudriavzevii* produziu valores de álcoois superiores.

Lambrechts e Pretorius (2000) e Swiegers e colaboradores (2005) também descreveram que ésteres de acetato e alcoóis superiores produzidos durante a fermentação, são responsáveis por proporcionar o aroma frutal e floral. O acetato de etila, considerado um éster de acetato, foi encontrado em proporção de 3,75 % para o experimento 1 e 2,5 % para o experimento 2. Styger e colaboradores (2011) citam que os ésteres mais significantes são o acetato de etila, solvente do tipo aroma (framboesa), acetato isobutilico, acetato isoamílico (banana) e acetato 2-feniletil (aroma floral). Estes ésteres são sintetizados pela acetil transferase alcoólica proveniente da acetil-CoA e do etanol. Mostrando assim que o experimento 1 possuiu maior teor de aromas frutais e florais.

O acetaldeído encontrado com 7,6 e 4,0 % que, segundo Tomasset (1998) é o principal aldeído presente no vinho, do ponto de vista quantitativo.

A maior parte do acetaldeído encontrado em vinho é resultante da oxidação microbiana do etanol em condições aeróbias (PRIPIS-NICOLAU et al., 2000). Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações do mesmo, pois ele possui papel central na manifestação da intoxicação alcoólica (BRASIL, 2018).

O Mirceno, encontrado em baixas quantidades (0 e 0,5%) e o Limoneno (0 e 0,4%) são considerados óleos essenciais. Simões e colaboradores (2005) citam que as principais famílias que produzem óleos essenciais pertencem às angiospermas dicotiledôneas, tais como Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae entre outras. Esses óleos têm despertado interesse econômico na indústria de cosméticos e alimentos, justamente por serem aromas ainda desconhecidos, e pela indústria farmacêutica, visto que muitos óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana (ESTANISLAU et al., 2001).

A presença dos mesmos, mirceno e limoneno, mesmo que em baixa porcentagem está diretamente ligada ao fato que as folhas da Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) pertencente às Myrtaceae, possuem óleos essenciais constituídos principalmente por (E)-cariofileno, α -humuleno, limoneno, α -tujeno, α -terpineol, mirceno e óxido de cariofileno (COSTA et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

Utilizando como matéria-prima, o fruto de Cagaita, foi possível elaborar uma bebida fermentada por meio do desenho experimental DCCR, na qual estabeleceu-se diferenças existentes entre as espécies de leveduras *S. cerevisiae* (T-73) *S. kudriavzevii* (CR-85) para o processo fermentativo em relação a produção de etanol, biomassa e glicerol.

Enquanto que a partir do Delineamento Fatorial Comum foi possível obter modelos matemáticos que predissesse, com base da quantidade de leveduras *S. cerevisiae* (T-73) *S. kudriavzevii* (CR-85), a produção de etanol, biomassa e glicerol com excelente potencial preditivo. Por esse estudo também pôde-se constatar, que em co-culturas, a atuação da espécie *Saccharomyces cerevisiae* teve melhores resultados para todos os parâmetros cinéticos avaliados, comprovando a competitividade e predominância em relação a outras espécies de leveduras utilizadas na fermentação.

Para a levedura *S. kudriavzevii* (CR-85) o desempenho em termos de produção de glicerol ganhou-se destaque por apresentar ligeiro aumento nos resultados encontrados quando a mesma possuía concentração de biomassa elevada.

No quesito produção de etanol, o ensaio 2 (-1,-1) do Delineamento Fatorial Comum, obteve maior produção de etanol (13,69 %v/v), no enquanto, o ensaio 4 (-1,+1) obteve a maior produção final de glicerol (0,49 g.L⁻¹). Levando em consideração a busca dos consumidores por vinhos com menor teor alcoólico e maior doçura, suavidade e plenitude ocasionado pela presença acentuada de glicerol, o ensaio 4, ganha destaque para possível investigações futuras.

Com relação aos compostos voláteis, observou-se que nos ensaios com valores de concentração de biomassa inicial próximo ente ambas leveduras, apresentou maiores porcentagens dos compostos que são considerados aromas, além de possuir baixa porcentagem de dióxidos de carbono e acetaldeído.

Por fim, pelo presente trabalho, verificou-se que as duas cepas, T-73 e CR-85, atuam de maneira complementar, a primeira aumentando o teor alcoólicos e a segunda aumentando a quantidade de biomassa e glicerol, característica requerida na indústrias de bebida fermentada, sendo assim a utilização de co-culturas de leveduras em caldo de frutas brasileiras vislumbra um grande potencial econômico a ser explorado.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigação do possível inibidor da rota metabólica de etanol das leveduras CR-85 presente na Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) por cultivo contínuo;
- Estudo mais aprofundado no processo fermentativo entre os híbridos variando pH, temperatura de fermentação e possíveis inibidores da rota metabólica;
- Produção em escala de batelada, incluindo todas as etapas do processo de fabricação para bebidas alcoólicas fermentada, incluindo análises químicas e sensoriais do produto final;
- Estudo aprofundado de possível mutação ou adaptação da cepa CR-85 para fermentação em temperaturas ambientes;
- Estudo da determinação da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real com o intuito da verificação o comportamento genético de ambas cepas na formação do produto;
- Estudo do modelo matemático do metabolismo das co-culturas para formação da bebida alcoólica fermentada.

8 REFERÊNCIAS

AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Occurrence of function of yeasts. 2006. FEMS Fermento Res. Jan;6(1):30-9

ALBERS, E. et al. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62 (9), 3187-3195.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.p. 864

ALCÁZAR, E. **Protecting cropgenetic diversity for food security: political, ethicaland technical challenges**. NatureReviewsGenetics, London, v.6, n.12, 2005.

ALMEIDA, S.P. de. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998b. 188p.

ALONSO-DEL-REAL, J.; et al. **Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness and influence in final wine composition**. Frontiers in Microbiology. v.8, art.150, 2017.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, v. 4, p. 523, 2001.

ARROYO-LÓPEZ, F. N. et al (2011). Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a wine model system mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 28, 423–435. doi: 10.1002/yea.1848

ARROYO-LÓPEZ, F.N. et al. Predictive microbiology and table olives. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v.II, n.13, p.1452-1461, 2010.

ASQUIERI, E. R; SILVA, A. G. de M.; CANDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2009, vol.29, n.4, pp. 896-904. ISSN 0101-2061.

ÁVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. Frutos dos cerrados – Preservação gera muitos frutos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.15, p.36-41, 2003.

AZEVEDO, M. W. A., et al. **Estudo da Viabilidade de Obtenção de Etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em Mosto de Frutos de Caqui (*Diospyros kaki* L.)**. Revista Ciências Exatas e Naturais, Vol.9 nº 2, 2007 P. 267-278.

BADER, J., et al. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371–387, 2010.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances** **26**, v. 26, p. 89–105, 2008.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M; VAN MARIS, A. J.A.; KOTTER, P.; LUTTIK, M. A.H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 15-37, 2001.

BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution 2003. **Microbiology**. **2003** Mar;149(Pt 3):557-67

BARROS-NETO, B. DE; SACRMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BECZE, G. I. DE. Microbiological Process Report Yeasts: I . Morphology. **Research Laboratories**, v. 4, 1955.

BELLOCH, C, et al. (2009) Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. **Appl Environ Microbiol** **75**(8):2534-44

BELY, M., et al. (2008) Impacto da cultura mista de *Torulaspora delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação com alto teor de açúcar . **Int J Food Microbiol** **122** : 312–320.

BERTAGNOLLI, S. M. M. **Bebidas fermentadas de Goiaba: compostos bioativos, caracterização volátil e aproveitamento de resíduos**, 2014. 114f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

BISSON, L.F., KUNKEE, R.E., 1993. **Microbial interactions during wine production**. In: Zeikus, J.G., Johnson, E.A. (Eds.), *Mixed Cultures in Biotechnol*

BRADBURY, J. E.,et al. (2006). **A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains**. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**:27–37.

BRASIL, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 08 DE FEVEREIRO DE 2018. O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho** na forma desta Instrução Normativa aplicando-se ao vinho e derivados da uva e do vinho comercializados em todo o território nacional, produzidos no Brasil e importados, Brasília. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 6.871**, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Portaria n. 229**, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes a complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho. Diário Oficial da União, Brasília, 25 out. 1988.

BRITO, M. A. et al., **Cagaita**: biologia e manejo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 79 p.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento experimental usando Statística**. 1 ed. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CARDOSO, L. de M., et al.. **Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins**. Food Research International, Barking, v.44, p.2151-2154, 2011.

CARVALHO, R. S. de, et al. **Caracterização dos perfis cinéticos da fermentação alcoólica de sementes de Cagaita (*Eugenia dysenterica*) em biorreator de 5 litros**. SLACA, Campinas, São Paulo, 2017.

CIANI M, et al. (2006) Comportamento de fermentação e interações metabólicas de fermentações de leveduras de vinhos de várias espécies . *Int J Food Microbiol* **108** : 239-245

COMITINI, F., et al. 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology** 28 (5), 873e882.

COSTA, T. R.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERNANDES, O. F. L; PAULA, J.R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M. R. R. **Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil**. Journal of Ethnopharmacology, vol. 72, p. 111 – 117, 2000.

DEMUYTER, C., et al. 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. **J. Appl. Microbiol.** 97, 1140–8.

DEQUIN, S., CASAREGOLA, S., 2011. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **C. R. Biol.** 334, 687–93.

DIAS, D. R., et al. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. 2007. **International Journal of Food Science and Technology**, 42(3), 319-329.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração do fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.3, p. 342–350, 2003

DONADIO, L. C.; et al., **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.

DUARTE, A. R, et al. **Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica***. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2010.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 4, p. 557-569, 2009.

DUJON, B., 2010 Yeast evolutionary genomics. **Nat. Rev. Genet.** 11: 512–524.

DUJON, B., et al., 2004 Genome evolution in yeasts. **Nature** 430: 35–44.

EITEN, G. 1994. Vegetação do Cerrado. Pp. 17-75. In: M.N. Pinto (org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília, Editora da UnB.

ERIKSSON, P.; ANDRD, L.; ANSELL, R.; ADLER, L. Cloning and characterization of GPD2 , a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD +) in *Saccharomyces cerevisiae* , and its comparison with GPD1. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 95–107, 1995.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. ***Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, Paraná, Brasil. v. 30, n. 2, p. 361 – 380, abr./jun., 2009.

FELFILI, J.M., SOUZA-SILVA, J.C. & SCARIOT, A. 2005. Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado: avanços no conhecimento. In Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação (A. Scariot, J.C. Souza-Silva & J.M. Felfili, eds.). **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, DF, p.25-44.

FERNANDES, G. W., et al. In: **Conhecendo a biodiversidade** / Organizadores: Ariane Luna Peixoto, José Roberto Pujol Luz, Marcia Aparecida de Brito. – Brasília: MCTIC, CNPq, PPBio, 2016.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Birmingham: ASM, 1997. p. 105-132.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **Int. J. Food Microbiol., Int J Food Microbiol.** 2003 Sep 1;86(1-2):11-22

FLEET, G.H., HEARD, G.M., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 42–43.

FLORES C. L., et al. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 24:507–529

FORZZA, R.C. (eds.). 2010. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 2 vols. Andrea Jakobsson Estúdio / Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1699p.

FRANCO, M. G. D BERNADETTE. *Importância dos Micro-organismos nos alimentos*. In: FRANCO, M. G. D BERNADETTE e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2004. p. 1 – 12.

GAVA, A.J. et al. **Conservação de alimentos por fermentações** In: GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 1ª edição, 2010, p. 319.

GONÁLES, S. (2006) Identificação molecular e caracterização de leveduras de vinho isoladas de Tenerife (Ilhas Canárias, Espanha). *J Appl Microbiol* 102: 1018-1025.

GONZALEZ, R., QUIRO'S, M., & MORALES, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. **Trends in Food Science & Technology**, 29, 55–61.

GONZÁLEZ, S.S., et al. (2007) Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food. Microbiol.* 116, 11-18.

GONZÁLEZ, S.S., et al. 2008. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2314–20.

GONZÁLEZ, S.S., Gallo, L., Climent, M.D., Barrio, E., Querol, A., 2007. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 11–18.

GUERRA, C. C. et al. Vinhos tropicais: novo paradigma enológico e mercadológico. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 234, p. 100-104, 2006.

GUERRA, C.C. **Maturação da uva e condução da vinificação para a elaboração de vinhos finos**. In: REGINA, M. de A. (Ed.). *Viticultura e enologia: atualizando conceitos*. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 179-192 p.

HEARD, G., 1999. Novel yeasts in winemaking: looking to the future. **Food Australia** 51 (8), 347e352.

HENRIQUES, D., et al. *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9: 88

HERSKOWITZ, I. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 536–553, 1988.

JAY, M., et al. *Taxonomy, Role, and Significance of Microorganisms in Foods*. In: **Modern Food Microbiology**. New York, Springer, 7th ed., 2005. p. 13-37.

JOLLY, N.P., et al, 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **Vine** 27 (1), 15-39.

JONES, G. V., et al. (2005). **Climate Change and Global Wine Quality**. *Clim. Change*. 319–343.

KIM, D-H.; HONG, Y-A. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia*. **Biotechnol Lett**. 2008, 30 (9): 1633-8.

KNAUF, M.; KRAUS, K. (2006). Specific yeasts developed for modern ethanol. **Bioethanol Technology Meeting** Detmold, Germany

LAMBRECHTS, M.G., PRETORIUS, I.S., 2000. **Yeast and its importance to wine aroma** — a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 21, 97–125.

LARSSON, K.; ANSELL, R.; ERIKSSON, P. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1101–1111, 1993.

LIU, Z. Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4717–4722, 2008.

LOPANDICI, k. , et al. (2007) Leveduras de vinho geneticamente diferentes isoladas de regiões produtoras de videiras austríacas influenciam diferentemente o aroma do vinho e contêm supostos híbridos entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii*. **FEMS Fermento Res** 7: 953-965.

LOPESZ-MALO, M., et al, 2013. Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. **PLoS One**. 2013;8(3):e60135

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 3^a ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. V. 2.

MACHADO, R. B., et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional**, Brasília, DF, 2004

MAEDA, N. R.; ANDRADE, S. J. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dúbia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **ACTA AMAZONICA**, Manaus, v.33, n.3, p.489-498, 2003.

MARIMON-JUNIOR, B. H.; HARIDASAN, M. Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerradão e um cerrado sensu stricto em áreas adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 4, p. 913-926, 2005.

MARTINELLI, G., MESSINA, T. & SANTOS FILHO, L. 2014. **Livro Vermelho da Flora do Brasil: Plantas Raras do Cerrado**. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: CNCFlores. 320p

MARTINOTTO, C. et al. **Cagaiteira** (*Eugenia Dysenterica*DC.). Boletim técnico, Universidade Federal de Lavras, MG, n. 78, p. 1-21, 2008.

MCGOVERN, P. E., et al. 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proc Nat Acad Sci USA** 101:17593–17598.

MINGORANCE-CAZORLA, L. et al. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 297-304, 2003.

MOLINA, M., et al. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. **Microscopy Research and Technique**, 51, 601_612.

MUNIZ, R. C. et al. **Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais**. B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 309-322, jul./dez. 2002

NAUMOV, G. I., et al. (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. **Int J Syst Evol Microbiol** 50(Pt 5): 1931–1942

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, B. M. **Study of glycerol and respiro-fermentative metabolism diversity among *Saccharomyces* yeasts**.(Tese de Doutorado). IATA, Universidade de Valencia, Espanha. 2016

OLIVEIRA, M. E. S. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaite (*Eugenia dysenterica*, DC) empregando leveduras livres e imobilizadas**. 2010. 86 f. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2010.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International, Barking**, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

PACHECO, M. T. B., et al. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 2, p. 83-94, 2002.

PÉTER, G.; ROSA, C. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2005.

PHAFF, H. J. Abiotic Stress. **Life Sciences**, 2001.

PISKUR, J., et al. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer. *Trends Genetics* 22, 183–186. doi: 10.1016/j.tig.2006.02.002

PISKUR, J., R. B. LANGKJAER, 2004. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. **Mol. Microbiol.** 53: 381–389.

PRETORIUS, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729

PRIPIS-NICOLAU, L.; REVEL, G.; BERTRAND, A.; MAUJEAN, A. **Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 9, 2000.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, p. 343-354, 1994.

RAINIERI, S., et al. (2003). *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96, 1-9.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J.M.; DEQUIN, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. **J. Appl. Microbiol.**, 88, 371-378.

RIBEIRO, J. E WALTER, B. **Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: S. Sano e S. Almeida, Cerrado: ambiente e flora. p. 87-166. Embrapa Cerrados, DF- 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology The Microbiology of Wine and Vinifications**. 1 ed. Talence: John Wiley & Sons, 2006.

RODRIGUES, F; et al. *Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism*. In: ROSA, C E PÉTER, G (eds.). **The**

Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. New York, 2006. p. 101 – 121.

RODRIGUES, M. I., LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** 1a Ed. Casa do Pão. Campinas, 2005.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J., et al. Wine fermentation and production. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology.** Boca Raton: CRC, 2012. p. 1-22.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J.J., et al. 2009. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. **Journal of Chromatography** 1216 (30), 5640- 5646.

ROESLER, R., et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. 2007. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 53–60.

ROJAS, V., et al. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology** 86 (1e2), 181e188.

ROMANO, P., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology** 86 (1e2), 169e180.

ROSA, C.; PÉTER, G (eds.). **The Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** New York, 2006. p. 579.

SALVADÓ, Z., et al. 2011. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2292–302.

SAMPAIO, J.P. e GONÇALVES, P. (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S.paradoxus*. **Appl Environ Microbiol** 74: 2144–2152.

SANDHU, D.K.; JOSHI, V.K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry**, v. 14, n. 1, p. 24 - 34, 1995.

SANTOS, M. V. **Estudo da competência de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura para a produção de etanol**, 2017. 110f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2017.

SANTOS, R. M.; NOGUEIRA, F. C. S.; BRASIL, A. A.; et al. Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 114–121, 2017.

SAWYER, D. (Coord.). **Perfil do ecossistema Hotspot de Biodiversidade Cerrado**. Brasília: ISPN. 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. E. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2 ed. Edgard Blucher Ltda, 2001.

SHERMAN, F. Getting Started with Yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, n. 4, p. 3–41, 2002.

SILVA, D.B. et al. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2001. 179p.

SILVA, J. A, et al.. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados**: informações exploratórias. Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 1992. 23p.

SILVA, R. S. M. **Caracterização de sub-populações de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) da região sudeste do estado de Goiás, Brasil**. 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

SILVA-FILHO, E. A. DA; SANTOS, S. K. B. DOS; RESENDE, A. DO M.; et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13–23, 2005.

SONGSTAD, D.D., et al. **Historical perspective of biofuels: learning from the past to rediscover the future**. *Plant*. v.45, p.189 –192. 2009.

SOUZA, A. C.de,. **Utilização de Cagaita, jabuticaba e pitaya na elaboração de fermentado alcoólico e vinagre**, 2015. 139f. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2015.

STYGER, et al, 2011. **Wine flavor and aroma**. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1145–1159.

SWIEGERS, J.H., BARTOWSKY, E.J., HENSCHKE, P.A., PRETORIUS, I.S., 2005. **Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour**. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173.

TAXIS, C., 2005. Spore number control and breeding in *Saccharomyces cerevisiae*: a key role for a self-organizing system. **J. Cell Biol.** 171, 627–640.

TAYLOR, J. W., M. L. BERBEE. 2006. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* 98: 838–849

TOMASSET, L. U.; **QUÍMICA ENOLÓGICA**. Ediciones Mundi-prensa: Madri, 1998. 400p.

TORTORA, G. J, et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.p. 964

TRONCHONI J, et al. (2012) Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. **Int J Food Microbiol** 155(3):191-8

TRONCHONI, J., et al. (2014). Transcriptomics of cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii* reveals the key role of gene translation efficiency in cold stress adaptations. *BMC Genomics* 15, 432.

VAN DIJKEN, J.P.; SCHEIERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. **FEMS Microbiol**, v. 32, p. 199-224, 1986.

VAN GULIK, W.M.; HEIJNEN, J.J. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. **Biotechnol. Bioeng**, v. 48, p. 681-698, 1995

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. ***Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)***. Elsevier B.V., 2011.

VERDUYN, C. **Physiology of yeasts in relation to growth yields**.In: LEEUWENHOEK, A. V. (Ed.),v. 60, p. 325-353, 1991

VISSER, W.; BAAN, A. A. VAN DER; DER, W. B.; et al. Involvement of mitochondria in the assimilatory metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Microbiology**, v. 140, p. 3039–3046, 1994.

YALCIN, S. K.; OZBAS, Y. Z. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 325-332, 2008.

ZHANG, H., et al. 2015. **Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries**. *Food Microbiol.* 46, 92–99.