

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**ESCOLA DE AGRONOMIA**

**MENANDES ALVES DE SOUZA NETO**

**Influência do Tratamento Enzimático na etapa de Fermentação da  
Produção de Cachaças**

Goiânia – GO  
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação     Tese

**2. Nome completo do autor**

**Menandes Alves de Souza Neto**

**3. Título do trabalho**

Influência do Tratamento Enzimático na etapa de Fermentação da Produção de Cachaças

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado 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.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Artur Mendes Bataus, Professor do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MENANDES ALVES DE SOUZA NETO, Discente**, em 14/10/2020, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1611617** e o código CRC **45027210**.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**ESCOLA DE AGRONOMIA**

**MENANDES ALVES DE SOUZA NETO**

**Influência do Tratamento Enzimático na etapa de Fermentação da  
Produção de Cachaças**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Caliar

Goiânia – GO  
2020

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

Souza Neto, Menandes Alves de  
Influência do Tratamento Enzimático na etapa de Fermentação da  
Produção de Cachaças [manuscrito] / Menandes Alves de Souza Neto. -  
2020.  
CXC, 190 f.

Orientador: Prof. Luiz Artur Mendes Bataus; co-orientador Márcio  
Caliari.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Goiânia, 2020.  
Bibliografia. Apêndice.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas.

1. sacarificação enzimática. 2. pré-tratamento enzimático. 3.  
Streptomyces sp.. 4. Celulases. 5. Xilanases. I. Bataus, Luiz Artur  
Mendes, orient. II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

## ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 156/2020 da sessão de Defesa de Tese de **Menandes alves de Souza Neto** que confere o título de Doutor em **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, na área de concentração em Caracterização, aproveitamento e ou tratamento de resíduos agroindustriais.

Ao/s 30/09/2020 - trinta dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte, a partir das 14:00 horas, Exame ocorreu por vídeo-conferência - modo on-line, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "A Obtenção de extrato enzimático produzido por *Streptomyces* e suas Aplicações na produção e incorporação de bioativos em cachaça". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Luiz Artur Mendes Bataus** - ICB/UFMG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Flávio Alves da Silva** - EA/UFMG, membro titular interno; **Prof. Armando Garcia Rodriguez** - ICB/UFMG, membro titular externo, **Prof. Sinji Borges Ferreira Tauhata** ICB/UFMG, membro titular externo; **Prof.ª Carolina Cândida de Queiroz Brito-Cunha FACCIDADE/ Ap. Goiânia**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **Aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Luiz Artur Mendes Bataus** - ICB/UF, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 30/09/2020 - trinta dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte.

## TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Influência do Tratamento Enzimático na etapa de Fermentação da Produção de Cachaças



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cândida de Queiroz Brito Cunha, Usuário Externo**, em 14/10/2020, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Artur Mendes Bataus, Professor do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando Garcia Rodriguez, Professor do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sinji Borges Ferreira Tauhata, Chefe**, em 14/10/2020, às 20:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

15/10/2020

SEI/UFMG - 1614462 - Ata de Defesa de Tese



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Alves Da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 15/10/2020, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1614462** e o código CRC **0D43727A**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.039905/2020-01

SEI nº 1614462

Aos meus pais, Edna e Rodomarques,  
meus irmãos, Raquel e Rodrigo, minhas  
sobrinhas Mariana, Nayara e Maria  
Luiza por serem a minha amada  
família, exemplo e suporte.  
Aos meus filhos Lara, Meliza e Antônio  
Augusto, meus presentes de Deus.  
Aquela pessoa especial, que não me  
deixou desistir, minha amada esposa,  
amiga, parceira, Juliana.

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família, pelo apoio, confiança e compreensão.

A minha melhor colega de doutorado, minha esposa Juliana Aparecida Correia Bento por todo apoio, incentivo e auxílio tanto nas questões relacionada ao desenvolvimento deste trabalho quanto no cotidiano.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, pela orientação, amizade, confiança na minha capacidade, pelas cervejas na pamonharia e conselhos de um verdadeiro pai.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Márcio Caliari, por permitir a realização desta pesquisa auxiliando e orientando sempre.

Aos professores Elson Alves da Costa (XICO) e Armando Garcia Rodrigues por permitir o uso dos seus laboratórios e equipamentos imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

Ao professor Luciano Morais Liao e seu aluno Vinícius Silva pela oportunidade e auxílio na realização das análises de RMN.

Ao professor Ubirajara Coutinho da Universidade Federal de Uberlândia e minha colega de doutorado Lairy pela realização das análises de HPLC.

Ao professor Eduardo Vilas-Boas, à minha amiga Ana Lazara e a equipe do Laboratório de pós-colheita do departamento de ciência dos alimentos da Universidade Federal de Lavras que possibilitaram a realização das análises de HPLC para realização dos perfis de fenólicos.

Aos colegas de doutorado em especial Gisele Paixão e Karen Carvalho.

Aos Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos e Guilherme Rocha Lino de Souza.

A Ma. Aline Gama Rodrigues, pela amizade e imensa ajuda com as análises de atividade enzimática e na fermentação semissólida.

Ao PPGCTA e a todos os demais colegas que contribuíram durante o doutorado.

A Associação Educativa Evangélica em especial à Diretora da Faculdade Evangélica de Ceres Monalisa Salgado Bittar.

**Muito obrigado!**

*“A felicidade não vem da posse ou do domínio, mas de um coração sábio e dedicado.”*

*Chico Xavier*

## RESUMO

A cachaça é a bebida fermentada e destilada obtida a partir do caldo de cana, apresentando características sensoriais peculiares. Estima-se que, no Brasil, em 2015, foram produzidos 8 milhões de litros e a cachaça foi exportada para mais de 60 países, demonstrando a sua importância econômica. Apesar disso, o seu processo de produção apresenta baixo rendimento e ainda gera um grande volume de resíduos (bagaço e vinhaça). Assim, diversas estratégias devem ser avaliadas visando não apenas a otimização das fermentações, mas também a obtenção de cachaças com perfil químico distinto contribuindo para a incrementação de atributos sensoriais e agregando maior valor de mercado. Dentre as estratégias se destacam: o pré tratamento do caldo de cana; a utilização de microrganismos não convencionais e a incorporação de compostos bioativos. Com isso, este trabalho teve por objetivo a produção de enzimas lignolíticas por *Streptomyces thermocerradoensis* I3 em farelo de trigo e em farinhas de rizomas de dois vegetais extraídos do solo do Cerrado: *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica*, visando obter extrato enzimático para posterior aplicação no pré-tratamento do caldo de cana para obtenção de cachaças. Observou-se que dos meios testados o farelo de trigo se mostrou o melhor, e que os extratos produzidos foram capazes de promover a hidrólise das farinhas, o que promoveu o aumento da concentração de açúcares redutores e compostos fenólicos totais, sugerindo o uso desse extrato para sacarificação em farinhas, promovendo maior acesso a estes compostos. Na segunda etapa do estudo, o objetivo foi a utilização do enzimático obtido do *Streptomyces* sp. I7 no pré tratamento do caldo de cana, para posterior fermentação deste caldo utilizando três microrganismos diferentes: *Saccharomyces cerevisiae*; levedura para produção de cerveja Belgian Ale (M27) e por último, um microrganismo isolado de caldo de cana a partir da fermentação espontânea. Verificou-se que independente do microrganismo utilizado na etapa de fermentação, o pré tratamento com o extrato enzimático promoveu aumento da produção de etanol. Além disso, o pré tratamento enzimático gerou cachaças com perfis químicos distintos comprovados por análises de ressonância magnética nuclear. Por fim, foi avaliada a utilização do extrato enzimático associada ao ultrassom de baixa frequência para incorporação de compostos fenólicos extraídos do *Zingiber officinale* Roscoe em cachaça adquirida em mercado local. Foi constatado que o método empregado favoreceu a extração de açúcares redutores e compostos fenólicos, com destaque para o ácido gálico e caféico. O consumo de bebidas alcólicas com maior teor de compostos fenólicos quando comparada ao consumo de bebidas sem estes componentes poderia trazer benefícios à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Sacarificação enzimática; Pré tratamento enzimático; *Streptomyces* sp.; Celulases; Xilanases

## ABSTRACT

Cachaça is the fermented and distilled beverage obtained from sugarcane juice, with peculiar sensory characteristics. It is estimated that in Brazil, in 2015, 8 million liters were produced, and cachaça was exported to more than 60 countries, showing its economic importance. Despite this, its production process has a low yield and still generates a large volume of waste (bagasse and stillage). Thus, several strategies must be evaluated aiming not only to optimize fermentation but also to obtain cachaças with a different chemical profile, contributing to the increase of sensory attributes and adding greater market value. Among the strategies, the following stand out: pre-treatment of sugarcane juice; the use of non-conventional microorganisms, and the incorporation of bioactive compounds. Thus, this work aimed to produce ligninolytic enzymes by *Streptomyces thermocerradoensis* I3 in wheat bran and rhizome flours from two vegetables extracted from the Cerrado soil: *Cochlospermum regium* and *Jatropha elliptica*, to obtain enzymatic extract for later application in the pre-treatment of sugarcane juice to obtain cachaça. It was observed that the wheat bran proved to be the best of the tested medium and that the extracts produced were able to promote the hydrolysis of the flours, which promoted an increase in the concentration of reducing sugars and total phenolic compounds, suggesting the use of this extract for saccharification in flours, promoting greater access to these compounds. In the second stage of the study, the objective was to use the enzyme obtained from *Streptomyces* sp. I7 in the pre-treatment of the sugarcane juice, for subsequent fermentation of this juice using three different microorganisms: *Saccharomyces cerevisiae*; yeast to produce Belgian Ale beer (M27), and finally a microorganism isolated from sugarcane juice from spontaneous fermentation. It was found that regardless of the microorganism used in the fermentation step, the pre-treatment with the enzymatic extract promoted an increase in ethanol production. Also, the enzymatic pretreatment generated cachaças with distinct chemical profiles proven by nuclear magnetic resonance analysis. Finally, the use of enzymatic extract associated with low-frequency ultrasound for the incorporation of phenolic compounds extracted from *Zingiber officinale* Roscoe in cachaça acquired in the local market was evaluated. It was found that the method employed favored the extraction of reducing sugars and phenolic compounds, with emphasis on gallic and caffeic acids. The consumption of alcoholic beverages with a higher content of phenolic compounds, when compared to the consumption of beverages without these components, could bring benefits to the health of consumers

Keywords: Enzymatic saccharification; Enzymatic pretreatment; *Streptomyces* sp.; Cellulases; Xylanases

## SUMÁRIO

-----	iv
AGRADECIMENTOS -----	viii
EPÍGRAFE-----	ix
RESUMO -----	x
ABSTRACT -----	xi
SUMÁRIO -----	12
CAPÍTULO 1 -----	16
1.INTRODUÇÃO-----	16
2.REVISÃO DA LITERATURA-----	18
2.1 Cachaça, composição química e contaminantes -----	18
2.2 Enzimas e suas aplicações-----	23
2.3 Celulases-----	24
2.4 Xilanases-----	26
2.5 Fermentação semissólida (FSS) -----	27
2.6 <i>Streptomyces</i> sp-----	28
2.7 Métodos de extração de compostos fenólicos e ultrassom -----	29
2.8 Gengibre -----	31
3 OBJETIVOS-----	33
3.1 Objetivo geral -----	33
3.2 Objetivos específicos -----	33
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	34
CAPÍTULO 2-----	47

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR <i>STREPTOMYCES</i> <i>THERMOCERRADOENSIS</i> I3 E O ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DAS FARINHAS DE ALGODÃOZINHO DO CAMPO ( <i>COCHLOSPERMUM REGIUM</i> ) E BATATA DE TEIÚ ( <i>JATROPHA ELLIPTICA</i> ).-----	47
RESUMO -----	47
INTRODUÇÃO-----	48
MATERIAL E MÉTODOS -----	51
RESULTADO E DISCUSSÃO-----	54
CONCLUSÃO-----	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	64
CAPÍTULO 3-----	72
O IMPACTO DO PRÉ TRATAMENTO COM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP I7 E NA FERMENTAÇÃO E NO PERFIL QUÍMICO DA CACHAÇA -----	72
Resumo -----	73
1. Introdução-----	73
2. Material e metodo-----	76
3. Resultados e discussão -----	80
4. Conclusão -----	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	93
CAPÍTULO 4-----	102
ALTERAÇÕES NA FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE CACHAÇA PRODUZIDA COM PRÉ TRATAMENTO COM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP I7 E LEVEDURA PARA CERVEJA BELGIAN ALE -----	102

Resumo -----	103
Introdução -----	103
Material e métodos-----	107
Resultados e discussão -----	110
Conclusão -----	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	120
CAPÍTULO 5-----	130
O EFEITO DA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DO CALDO DE CANA COM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO ISOLADO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. I7 NO PERFIL QUÍMICO DA CACHAÇA ARTESANAL. -----	130
Resumo: -----	130
INTRODUÇÃO -----	131
MATERIAL E MÉTODOS -----	134
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	138
CONCLUSÃO-----	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	148
CAPÍTULO 6-----	157
APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO DO <i>STREPTOMYCES</i> SP I7 E ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>ZENGBER</i> <i>OFFICINALE</i> ROSCOE -----	157
Introdução -----	158
Material e Métodos -----	161
Resultados e Discussão-----	165
Conclusão -----	177
Referências Bibliográficas -----	178

Apêndice A -----	186
Apêndice B-----	187
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	188

## CAPÍTULO 1

### 1.INTRODUÇÃO

Anteriormente considerada como um produto de baixo valor e associada ao consumo pela população com menor poder aquisitivo, a cachaça apresenta enorme potencial econômico e inserção no mercado externo, sendo, em alguns casos, uma bebida que sinaliza um alto *status* social ao consumidor (BRAGA; KIYOTANI, 2015). A cachaça é exportada para mais de 60 países, distribuídos entre todos os continentes, e movimentou , em 2015, US\$ 13,32 milhões com a comercialização de 7,77 milhões de litros (PAIVA et al., 2017).

Cachaça é a denominação típica e exclusiva do destilado produzido à partir da fermentação do caldo de cana produzidos, com teor alcóolico variando entre 38 a 48% a 20 °C, com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2003).

A cachaça apresenta em uma matriz etanol/água uma grande diversidade de outros compostos minoritários conhecidos como congêneres ou compostos secundários, podendo ainda apresentar compostos contaminantes. A produção destes compostos está diretamente relacionada com as etapas envolvidas no processo de produção de cachaça e influenciam diretamente nas características físico-químicas, sensoriais e nos atributos de qualidade. Dentre estas etapas podemos citar: a fermentação, a destilação e o envelhecimento Alguns compostos secundários, como álcoois superiores, ésteres etílicos, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos, são responsáveis por seu aroma e sabor distinto (AMORIM; SCHWAN; DUARTE, 2016; GRANATO et al., 2014).

Apesar de congêneres terem um papel importante nas características químico-sensoriais da bebida, em altas concentrações, estão relacionados a odor e sabor desagradáveis, podendo gerar de intoxicação. Os limites para a presença destes compostos são estabelecidos pela

Instrução Normativa nº 13/2005 (BRASIL, 2003) e Instrução Normativa nº 28/2014(BRASIL, 2014).

Visando a redução da produção de contaminantes e congêneres com impacto negativo, a harmonização de congêneres presentes formando o “bouquet” aromático associado à maior qualidade do produto ou ainda, o aumento do rendimento do processo fermentativo foram propostos alguns tipos de tratamento do caldo de cana como: o aquecimento; aquecimento combinado à adição de hidróxido de sódio; tratamento por micro-ondas; aquecimento associado à fosfatação e sulfitação (ALVES et al., 2018; DOS SANTOS NUNES; FINZER, 2019; RIBEIRO, 2016; RODRIGUES, 2017; SILVA; ASSUNÇÃO; SOUSA FILHO, 2018). Porém, não foram encontrado na literatura relatos da utilização de extratos enzimáticos no pré tratamento do caldo de cana visando a produção de cachaça.

A fim de promover processos industriais sustentáveis e economicamente competitivos em relação aos custos de produção há uma demanda crescente pela indentificação de novos microrganismos capazes de produzir enzimas com características como maior termoestabilidade e capacidade de atuar em condições diversas de catálise (amplas faixas de pH), com menor exigência quanto ao armazenamento e ainda com menor custo de produção (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; WU et al., 2019).

Muitos microrganismos tem sido isolados em material lignocelulósico e resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de enzimas (COUTURIER et al., 2016; GUPTA et al., 2016). Dentre estes microorganismos, tem destaque o gênero *Streptomyces* por serem produtores de enzimas extraceulares como celulasas, xilanases, quitinases e outras. Estas enzimas têm demonstrado um papel importante biodegradação de resíduos lignocelulósicos e promovem a substituição de produtos químicos em formulações na indústria de panificação vinhos e bioetanol (KUMAR et al., 2020; MIRA; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: avaliar a produção de enzimas lignolíticas em meios não convencionais e sua aplicação na hidrólise de farinhas de rizomas de plantas do Cerrado; a utilização de extratos enzimáticos no pré tratamento do caldo de cana para a produção de cachaças, utilizando microorganismos diversos, avaliar o perfil químico das cachaças produzidas e sua aplicação em processos biotecnológicos associada ao ultrassom de baixa frequência para promover a incorporação de compostos fenólicos do gengibre.

## **2.REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Cachaça, composição química e contaminantes**

A Instrução Normativa nº 13/2005 (BRASIL, 2003) e Instrução Normativa nº 28/2014 (BRASIL, 2014) têm como objetivo principal padronizar a composição química da cachaça e aguardente e desta forma reduzir o risco de contaminação dos consumidores ao estabelecer os limites de componentes voláteis não alcoólicos, contaminantes orgânicos e inorgânicos que podem estar presentes em cachaças.

São classificados como congêneres os componentes voláteis "não álcool" como o ácido acético e outros ácidos que representam a acidez volátil; o acetaldeído e outros aldeídos, acetato de etila e outros ésteres; outros álcoois conhecidos como álcoois superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isoamílicos) e furfural/hidrometilfurfural.

Durante a sua produção, diversos fatores podem interferir na qualidade da cachaça. Dentre estes fatores destacamos: o microrganismo utilizado, as condições do processo fermentativo e também o processo de destilação (SERAFIM; LANÇAS, 2019). Durante a destilação, os produtos são divididos em três fases denominadas: cabeça, coração e cauda. A fração “cabeça”, obtida na fase inicial da destilação, contém substâncias mais voláteis que o

etanol (metanol, certos aldeídos e ésteres), assim como em outros compostos menos voláteis, mas que se encontram envolvidos por moléculas de água e etanol, perdendo assim o seu ponto de ebulição característico (álcoois superiores). A segunda fração, denominada coração é o corte principal do destilado, é concentrado em etanol e corresponde ao produto destinado ao consumo. A última fração, denominada cauda, geralmente usada para recuperar o etanol residual no vinho, apresenta grande quantidade de ésteres de ácidos graxos, ácido acético e furfural (RUSSELL; BAMFORTH; STEWART, 2014; SCANAVINI; CERIANI; MEIRELLES, 2012).

A acidez volátil elevada é uma consequência da contaminação bacteriana durante o processo de produção. A definição do ponto de corte ideal da fração "cauda" do destilado contribui para reduzir a acidez volátil (ALCARDE et al., 2010; BRANCO DE MIRANDA et al., 2008). Os ácidos orgânicos voláteis contribuem para o aroma das bebidas destiladas, devido ao seu aroma característico e são fixadores de vários compostos aromáticos, além de conferir corpo às bebidas destiladas (LÉAUTÉ, 1990).

Dentre os possíveis ésteres presentes, os ésteres etílicos de ácidos graxos e acetatos são considerados importantes pois contribuem para a formação do "bouquet". O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila que incorpora um aroma agradável de frutas; no entanto, em grandes quantidades, confere à cachaça um sabor indesejável e enjoativo (CANUTO, 2013). Ésteres são sintetizados através de reações enzimáticas da levedura durante a fermentação e destilados junto com o etanol. Estas ocorrem, pois, o etanol pode reagir com ácidos derivados do ácido pirúvico, como ácido láctico e acético, bem como ácidos orgânicos de cadeias curtas (butírico, capríco, caprílico, cáprico e láurico). Alguns dos fatores que influenciam a formação de ésteres são: tipo e quantidade de levedura, a temperatura de fermentação, a aeração, a agitação e a qualidade do mosto (JANZANTTI, 2004)

O Acetaldeído e outros aldeídos (fórmico, butírico, isobutírico, valérico, e capróico) têm sido encontrados nas bebidas destiladas, geralmente presentes nas frações mais voláteis, sendo o acetaldeído usualmente o composto predominante possuindo odor pungente e aumentando o sabor picante das bebidas (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991). O acetaldeído é formado durante a fermentação, pela redução do etanol, e apresenta efeitos tóxicos associados a sintomas como náuseas, sudorese, pulso rápido e dor de cabeça e vômitos. É também conhecido como composto cancerígeno (PFLAUM et al., 2016). Acetaldeído e outros aldeídos alifáticos de cadeia curta têm odor pungente, ranço e gorduroso, o que pode aumentar o sabor das bebidas destiladas. Em geral, aldeídos com cadeias menores do que oito átomos de carbono têm odores penetrantes, geralmente enjoados, que são considerados indesejáveis. Os aldeídos de cadeia longa são caracterizados por aroma agradável (ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2011; LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2012).

Em bebidas alcoólicas o carbamato de etila resulta principalmente da reação de etanol e compostos contendo nitrogênio, como uréia, carbamilo fosfato e cianeto (CHEN et al., 2017). Estes compostos precursores do carbamato de etila são comumente gerados pelo metabolismo da arginina por *Saccharomyces cerevisiae* ou pela presença de outros microorganismos durante a fermentação como por exemplo, bactérias ácido lácticas (NÓBREGA et al., 2015). Trata-se de um composto carcinogênico e genotóxicos em muitas espécies, incluindo, ratos, hamsters, macacos e humanos (VÁZQUEZ et al., 2017).

Álcoois superiores ou óleo fusel, possuem mais de dois átomos de carbono e são expressos pela soma dos álcoois 1-propanol, isobutanol e isoamílicos. Sua biossíntese depende da cepa utilizada na fermentação, da atividade da levedura, do nível de contaminação bacteriana, das condições de fermentação como o pH, a temperatura, o teor compostos nitrogenados e teor alcoólico do vinho, do intervalo de tempo entre a fermentação e destilação e do tipo de destilação empregada (SOUZA et al., 2013). Contribuem para a formação do

"bouquet" aromático, destacando os álcoois amílico e propílico e seus isômeros, porém o excesso de álcoois superiores interferem negativamente no valor comercial e na qualidade do destilado (CARDOSO, 2006).

O furfural e o hidroximetilfurfural são aldeídos aromáticos resultantes da decomposição química de carboidratos, podendo resultar da pirólise da folhagem durante a colheita o que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial das pentoses leva à formação de furfural (2-furfuraldeído) e a desidratação das hexoses à hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furfuraldeído). O furfural também pode ser originado durante o processo de destilação pela pirogenação de matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. Nas aguardentes envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), provenientes da madeira usada na construção de tonéis (CRUZ; CANAS; BELCHIOR, 2012; YOKOYA, 1995). O Furfural apresenta toxicidade para humanos induzindo dor, dor de garganta, diarreia, vômitos e dor de cabeça (COLDEA et al., 2011; J ROHSENOW; HOWLAND, 2010).

Segundo BRASIL (2003) os contaminantes em cachaça são divididos em dois grupos: Contaminantes Orgânicos e inorgânicos. Os contaminantes orgânicos são constituídos por: álcool metílico; carbamato de etila; acroleína (2-propenal); Álcool sec-butílico (2-butanol); álcool n-butílico (1-butanol). Dentre os contaminantes inorgânicos destacamos o Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Arsênio (As).

O metanol é o segundo composto encontrado em destilados de frutas após o etanol. O metanol é um álcool indesejável na bebida, devido a sua alta toxidez. Origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação (ZACARONI et al., 2011). Devido aos numerosos surtos de intoxicação alcoólica, às vezes levando consumidores à óbito, os níveis de metanol em destilados se tornaram uma preocupação de saúde pública. Os sintomas comuns de intoxicação aguda por metanol são aqueles

relacionados à ressaca - dor de cabeça, vertigem e vômitos, mas também podem causar dor abdominal severa, visão turva ou dor nas costas. A metabolização do metanol gera ainda produtos tóxicos como o formaldeído e ácido fórmico (J ROHSENOW; HOWLAND, 2010).

A acroleína (2-propenal), é uma substância carcinogênica oriunda do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana. Apresenta elevada toxicidade por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta, podendo associar sua presença ao aroma de pimenta das bebidas (ZACARONI et al., 2011).

A contaminação por cobre, geralmente está relacionada com o uso deste material para a construção dos alambiques. Durante o processo de destilação da bebida, os vapores ácidos arrastam o carbonato de cobre básico  $[\text{Cu}(\text{OH})_2\text{CO}_3]$ , formado nas paredes internas dos alambiques, assim levando à contaminação do produto. Outro fator que pode contribuir para a contaminação pelo metal é o corte incorreto das frações (DUARTE et al., 2017).

O chumbo é conhecido por causar toxicidade e envenenamento em indivíduos expostos através do consumo de bebidas. A intoxicação por chumbo apresenta diversos sintomas como a anemia, convulsão, distúrbios do sistema nervoso central, anorexia, dor de cabeça, mal-estar, diarreia, paralisia de chumbo, encefalopatia, insônia, hipertensão arterial, anemia e fraqueza nos dedos, pulsos ou tornozelos, perda de cabelo, fibrose pulmonar e alergias cutâneas (IZAH; CHAKRABARTY; SRIVASTAV, 2016; IZAH et al., 2016; TECH, 2013). A presença de chumbo em bebidas destiladas está relacionada com a qualidade da água utilizada que pode conter pesticidas utilizados na agricultura que permaneceram na água. Quando se faz necessário ajustar o teor alcoólico de bebidas, geralmente nenhuma análise da água utilizada é realizada,

e como consequência, a água pode se tornar uma fonte de contaminação (BONIC<sup>Ć</sup> et al., 2013; COLDEA; MUDURA; SOCACIU, 2017).

Os compostos inorgânicos de arsênio podem causar câncer de o pulmão, a pele e a bexiga urinária. Foi observada associação entre a exposição ao arsênico e compostos inorgânicos de arsênio e câncer de fígado, rim e próstata. A longo prazo, exposição a doses baixas a compostos inorgânicos de arsênio aumenta a mutagênese por indução rápida de dano oxidativo do DNA e inibição do reparo do DNA, como bem como mudanças mais lentas nos padrões de metilação do DNA, aneuploidia e amplificação de genes, que levam a alterações expressão (HUMANS, 2012).

## **2.2 Enzimas e suas aplicações**

As enzimas são catalisadores que facilitam a conversão de substratos em produtos. A hidrólise enzimática ou biocatálise é considerado um processo ecologicamente viável ao permitir a redução do uso de produtos químicos, oferecendo muitos benefícios ambientais e econômicos em uma variedade de ambientes industriais (ALEXANDER et al., 2017; SHELDON, 2017).

A produção de alimentos sempre utilizou microorganismos e enzimas. Exemplos típicos incluem a fabricação de cerveja, pão, queijo ou vinho, onde as enzimas foram utilizadas mesmo que sem nenhum conhecimento sobre seus mecanismos por milhares de anos. Atualmente, as enzimas, obtidas por fermentação microbiana ou extraídas de plantas ou animais, são utilizadas para produção ou processamento de alimentos, promovendo a melhora destes ou gerando produtos inovadores ou aprimorados . Entretanto, a utilização de enzimas ainda esbarra no seu alto custo de produção e isolamento. Atualmente, o segmento de alimentos e bebidas domina o

mercado de enzimas industriais e deve atingir um valor de US \$ 2,3 bilhões até 2020 (ADRIO; DEMAIN, 2014; CHERRY; FIDANTSEF, 2003; SINGH et al., 2016)

Dentre as enzimas com ampla aplicação industrial destacam-se as celulases e as xilanases. Estas são enzimas de grande importância em bioprocessos industriais, principalmente na produção de papel, têxtil, e indústrias de ração animal. Estas enzimas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, principalmente, panificação, cervejaria, vinícola e produção de suco de frutas e vegetais (LI; CHANG; LIU, 2018).

As celulases e xilanases, ao degradarem a celulose e lignina, aumentariam a concentração de açúcares redutores como a glicose e xilose sendo estes açúcares utilizados por *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol (ABO-STATE et al., 2013). MOLAVERDI et al. (2019) demonstraram maior eficiência da fermentação alcoólica e concentração de etanol ao realizar o pré-tratamento com celulases e xilanases.

### **2.3 Celulases**

As celulases são enzimas que irão converter os  $\beta$  1, 4-D-glucanos presentes na celulose para produzir glicose, celobiose e oligossacarídeos. Este processo envolve um complexo enzimático composto por endoglucanases (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.4), exo-glucanase (1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolase, EC 3.2 .1.91) e  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -D-glucósido glucanoidrolase, cellobiase, EC 3.2.1.21) (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

As celulases apresentam diversas aplicações industriais, como por exemplo na indústria de detergentes, indústria têxtil, indústria de processamento de papel, indústria de ração animal e indústria de suco de frutas. Embora existam várias aplicações industriais potenciais de celulases a sua utilização tem sido empregada na degradação de material lignocelulósico para a produção de bioteanol (PATEL et al., 2019; YUE; YUAN; JIAN, 2017).

Celulases termofílicas são desejáveis em tais aplicações, uma vez que sua atividade em temperaturas mais altas oferecem vários benefícios, como tempos de hidrólise reduzidos, menor risco de contaminação, facilitando a recuperação de substâncias voláteis como etanol e menores custos de resfriamento após pré-tratamento térmico (ABDEL-BANAT et al., 2010; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007; VAISHNAV et al., 2018; VIKARI et al., 2007)

A ação sinérgica das endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases é necessária para a despolimerização da celulose em açúcares fermentescíveis favorecendo a fermentação alcoólica (SHARMA et al., 2016).

Na indústria de sucos, as celulases são aplicadas em associação com outras enzimas para aumentar o desempenho e o rendimento do processo, melhorando os métodos de extração, clarificação e estabilização de sucos. Celulases também foram utilizadas para reduzir a viscosidade do néctar e do purê de frutas como damasco, manga, ameixa, mamão, pêra e pêssego e são utilizados para a extração de flavonóides de flores e sementes (RAVEENDRAN et al., 2018). As celulases demonstraram a capacidade de utilização na extração de compostos fenólicos de bagaço de uva (KABIR; SULTANA; KURNIANTA, 2015). O uso de betaglicosidades em combinação com pectinase promoveram alterações na estrutura, sabor e o aroma das frutas e legumes (HUMPF; SCHREIER, 1991).

Na produção de vinho, as celulases foram usadas em combinação com outras enzimas para aumentar o rendimento da fermentação e o teor de antocianinas (BAMFORTH, 2009). Dentre as vantagens do uso de celulases destaca-se a maceração aprimorada, melhor desenvolvimento da cor, clarificação do mosto e, finalmente, estabilidade e qualidade do vinho (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998). O aroma dos vinhos pode ser melhorado pelas  $\beta$ -glucosidases através de modificações de precursores glicosilados e ainda podem reduzir significativamente a viscosidade do mosto (OKSANEN; AHVENAINEN; HOME, 1985).

## 2.4 Xilanases

As xilanases são hidrolases que promovem a despolimerização de moléculas da xilana, presentes na hemicelulose que em associação com a celulose formam a parede celular vegetal. Por isto tem despertado grande interesse comercial (UDAY et al., 2016).

A hemicelulose é um hetero-polímero ramificado formado por pentoses (d-xilose e d-arabinose) e hexoses (d-manose, d-glicose e d-galactose), onde a xilose é mais abundante. A hemicelulose é a segunda biomassa renovável mais abundante na natureza depois da celulose, responsável por 25 a 35% da biomassa lignocelulósica (SAHA, 2003).

As xilanases encontram aplicações em uma ampla gama de processos industriais. Elas são usadas principalmente nas indústrias de alimentos, rações, celulose e papel (YEGIN, 2017).

A utilização de xilanases promoveu alterações nas propriedades reológicas da massa de pão produzidas após a hidrólise enzimática de polissacarídeos não amiláceos (LIU et al., 2017; MARTÍNEZ-ANAYA; JIMÉNEZ, 1997). A utilização de xilanase produzida por expressão heteróloga em *Pichia pastoris* promoveu a diminuição na firmeza, rigidez e consistência em pão. Promoveu ainda aumento no volume específico e redução teor de açúcares livres (DE QUEIROZ BRITO CUNHA et al., 2018).

A xilanase é usada para melhorar a textura, o sabor e a palatabilidade dos biscoitos. A utilização de xilanases associadas a outras enzimas promovem a melhoria no rendimento durante a produção de sucos e o aumento da recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, pigmentos, etc. . Nas indústrias de fabricação de cerveja, as xilanases são usadas para hidrolisar a parede celular da cevada. A hidrólise leva à liberação de arabinoxilanos e oligossacarídeos inferiores, o que reduz a aparência enlameada e a viscosidade da cerveja (BALA; SINGH, 2017; DERVILLY, 2002; PASHA; ANURADHA; SUBBARAO, 2013; POLIZELI et al., 2005).

## **2.5 Fermentação semissólida (FSS)**

A FSS pode ser definida como um processo de cultivo de microrganismos na presença de uma fase líquida com máxima concentração de substrato em suportes na ausência de movimento. Na FSS há ausência ou quase ausência de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas (PANDEY, 2003; TRY et al., 2018).

O uso de fermentação semissólida tem sido utilizada para a produção de enzimas celulolíticas através do reaproveitamento de resíduos agroindustriais, fibras ou outros materiais apresentando baixos custos e redução de impacto ambiental pela redução do consumo de energia para produção, geração de águas residuais, redução da contaminação bacteriana, maior facilidade para recuperação de produtos e menor investimento de capital (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Durante a FSS, o conteúdo de umidade nas fibras desempenha um papel fundamental, uma vez que afeta diretamente o processo de fermentação. Sabe-se que um maior teor de umidade pode preencher o vazio do substrato, limitando assim a transferência de massa gasosa dos microrganismos. No caso de menor teor de umidade, o crescimento do microrganismo também é limitado (SUKUMARAN et al., 2009).

Apesar da importância da umidade durante o processo FSS, outros fatores, como temperatura, pH, o tipo de biomassa e características como diâmetro de partícula, área de superfície e vazio de partículas também podem ser importantes para uma fermentação produtiva. Portanto, têm sido utilizado diversos materiais como substrato para a fermentação como o bagaço de cana, farelo de trigo, casca de coco e outros (GONÇALVES et al., 2014; GUILHERME et al., 2015) .

## 2.6 *Streptomyces* sp

A família *Streptomycetaceae* engloba três gêneros, *Streptomyces spp*, *Kitasatospora* e *Streptoverticillium*, dentro da família o *Streptomyces* é o gênero representado por um grande número de espécies produtoras de antibióticos e enzimas extracelulares moléculas com atividade antimicrobiana, antitumoral e imunossupressora (BENTLEY et al., 2002; SINGH; CHHATPAR, 2010).

As bactérias *Streptomyces* são abundantes no solo, onde interagem com uma grande diversidade de outros microorganismos. Os *Streptomyces* são conhecidos por conferir ao solo odor característico através da síntese de composto volátil: a geosmina . Além da geosmina, as espécies de *Streptomyces* produzem uma infinidade de metabólitos especializados, com funções que variam desde a aquisição de nutrientes (por exemplo, sideróforos para absorção de ferro),enzimas e a inibição do crescimento de organismos concorrentes como antibióticos e compostos antifúngicos (JONES; ELLIOT, 2017)

Streptomicetos são bactérias aeróbias estritas que apresentam como característica o crescimento macroscópico em colônias arredondadas, formação de grumos quando cultivado em meio de cultura líquido. Possuem filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 µm, formando micélios. A reprodução dos *Streptomyces* sp. Se dá através de fragmentos de hifas ou por produção de esporos feita em áreas especializadas do micélio (LECHEVALIER, 1989).

Os *Streptomyces spp*. Apresentam como principal habitat o solo, podendo ainda ser encontrados em mares, em associação com líquens, em tecidos animais e vegetais. A maioria dos *Streptomyces* tem crescimento em pH neutro ou levemente básico, no entanto, há relatos de crescimento de algumas cepas de *Streptomyces* sp. em pH ácido (3,5) ou alcalino (pH 8 a 11,5) (GONZÁLEZ et al., 2005; ZHI-QI et al., 2006).

Dentre as enzimas produzidas por *Streptomyces* sp. destacam-se as hidrolases com capacidade de degradação de polímeros, incluindo hemicelulose, pectina, queratina e quitina. Alguns streptomicetos atuam sobre a lignina e a celulose promovendo a degradação destes componentes presentes na parede celular das plantas (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

O *Streptomyces termocerradoensis* I3 apresentou grande capacidade de produção de celulases e xilanases. Estudos de BRITO-CUNHA et al. (2015) verificaram a produção de celulases e xilanases termoestáveis e atuando em amplas faixas de pH.

## **2.7 Métodos de extração de compostos fenólicos e ultrassom**

Os polifenóis representam um grupo de pelo menos 10.000 compostos diferentes que têm como característica química a presença de um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila ligados. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário de vegetais e são abundantes na maioria das frutas e legumes. Nos vegetais, os polifenóis são geralmente envolvidos na defesa contra diferentes tipos de estresse, oferecendo proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, luz UV, patógenos, parasitas e predadores. Além disso, eles contribuem substancialmente para as propriedades organolépticas de vegetais, alimentos e cosméticos. Atualmente, diversos estudos tem demonstrado a sua importância para a saúde através de suas atividades antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios e outros efeitos biológicos prevenindo várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares e câncer (DAI; MUMPER, 2010; LI et al., 2014).

Compostos fenólicos estão glicosidicamente ligados a microfibrilas celulósicas e hemicelulósicas e não lixiviam durante a extração simples de solvente ou em ebulição água, sendo chamados de fenólicos insolúveis (ACOSTA-ESTRADA; GUTIERREZ-URIBE; SERNA-SALDIVAR, 2014). Por este motivo, os métodos convencionais de extração (extração líquido-líquido e líquido-sólido) apresentam baixo rendimento na extração, baixa seletividade

para compostos específicos. Outras desvantagens são o uso de solventes potencialmente tóxicos ou ainda a presença destes no produto final podendo ser necessárias etapas adicionais para a sua extração (BELWAL et al., 2018).

Diante do exposto, diversas técnicas têm sido empregadas visando a redução dos problemas apontados pela extração convencional. Microondas são utilizadas desde 1950 para a extração de compostos presentes no lúpulo para a produção de cerveja (SPECHT; SCHULTEIS, 1957). A aplicação de pulsos elétricos é uma tecnologia não térmica baseada na promoção da perda de seletividade de transporte de influxo e efluxo, aumentando a permeabilidade e promovendo melhor transferência de massa. Sua utilização aumentou a extração de licopeno em 68% em comparação com amostras não tratadas (GACHOVSKA et al., 2013; MAHNIC-KALAMIZA; VOROBIEV; MIKLAVCIC, 2014).

O ultrassom é definido como uma onda mecânica acústica que se propaga em um meio e possuem frequência acima do nível audível pelo ouvido humano (20 Hz a 20 kHz). São divididas em dois grandes grupos, dependendo da sua frequência e intensidade: Alta frequência (2 a 20MHz) e baixa intensidade ( $<1\text{Wcm}^{-2}$ ) e baixa frequência (20 a 100kHz) e maiores níveis de intensidade (10 a  $1000\text{Wcm}^{-2}$ )(CÁRCEL et al., 2012). O primeiro grupo é composto ultrassons de baixa energia, que não são destrutivos tendo emprego, na área de ciência de alimentos em técnicas analíticas para promover informações sobre propriedades físico-químicas, composição, estrutura e estado físico de alimentos. O segundo grupo com energia suficiente para romper ligações intermoleculares dá origem ao fenômeno da cavitação capaz de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (ALVES et al., 2013; OLIVEIRA; ASCHERI; CARVALHO, 2016).

O uso de ondas de baixa frequência e alta intensidade geram um fenômeno denominado cavitação. O fenômeno de cavitação leva a altas forças de cisalhamento na matriz. A implosão de bolhas de cavitação na superfície de um produto resulta em micro jatos que geram vários

efeitos, tais como a descamação superficial, a erosão e a degradação das partículas. Além disso, a implosão de bolhas de cavitação em um meio líquido leva a macro turbulências e a uma micro mistura (CHEMAT et al., 2017).

Ao ser utilizado na indústria de alimentos, o ultrassom pode tanto substituir algumas técnicas tradicionais de processamento (corte, emulsificação, homogeneização, esterilização, pasteurização e degaseificação) quanto para aperfeiçoar ou acelerar técnicas convencionais de extração, salga, oxidação, filtração, secagem ou desidratação (ASHOKKUMAR, 2015; CHEMAT et al., 2017).

Os benefícios do uso de ultrassom incluem o aumento na vida útil das bebidas através da redução de microrganismos contaminantes. Benefícios nutricionais devido ao aumento dos teores de antioxidantes e compostos bioativos como flavonóides e flavonóis (AADIL et al., 2013; BEVILACQUA et al., 2016; CRUZ-CANSINO NDEL et al., 2016; JIANG et al., 2015).

A utilização de métodos combinados de extração têm demonstrado grande potencial de utilização. A combinação de métodos físicos (mecânico) e químico/enzimático (não mecânico) ao favorecer o rompimento celular por mecanismos distintos e resultam em rendimentos mais altos com maior seletividade em relação aos compostos alvo (TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2020).

## **2.8 Gengibre**

O Gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), também pertence à família *Zingiberaceae*, é uma planta comestível e medicinal, tem sido cultivada em várias áreas tropicais e subtropicais do sul da Ásia, incluindo a China, que é um dos principais produtores (PANG et al., 2017). O gengibre é amplamente utilizado em alimentos e bebidas por sua característica pungência e sabor picante e em medicamentos chineses, ayurvédicos, unani e remédios caseiros desde a

antiguidade para muitas doenças, incluindo dor, inflamação e distúrbios gastrointestinais (SRINIVASAN, 2017).

Compostos fenólicos não voláteis, como o gingerol, são bem conhecidos para dar ao gengibre sabor pungente, enquanto o seu aroma característico é proporcionado por óleos essenciais descritos como picantes (ARCTANDER, 2017).

Dentre as propriedades farmacológicas do gengibre destaca-se a ação anti-inflamatória mediada pela inibição da 5-lipoxigenase, o que reduz a biossíntese de prostaglandinas, leucotrienos e citocinas pró-inflamatórias tais como Interleucina (IL) -1, IL-8; fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e fator nuclear  $\kappa$ B. Assim, demonstrou-se a redução de citocinas pró inflamatórias em pacientes com osteoartrite (KUBRA; RAO, 2012; MOZAFFARI-KHOSRAVI et al., 2016). A atividade antioxidante do extrato de *Z. officinale* demonstrou capacidade *in vitro* de inibir radicais hidroxila e inibir a peroxidação lipídica (MANCINI et al., 2017). A atividade antioxidante foi confirmada em estudos com animais através da ação da glutatona sérica e outras enzimas responsáveis pela detoxificação (MASHHADI et al., 2013).

Efeitos semelhantes foram atribuídos a outros bioativos presentes no gengibre como o 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol(SI et al., 2018).

Diante de consumidores cada vez mais conscientes do vínculo entre dieta e saúde tem se a necessidade da busca de ingredientes naturais como suplementos alimentares e conservantes. Desta forma, o consumo de alimentos com alto teor de fenólicos e conseqüentemente propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias acima mencionadas pode contribuir preventivamente em uma infinidade de doenças crônico-degenerativas incluindo câncer, distúrbios cardiovasculares e diabetes.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção e a utilização de enzimas produzidas por *Streptomyces thermocerradoensis* I3 e *Streptomyces* sp. I7 em diferentes processos fermentativos, seus impactos no perfil químico dos destilados produzidos e ainda a sua utilização como ferramenta para favorecer a incorporação de compostos fenólicos do gengibre (*Zengiber officinale*) em cachaça.

### 3.2 Objetivos específicos

- Promover a fermentação semissólida para a produção dos extratos enzimáticos em diversos pHs.
- Avaliar a utilização das farinhas de *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica* como meios para a fermentação semissólida e a produção de enzimas.
- Extrair e determinar as atividades celulolítica e xilanolítica dos extratos obtidos;
- Identificar o pH ideal para a produção de celulases e xilanases;
- Testar as farinhas de *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica* como meios produtores de enzimas lignolíticas:
- Avaliar o potencial de hidrólise dos extratos obtidos em farinhas de *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica*;
- Utilizar o extrato obtido com maior atividade de celulases para promover a sacarificação como pré tratamento no processo fermentativo;

- Produzir cachaças utilizando o pré tratamento enzimático utilizando *Saccharomyces cerevisiae*; levedura para produção de cerveja Belgian Ale (M27) e por fim a fermentação espontânea;
- Acompanhar a variação do pH, Brix, açúcares totais e polifenóis durante os processos fermentativos;
- Avaliar o teor alcoólico e a concentração de etanol nas fermentações;
- Avaliar o impacto do tratamento do mosto na produção de congêneres e comparar com o processo de produção tradicional utilizando a cromatografia líquida e a ressonância magnética nuclear;
- Verificar o efeito da extração de bioativos do gengibre utilizando o extrato enzimático no perfil de compostos fenólicos através da HPLC;
- Através da análise de superfície de resposta identificar os principais fatores que contribuíram para a extração dos compostos fenólicos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AADIL, R. M.; ZENG, X. A.; HAN, Z.; SUN, D. W. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. **Food Chemistry**, v.141, n.3, p.3201. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871078>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.008

ABDEL-BANAT, B. M.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, n.4, p.861. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820925>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5

ABO-STATE, M. A.; RAGAB, A. M.; EL-GENDY, N. S.; FARAHAT, L. A.; MADIAN, H. R. Effect of different pretreatments on egyptian sugar-cane bagasse saccharification and bioethanol production. **Egyptian Journal of Petroleum**, v.22, n.1, p.161. 2013. Disponível em: em. doi,

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIERREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p.46. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444905>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v.4, n.1, p.117. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970208>>. Acesso em. doi: 10.3390/biom4010117

ALCARDE, A.; SOUZA, P.; BOSQUEIRO, A.; BELLUCO, A. Cinética de volatilização de componentes secundários da aguardente de cana-de-açúcar durante dupla destilação em alambique simples. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v.13, n.4, p.271. 2010. Disponível em: em. doi,

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A. D.; BELLUCO, A. E. D. S. Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. **Food Sci. Technol**, v.31, n.2, p.355. 2011. Disponível em: em. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000200012>

ALEXANDER, S. P.; FABBRO, D.; KELLY, E.; MARRION, N. V.; PETERS, J. A.; FACCENDA, E.; HARDING, S. D.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; SOUTHAN, C.; DAVIES, J. A.; COLLABORATORS, C. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v.174 Suppl 1, n.S1, p.S272. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29055034>>. Acesso em. doi: 10.1111/bph.13877

ALVES, L. D. L.; CICHOSKI, A. J.; BARIN, J. S.; RAMPELOTTO, C.; DURANTE, E. C. The ultrasound on meat tenderization. **Ciência Rural**, v.43, n.8, p.1522. 2013. Disponível em: em. doi,

ALVES, T. M.; FARIAS, F. C.; ALCARDE, A. R.; OLIVEIRA FILHO, J. H. D. Influência do tratamento térmico do caldo de cana no desenvolvimento do processo fermentativo e na composição química da cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-67232018000100462&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100462&nrm=iso)>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.12617>

AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v.85, p.76. 2016. Disponível em: em. doi,

ARCTANDER, S. **Perfume and flavor materials of natural origin**. Lulu. com, 2017. ISBN 0244329214.

ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.25, p.17. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219872>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.08.012

BALA, A.; SINGH, B. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.6, p.109. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28466305>>. Acesso em. doi: 10.1007/s11274-017-2278-6

BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, v.50, n.3, p.353. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521009000423>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.jcs.2009.03.001

BELWAL, T.; EZZAT, S. M.; RASTRELLI, L.; BHATT, I. D.; DAGLIA, M.; BALDI, A.; DEVKOTA, H. P.; ORHAN, I. E.; PATRA, J. K.; DAS, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GOMEZ-GOMEZ, L.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; ATANASOV, A. G. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, v.100, p.82. 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993617304405>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.trac.2017.12.018

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDENO-TARRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v.417, n.6885, p.141. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000953>>. Acesso em. doi: 10.1038/417141a

BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; IORIO, M. C.; LOI, M.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. US-INACTIVATION of foodborne bacteria: Screening in distilled water and combination with citrus extract in skim milk. **LWT**, v.70, p.135. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816301219>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.042

BONIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.; NIKIĆEVIĆ, N.; CVEJIĆ, J.; MILOSAVLJEVIĆ, S.; VAJS, V.; MANDIĆ, B.; UROŠEVIĆ, I.; VELIČKOVIĆ, M.; JOVANIĆ, S. The contents of heavy metals in Serbian old plum brandies. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.78, n.7, p.933. 2013. Disponível em: em. doi,

BRAGA, M. V. F.; KIYOTANI, I. B. A CACHAÇA COMO PATRIMÔNIO: TURISMO, CULTURA E SABOR. **Revista de Turismo Contemporâneo**, v.3, n.2. 2015. Disponível em: em. doi,

BRANCO DE MIRANDA, M.; SOUZA MARTINS, N. G.; DE SOUZA BELLUCO, A. E.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em

tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1. 2008. Disponível em: em. doi,

BRASIL. **Instrução Normativa nº12, de 4 de setembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. MAPA. Brasília: Diário Oficial da União: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: 3 p. 2003.

\_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014**. UNIÃO, D. O. D. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v.45, n.1, p.120. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135951130900275X>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.procbio.2009.08.015

BRITO-CUNHA, C. C.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S.; FARIA, F. P.; BATAUS, L. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis* I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v.4, n.1, p.90. 2015. Disponível em: em. doi,

CANUTO, M. H. Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado. 2013. Disponível em: em. doi:

CÁRCEL, J.; GARCÍA-PÉREZ, J.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v.110, n.2, p.200. 2012. Disponível em: em. doi,

CARDOSO, M. D. G. Produção de aguardente de cana. **Produção de aguardente de cana**. 2006. Disponível em: em. doi:

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.34, p.540. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773280>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

CHEN, D.; REN, Y.; ZHONG, Q.; SHAO, Y.; ZHAO, Y.; WU, Y. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from China: Levels, dietary intake, and risk assessment. **Food Control**, v.72, p.283. 2017. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.047

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, n.4, p.438. 2003. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943855>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0958-1669(03)00099-5

COLDEA, T. E.; MUDURA, E.; SOCACIU, C. Advances in Distilled Beverages Authenticity and Quality Testing. In: (Ed.). **Ideas and Applications Toward Sample Preparation for Food and Beverage Analysis**: InTech, 2017.

COLDEA, T. E. R.; SOCACIU, C.; MARIA, P.; VODNAR, D. Gas-chromatographic analysis of major volatile compounds found in traditional fruit brandies from Transylvania, Romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v.39, n.2, p.109. 2011. Disponível em: em. doi,

COUTURIER, M.; BENNATI-GRANIER, C.; URIO, M. B.; RAMOS, L. P.; BERRIN, J.-G. Fungal Enzymatic Degradation of Cellulose. In: (Ed.). **Green Fuels Technology**: Springerv. 10.1007/978-3-319-30205-8\_6, 2016. cap. Chapter 6, p.133. (Green Energy and Technology). ISBN 978-3-319-30203-4 978-3-319-30205-8.

CRUZ-CANSINO NDEL, S.; REYES-HERNANDEZ, I.; DELGADO-OLIVARES, L.; JARAMILLO-BUSTOS, D. P.; ARIZA-ORTEGA, J. A.; RAMIREZ-MORENO, E. Effect of ultrasound on survival and growth of Escherichia coli in cactus pear juice during storage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.2, p.431. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991288>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.014

CRUZ, S.; CANAS, S.; BELCHIOR, A. P. Effect of ageing system and time on the quality of wine brandy aged at industrial-scale. **Ciência Téc. Vitiv**, v.27, n.2, p.83. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em. doi, [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, n.10, p.7313. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966876>>. Acesso em. doi: 10.3390/molecules15107313

DE QUEIROZ BRITO CUNHA, C. C.; GAMA, A. R.; CINTRA, L. C.; BATAUS, L. A. M.; ULHOA, C. J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by Pichia pastoris. **PloS One**, v.13, n.2, p.e0192996. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29481569>>. Acesso em. doi: 10.1371/journal.pone.0192996

DERVILLY, G. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. **Carbohydrate Polymers**, v.47, n.2, p.143. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861701001722>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0144-8617(01)00172-2

DOS SANTOS NUNES, T.; FINZER, J. R. D. A importância do tratamento do caldo de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol/The importance of sugar cane treatment for sugar and ethanol production. **Brazilian Journal of Development**, v.5, n.11, p.24816. 2019. Disponível em: em. doi,

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

GACHOVSKA, T. K.; NGADI, M.; CHETTI, M.; RAGHAVAN, G. S. V. Enhancement of lycopene extraction from tomatoes using pulsed electric field. 2013 19th IEEE Pulsed Power Conference (PPC), 2013. 16-21 June 2013. p.1.

GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma enzymes. **Trichoderma And Gliocladium, Volume 2: Enzymes, Biological Control and commercial applications**, v.2, p.327. 1998. Disponível em: em. doi,

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; DA COSTA NOGUEIRA, C.; DOS SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; DE MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, v.131, p.66. 2014. Disponível em: em. doi,

GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, n.3, p.401. 2005. Disponível em: em. doi,

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v.37, n.1, p.189. 1983. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357051>>. Acesso em. doi:  
10.1146/annurev.mi.37.100183.001201

GRANATO, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers. **Food Research International**, v.60, p.212. 2014. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.foodres.2013.09.044

GUILHERME, A.; DANTAS, P.; SANTOS, E.; FERNANDES, F.; MACEDO, G. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.32, n.1, p.23. 2015. Disponível em: em. doi,

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v.41, n.7, p.633. 2016. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211037>>. Acesso em. doi:  
10.1016/j.tibs.2016.04.006

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.100, n.PT A, p.1. 2012. Disponível em: em. doi,

HUMPF, H. U.; SCHREIER, P. Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.10, p.1830. 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf00010a028>>. Acesso em. doi: 10.1021/jf00010a028

IZAH, S. C.; CHAKRABARTY, N.; SRIVASTAV, A. L. A review on heavy metal concentration in potable water sources in Nigeria: Human health effects and mitigating measures. **Exposure and Health**, v.8, n.2, p.285. 2016. Disponível em: em. doi,

IZAH, S. C.; INYANG, I. R.; ANGAYE, T. C. N.; OKOWA, I. P. A Review of Heavy Metal Concentration and Potential Health Implications of Beverages Consumed in Nigeria. **Toxics**, v.5, n.1, p.1. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29051433>>. Acesso em. doi: 10.3390/toxics5010001

J ROHSENOW, D.; HOWLAND, J. The role of beverage congeners in hangover and other residual effects of alcohol intoxication: a review. **Current drug abuse reviews**, v.3, n.2, p.76. 2010. Disponível em: em. doi,

JANZANTTI, N. S. Compostos de volateis e qualidade de sabor da cachaça. 2004. Disponível em: em. doi:

JIANG, B.; MANTRI, N.; HU, Y.; LU, J.; JIANG, W.; LU, H. Evaluation of bioactive compounds of black mulberry juice after thermal, microwave, ultrasonic processing, and storage at different temperatures. **Food Science and Technology International**, v.21, n.5, p.392. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24917651>>. Acesso em: 2018/02/25. doi: 10.1177/1082013214539153

JONES, S. E.; ELLIOT, M. A. *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. **Trends in Microbiology**, v.25, n.7, p.522. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28245952>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.001

KABIR, F.; SULTANA, M. S.; KURNIANTA, H. Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Underutilized Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace Extracts. **Prev Nutr Food Sci**, v.20, n.3, p.210. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26451359>>. Acesso em. doi: 10.3746/pnf.2015.20.3.210

KUBRA, I. R.; RAO, L. J. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.52, n.8, p.651. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591340>>. Acesso em. doi: 10.1080/10408398.2010.505689

KUMAR, M.; KUMAR, P.; DAS, P.; SOLANKI, R.; KAPUR, M. K. Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. **Archives of Microbiology**, v.202, n.7, p.1597. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32451592>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00203-020-01898-9

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.41, n.1, p.90. 1990. Disponível em: em. doi,

LECHEVALIER, H. A practical guide to generic identification of actinomycetes. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v.4, p.2344. 1989. Disponível em: em. doi,

LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, Y. J.; XU, X. R.; CHEN, Y. M.; LI, H. B. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v.6, n.12, p.6020. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533011>>. Acesso em. doi: 10.3390/nu6126020

LI, X.; CHANG, S. H.; LIU, R. Industrial Applications of Cellulases and Hemicellulases. In: (Ed.). **Fungal Cellulolytic Enzymes**: Springer. 10.1007/978-981-13-0749-2\_15, 2018. cap. Chapter 15, p.267. ISBN 978-981-13-0748-5 978-981-13-0749-2.

LIU, W.; BRENNAN, M. A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C. S. Effect of cellulase, xylanase and alpha-amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v.234, p.93. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28551272>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.160

LÓPEZ-VÁZQUEZ, C.; ORRIOLS, I.; PERELLÓ, M.-C.; DE REVEL, G. Determination of aldehydes as pentafluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME-GC/MS. **Food Chemistry**, v.130, n.4, p.1127. 2012. Disponível em: em. doi,

MAHNIC-KALAMIZA, S.; VOROBIEV, E.; MIKLAVCIC, D. Electroporation in food processing and biorefinery. **Journal of Membrane Biology**, v.247, n.12, p.1279. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287023>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00232-014-9737-x

MANCINI, S.; PREZIUSO, G.; DAL BOSCO, A.; ROSCINI, V.; PARISI, G.; PACI, G. Modifications of fatty acids profile, lipid peroxidation and antioxidant capacity in raw and cooked rabbit burgers added with ginger. **Meat Sci**, v.133, p.151. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28692848>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.meatsci.2017.07.003

MARTÍNEZ-ANAYA, M. A.; JIMÉNEZ, T. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v.205, n.3, p.209. 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s002170050152>>. Acesso em. doi: 10.1007/s002170050152

MASHHADI, N. S.; GHIASVAND, R.; ASKARI, G.; HARIRI, M.; DARVISHI, L.; MOFID, M. R. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: review of current evidence. **International Journal of Preventive Medicine**, v.4, n.Suppl 1, p.S36. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717767>>. Acesso em. doi, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717767>

MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v.14, n.5, p.525. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955006>>. Acesso em. doi: 10.1089/omi.2010.0072

MOLAVERDI, M.; KARIMI, K.; MIRMOHAMADSADEGHI, S.; GALBE, M. High titer ethanol production from rice straw via solid-state simultaneous saccharification and fermentation by *Mucor indicus* at low enzyme loading. **Energy Conversion and Management**, v.182, p.520. 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890418314237>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.enconman.2018.12.078

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; NADERI, Z.; DEHGHAN, A.; NADJARZADEH, A.; FALLAH HUSEINI, H. Effect of Ginger Supplementation on Proinflammatory Cytokines in Older Patients with Osteoarthritis: Outcomes of a Randomized Controlled Clinical Trial. **J Nutr Gerontol Geriatr**, v.35, n.3, p.209. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27559855>>. Acesso em. doi: 10.1080/21551197.2016.1206762

NÓBREGA, I. C.; PEREIRA, G. E.; SILVA, M.; PEREIRA, E. V.; MEDEIROS, M. M.; TELLES, D. L.; ALBUQUERQUE JR, E. C.; OLIVEIRA, J. B.; LACHENMEIER, D. W. Improved sample preparation for GC–MS–SIM analysis of ethyl carbamate in wine. **Food Chemistry**, v.177, p.23. 2015. Disponível em: em. doi,

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. **Volatile compounds in food and beverages**, p.547. 1991. Disponível em: em. doi:

OKSANEN, J.; AHVENAINEN, J.; HOME, S. Microbial cellulase for improving filterability of wort and beer. **JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING**, 1985. INST BREWING 33 CLARGES STREET, LONDON, ENGLAND W1Y 8EE. p.130.

OLIVEIRA; ASCHERI; CARVALHO. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v.46, n.4. 2016. Disponível em: em. doi,

PAIVA, A. L. D.; SOUZA, R. B. D.; BARRETO, I. D. D. C.; BRITO, M. J. D. Fluxo das Exportações Brasileiras de Cachaça: traços da influência do Estado no setor. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.55, p.733. 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/1234-56781806-94790550407

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.81. 2003. Disponível em: em. doi,

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p.1153. 2000. Disponível em: em. doi,

PANG, X.; CAO, J.; WANG, D.; QIU, J.; KONG, F. Identification of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) volatiles and localization of aroma-active constituents by GC–

olfactometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, n.20, p.4140. 2017. Disponível em: em. doi,

PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of pectinases in industrial sector. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v.16, n.1, p.89. 2013. Disponível em: <<http://www.ijopaasat.in/>>. Acesso em. doi, <http://www.ijopaasat.in/>

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Novel enzymatic processes applied to the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p.64. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315001782>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.cofs.2015.12.002

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.279, p.385. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30685132>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.049

PFLAUM, T.; HAUSLER, T.; BAUMUNG, C.; ACKERMANN, S.; KUBALLA, T.; REHM, J.; LACHENMEIER, D. W. Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update. **Archives of Toxicology**, v.90, n.10, p.2349. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27353523>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00204-016-1770-3

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944805>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-005-1904-7

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.127. 2003. Disponível em: em. doi,

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v.56, n.1, p.16. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29795993>>. Acesso em. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491

RIBEIRO, M. L. D. Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento. 2016. Disponível em: em. doi:

RODRIGUES, T. A. F. Clarificação do caldo de cana-de-açúcar por aquecimento e fosfatação auxiliado por caleação e centrifugação contínua. 2017. Disponível em: em. doi:

RUSSELL, I.; BAMFORTH, C.; STEWART, G. **Whisky: technology, production and marketing**. Elsevier, 2014. ISBN 0124046037.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.5, p.279. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698321>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10295-003-0049-x

SCANAVINI, H. F. A.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Cachaça distillation investigated on the basis of model systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.2, p.429. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-66322012000200022&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322012000200022&nrm=iso)>. Acesso em: 22 jul 2020. doi: 10.1590/s0104-66322012000200022

SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. Sugarcane Spirits (Cachaça) Quality Assurance and Traceability: An Analytical Perspective. In: GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M. (Ed.). **Production and Management of Beverages**: Woodhead Publishingv. 10.1016/b978-0-12-815260-7.00011-0, 2019. p.335. ISBN 9780128152607.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.179, n.8, p.1346. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27068832>>. Acesso em. doi: 10.1007/s12010-016-2070-3

SHELDON, R. A. CHAPTER 14. Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs): From Concept to Industrial Biocatalyst. In: (Ed.). **Biocatalysis**: The Royal Society of Chemistryv. 10.1039/9781782629993-00363, 2017. p.363. (Catalysis Series). ISBN 978-1-78262-619-0.

SI, W.; CHEN, Y. P.; ZHANG, J.; CHEN, Z. Y.; CHUNG, H. Y. Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids. **Food Chemistry**, v.239, p.1117. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28873530>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.055

SILVA, C. C.; ASSUNÇÃO, L. F.; SOUSA FILHO, J. W. Determinação da inversão de sacarose em caldo de cana-de-açúcar submetido a tratamento por irradiação micro-ondas para produção de açúcar. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v.2, n.1, p.6. 2018. Disponível em: em. doi,

SINGH, A. K.; CHHATPAR, H. Optimization of protease production by *Streptomyces* sp. A6 using statistical approach for reclamation of shellfish waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.9, p.1631. 2010. Disponível em: em. doi,

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v.6, n.2, p.174. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28330246>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8

SOUZA, L. M.; ALCARDE, A.; LIMA, F.; BORTOLETTO, A. Produção de cachaça de qualidade. **Piracicaba: ESALQ**, p.72. 2013. Disponível em: em. doi:

SPECHT, W.; SCHULTEIS, W. Beer Brewing Process, US2, 816,031. Germany. 1957. Disponível em: em. doi:

SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. **PharmaNutrition**, v.5, n.1, p.18. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434416300676>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.phanu.2017.01.001

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, n.2, p.421. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148108002176>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.renene.2008.05.008

TAVANANDI, H. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **LWT**, v.118, p.108802. 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819311442>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108802

TECH, E. T. Determination of Some Heavy Metals in Wastewater and Sediment of Artisanal Gold Local Mining Site of Abare Area in Nigeria. **Journal of Environmental Treatment Techniques**, v.1, n.3, p.174. 2013. Disponível em: em. doi,

TRY, S.; DE-CONINCK, J.; VOILLEY, A.; CHUNHIENG, T.; WACHÉ, Y. Solid state fermentation for the production of  $\gamma$ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.64, p.9. 2018. Disponível em: em. doi,

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microb Cell Fact**, v.6, n.1, p.9. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359551>>. Acesso em. doi: 10.1186/1475-2859-6-9

UDAY, U. S.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82, p.1041. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529189>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.086

VAISHNAV, N.; SINGH, A.; ADSUL, M.; DIXIT, P.; SANDHU, S. K.; MATHUR, A.; PURI, S. K.; SINGHANIA, R. R. *Penicillium* : The next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, v.2, p.131. 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X18300239>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.biteb.2018.04.003

VÁZQUEZ, L.; PRADOS, I. M.; REGLERO, G.; TORRES, C. F. Identification and quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes commonly utilized for polyunsaturated fatty acid concentration. **Food Chemistry**, v.229, p.28. 2017. Disponível em: em. doi,

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelbergv. 10.1007/10\_2007\_065, 2007. p.121. ISBN 978-3-540-73651-6.

WU, J.; WANG, X.; WANG, Q.; LOU, Z.; LI, S.; ZHU, Y.; QIN, L.; WEI, H. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). **Chemical Society Reviews**, v.48, n.4, p.1004. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534770>>. Acesso em. doi: 10.1039/c8cs00457a

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v.221, p.67. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979257>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.003

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Fundacao Tropical de Pesquisas e Tecnologia Andre Tosello, 1995.

YUE, Y.; YUAN, Y.; JIAN, Z. Study on Application Performance of Cellulase and Enzymes Compounded System in Detergent. **China Cleaning Industry**, n.2, p.5. 2017. Disponível em: em. doi:

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. D. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P. D.; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Analysis of organic contaminants and copper in cachaça. **Quimica Nova**, v.34, n.2, p.320. 2011. Disponível em: em. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000200026>

ZHI-QI, Q.; LI-XIANG, C.; HONG-MING, T.; SHI-NING, Z. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* sp. S5 with herbicidal activity from tomato roots. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v.3, n.01, p.7. 2006. Disponível em: em. doi,

## CAPÍTULO 2

### PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR *STREPTOMYCES THERMOCERRADOENSIS* I3 E O ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DAS FARINHAS DE ALGODÃOZINHO DO CAMPO (*COCHLOSPERMUM REGIUM*) E BATATA DE TEIÚ (*JATROPHA ELLIPTICA*).

Menandes Alves de Souza Neto<sup>1\*</sup>, Juliana Aparecida Correia Bento<sup>1</sup>, Aline Rodrigues Gama<sup>2</sup>, Armando Garcia Rodriguez<sup>2</sup>, Manoel Soares Soares Junior<sup>1</sup>, Márcio Caliar<sup>1</sup>, Luiz Artur Mendes Bataus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos– UFG, CP 131, CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas – UFG, CP 131, CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

#### RESUMO

Apesar da ampla utilização, as enzimas apresentam alguns fatores limitantes e custos elevados de produção. Diante disto, este trabalho objetivou contribuir no estudo da produção de enzimas lignocelulolíticas por *Streptomyces thermocerradoensis* I3 através da fermentação semissólida usando farelo de trigo (FT) e as farinhas de *Cochlospermum regium* (CR) e *Jatropha elliptica* (JE) como substrato. Também foi avaliada a influência do pH do meio na produção das enzimas e o efeito do tratamento enzimático das farinhas. A atividade de CMCase detectada foi  $6,07 \pm 0,13$  UI/mL e  $4,18 \pm 0,23$  UI/mL utilizando FT e JE, respectivamente. A CMCase não foi detectada em CR. A atividade da xilanase foi  $4,14 \pm 0,10$  UI/mL em FT e  $2,13 \pm 0,14$  no CR e não detectada em JE. Verificou-se maior atividade de CMCase foi obtida utilizando meio de cultura ajustado pra pH 7,5 ( $13,22$  UI/mL  $\pm 0,26$ ) enquanto para xilanase ficou em pH 7,0 ( $4,03 \pm 0,20$ ). A maior produção de enzimas foi obtida utilizando farelo de

25 trigo, pH 7,5 para CMCases e pH 7,0 para xilanases. O tratamento das farinhas de CR e JE com  
26 o extrato enzimático obtido promoveu o aumento nos níveis de açúcares totais, proteínas  
27 solúveis totais, açúcares redutores e compostos fenólicos. As farinhas modificadas pela  
28 utilização do extrato enzimático obtido podem ser aplicadas no desenvolvimento de novos  
29 produtos alimentícios com maior teor de compostos bioativos (polifenóis), alta atividade  
30 antioxidante e maior conteúdo de proteínas solúveis.

31 **Palavras-chave:** Celulase; Xilanase; farinhas; compostos fenólicos; proteínas solúveis.

## 32 **INTRODUÇÃO**

33 Enzimas obtidas de microrganismos apresentam ampla utilização nas indústrias  
34 agroalimentar, química e farmacêutica. São utilizadas para catalisar etapas específicas em uma  
35 variedade de bioprocessos, com estimativa de movimentação de 5,6 bilhões de dólares em 2018.  
36 Deste total, as enzimas xilanase, pectinase e celulase foram responsáveis por aproximadamente  
37 20% do mercado mundial de enzimas (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; PATEL;  
38 SINGHANIA; PANDEY, 2017; SHARMA; SHARMA; MAHAJAN, 2019; SINGH; SINGH;  
39 SACHAN, 2019; TOPAKAS; PANAGIOTOU; CHRISTAKOPOULOS, 2013). Enzimas  
40 também são empregadas na modificação de matérias primas agroindustriais, como por exemplo  
41 farinhas. Tal utilização visa agregar propriedades funcionais com a liberação de compostos  
42 fólicos (TSOPMO et al., 2010; XU et al., 2016).

43 Apesar do grande potencial no emprego de enzimas, elas apresentam alguns fatores  
44 limitantes, como vida útil, estrutura quimicamente instável e custos elevados de purificação  
45 (VAGHARI et al., 2016). A pesquisa por novos microrganismos, meios de cultura, processos  
46 com maior rendimento, enzimas termoestáveis, enzimas com atividade em ampla faixa de pH,  
47 menores custos de produção e/ou purificação, são focos de interesse (ATALAH et al., 2019;  
48 PRAJAPATI et al., 2018).

49 A produção de enzimas por alguns microrganismos merece destaque pelo alto  
50 rendimento e menor custo de produção de enzimas quando comparadas a outros  
51 microrganismos. As bactérias do gênero *Streptomyces* apresentam grande potencial. Essas  
52 bactérias são encontradas em muitos ambientes, sendo o solo um habitat rico nessas espécies.  
53 Algumas espécies de *Streptomyces* isolados a partir do solo do Cerrado, demonstraram  
54 capacidade de produzir diferentes enzimas, dentre elas celulasas, xilanases,  $\beta$ -glucosidase,  
55 ligninase e N-acetilglucosaminidase (PEIXOTO; SILVA; KRÜGER, 2017; SOBRINHO et al.,  
56 2005). Estudos utilizando *Streptomyces thermocerradoensis* I3 mostrou a presença de celulasas  
57 termofílicas, termoestáveis e com capacidade de atuação em uma ampla faixa de pH, além da  
58 produção de xilanases, avicelase e Fpase (BOOK et al., 2014; BRITO-CUNHA et al., 2013;  
59 BRITO-CUNHA et al., 2015; GAMA et al., 2019; PEIXOTO; SILVA; KRÜGER, 2017;  
60 SOBRINHO et al., 2005). Foi ainda constatado por GAMA et al. (2020) que, ao degradar  
61 resíduos agroindustriais por meio da fermentação submersa, o *S. thermocerradoensis* I3  
62 produziu quatro xilanases diferentes, uma delas também apresentou atividade de CMCase,  
63 permitindo sua classificação como uma enzima bifuncional.

64 Considerando a biodiversidade do Cerrado brasileiro e sua possibilidade de utilização  
65 em processos biotecnológicos, ainda merece destaque a sua vegetação. Várias espécies vegetais  
66 podem ser utilizadas para diferentes fins, na produção alimentos. Este bioma, ainda oferece  
67 muitas espécies de vegetais capazes de produzir compostos farmacologicamente ativos, os  
68 quais têm sido utilizados na medicina popular e podem contribuir para o desenvolvimento de  
69 fitoterápicos ou ainda serem utilizados como meios de cultura para a produção de enzimas  
70 assim, como resíduos agroindustriais (CAVALHEIRO; GUARIM-NETO, 2018; RIBEIRO et  
71 al., 2016).

72 Diversos resíduos agroindustriais e fontes não convencionais de nutrientes têm sido  
73 investigados, por meio de diferentes estratégias de fermentação, para a produção de enzimas

74 objetivando a redução dos custos de produção e obtenção de novas enzimas. Alguns exemplos  
75 desses são cascas de banana, cascas de manga, grãos de cervejaria, farelo de trigo umedecido,  
76 bagaço de uva, bagaço de maçã cascas de melão e cascas de avelã que foram testados para  
77 produção de celulases e xilanases (RAVINDRAN et al., 2018; VÁRNAI et al., 2014).

78 Algumas espécies vegetais como *Cochlospermum regium* (CR) e *Jatropha elliptica*  
79 (Pohl)(JE) são utilizados na medicina popular, apresentam altos níveis de compostos fenólicos  
80 e atividade antioxidante. Os rizomas destes vegetais apresentam alta concentração de amido e  
81 por este motivo são utilizados para a produção de farinhas (SABANDAR et al., 2013).

82 *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell Arg é uma planta herbácea subarborescente popularmente  
83 utilizada para tratar coceiras, sífilis e picadas de serpentes graves. Geralmente uma infusão de  
84 seus rizomas em bebidas hidroalcoólicas é utilizada. Essa infusão é administrada por via oral.  
85 As propriedades farmacológicas dos produtos utilizando *Jatropha* apresentaram atividade  
86 antioxidante e atividades enzimáticas e contra veneno de *Bothrops* em ensaios in vitro e in vivo  
87 (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016; POTT; POTT, 1994).

88 *Cochlospermum*, um gênero tropical nativo do sudoeste dos Estados Unidos, México,  
89 América Central e do Sul, África, Índias Ocidentais e Austrália, tem sido descrito na medicina  
90 popular para tratamento de várias condições clínicas (SOLON et al., 2012). No Brasil,  
91 *Cochlospermum regium* (Mart. Et. Schr.) Pilger é popularmente conhecido como 'algodão-do-  
92 campo' ou 'algodãozinho' sendo amplamente utilizada para fins medicinais (SOLON;  
93 BRANDÃO; SIQUEIRA, 2009). Os rizomas deste vegetal típico do Cerrado brasileiro têm sido  
94 tradicionalmente utilizadas como hepatoprotetor, analgésico, anti-hipertensivo e anti-  
95 inflamatório no tratamento de reumatismo, artrite e acne (CARVALHO et al., 2018).

96 O presente trabalho objetivou contribuir no estudo da produção de enzimas  
97 lignocelulolíticas por *S. thermocerradoensis* I3 através da fermentação semissólida utilizando

98 diferentes meios de cultura, os impactos do pH inicial do meio na produção destas enzimas e  
99 ainda o efeito do tratamento enzimático sobre as farinhas de rizomas de plantas do Cerrado.

## 100 **MATERIAL E MÉTODOS**

### 101 **Materiais**

102 O isolado microbiano utilizado pertence ao banco de microrganismos do Laboratório de  
103 Bioquímica e engenharia genética da Universidade Federal de Goiás e foi isolado conforme  
104 BRITO-CUNHA et al. (2013).

### 105 **Produção da farinhas**

106 As raízes de *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica* foram coletadas no município  
107 de Uruaçu-GO (-14.264977, -48,973811), em uma região de floresta nativa do Cerrado, em  
108 julho de 2016. As raízes foram armazenadas em embalagens de polietileno de baixa densidade  
109 e mantidas em refrigeração ( $6 \pm 1$  °C) durante o transporte e armazenamento até o  
110 processamento ocorrer.

111 Foi utilizado farelo de trigo adquirido no comércio local. Por apresentar altos níveis de  
112 açúcares redutores o farelo passou por processo de lavagem e posterior secagem a fim de reduzir  
113 os teores destes açúcares

114 As raízes de *Cochlospermum regium* e *Jatropha elliptica* foram lavadas e sanitizadas  
115 com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 min, descascadas e fatiadas  
116 manualmente, e deixadas secar em estufa de circulação de ar a 35 °C por 48 horas, até atingir  
117 umidade menor do que 10%. O material desidratado foi moído com moinho tipo faca "Croton"  
118 (Marconi, MA580, Piracicaba, Brasil), com peneira de 2,0 mm de diâmetro para obter a farinha.

### 119 **Obtenção de extrato enzimático**

120 Uma suspensão contendo aproximadamente  $10^6$  esporos (contados em câmara de  
121 Neubauer) de *S. thermocerradoensis* I3 foi inoculada em Erlenmeyer de 500 mL contendo três

122 diferentes meios de cultura para realização de fermentação semisólida Cada Erlenmeyer  
123 continha 15 mL de meio mínimo previamente autoclavado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $3.0$   
124  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  -  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e uma fonte de carbono diferente. Foram utilizadas  
125 5 g de farelo de trigo (FT); 5 g de farinha de *Jatrhofa elliptica* (JE); 5 g de farinha de  
126 *Cochlospermum regium* (CR). A incubação foi realizada shaker de bancada com agitação  
127 orbital e controle de temperatura (SOLAB, SL 222, Piracicaba, Brasil) por de 5 dias a  $37 \pm 1$   
128  $^\circ\text{C}$ . Ao término da incubação foram adicionados 50 mL de água e 50 mL de Tween-80 0,1%.  
129 O material foi centrifugado (Eppendorf, 5804R, Hamburgo e Alemanha) a 7.500 G durante 15  
130 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e armazenado ( $-20^\circ\text{C}$ ) até realização dos ensaios

### 131 **Ensaio enzimáticos**

132 O sobrenadante foi avaliado quanto à atividade enzimática da xilanase e da CMCase  
133 (carboximetilcelulose). A atividade da CMCase foi avaliada medindo-se a liberação de açúcares  
134 redutores em uma solução de 1,0 mL da enzima e 1,0 mL da solução de CMC a 2% (p/v) em  
135 tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) incubado a  $50^\circ\text{C}$ , por um período de 10 min,  
136 seguida pela quantificação de açúcares redutores pelo método ADNS de acordo com RAMADA  
137 et al. (2010). A atividade enzimática da xilanase foi determinada usando soluções de xilana  
138 bechwood a 1% (p/v) (Sigma®) como substrato. A atividade foi determinada por microensaio,  
139 adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 90  $\mu\text{L}$  da solução a 1% de xilana. A solução foi incubada a  
140  $50^\circ\text{C}$  por 5 min, seguida pela quantificação de açúcares redutores pelo método ADNS  
141 (MILLER, 1959). A curva xilose padrão foi determinada com concentrações de 0,3 a 4,2  
142  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade (UI) corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de glicose e xilose liberada por  
143 minuto para CMCase e xilanase, respectivamente.

### 144 **Avaliação do pH do meio de cultura na produção de celulasas e xilanases**

145 Após determinação do meio de cultura associado à maior produção de celulase e  
146 xilanase, o pH deste meio de cultura foi ajustado em potenciômetro (TECNAL, TEC-2,  
147 Piracicaba, Brasil) para os valores de 6,5; 7,0 e 7,5 conforme BRITO-CUNHA et al. (2015).

#### 148 **Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nas farinhas CR e** 149 **JE**

150 Após o processamento, as farinhas de CR e JE foram submetidas a extração de  
151 compostos fenólicos utilizando uma solução metanólica (80:20). O mesmo extrato foi utilizado  
152 para determinação da atividade antioxidante. O conteúdo total de compostos fenólicos foi  
153 determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu e um espectrofotômetro a 740 nm. Os dados  
154 foram expressos em miliequivalentes de ácido gálico por 100g de amostra (WATERHOUSE,  
155 2002). A capacidade antioxidante do extrato de farinha foi determinada pelo método DPPH  
156 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), baseado na captura do radical DPPH  
157 (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo uma diminuição na absorvância a  
158 517 nm.

#### 159 **Tratamento das farinhas de *Jathrofa eliptica* e *Cochlospermum regium* com extrato** 160 **enzimático.**

161 Nos ensaios de hidrólise enzimática, soluções de 1% (p/v) da farinha a pH 6,0 (tampão  
162 fosfato pH 6,0) foram adicionadas com 0,1 mL de extrato enzimático (3 UI.mL<sup>-1</sup> para CMCase  
163 e 9 UI .mL<sup>-1</sup> para xilanase) produzido previamente a partir da fermentação semissólida do farelo  
164 de trigo com a bactéria *S. thermocerradoensis* I3. As amostras foram incubadas sob agitação a  
165 50 °C por períodos de 4, 24 e 48 h. Como controle, soluções de farinha foram utilizadas sem a  
166 adição do extrato enzimático.

167 As soluções hidrolisadas foram avaliadas quanto à açúcares redutores e totais pelo  
168 método proposto por MILLER (1959), compostos fenólicos segundo SINGLETON;  
169 ORTHOFER , LAMUELA-RAVENTÓS (1999) e teor de proteína. Ensaios para a

170 determinação do conteúdo total de proteínas foram realizados de acordo com BRADFORD  
171 (1976). A quantidade de proteína total foi determinada pela leitura da absorbância em um  
172 espectrofotômetro (Bel Photonic, SP2000UV, Piracicaba, Brasil) a 595 nm. A curva de  
173 calibração foi determinada usando Albumina de Soro Bovino (BSASigma®).

#### 174 **Análise estatística**

175 Os dados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições. Diferenças  
176 significativas entre as médias foram calculadas através da análise de variância (ANOVA)  
177 usando o software Graph pad prism 5®.

### 178 **RESULTADO E DISCUSSÃO**

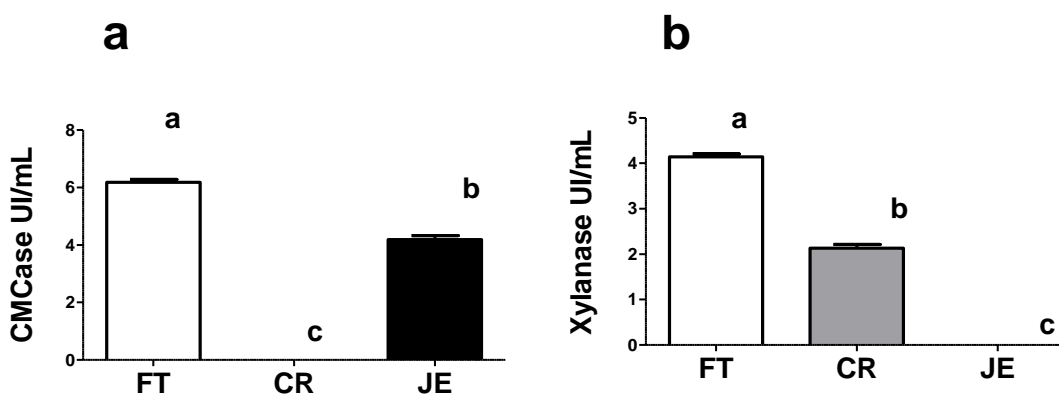
#### 179 **Avaliação de extratos enzimáticos**

180 Neste trabalho as maiores atividades enzimáticas foram obtidas utilizando o farelo de  
181 trigo como fonte de carbono, CMCase ( $6,07 \pm 0,13$  UI·mL<sup>-1</sup>) e xilanases ( $4,14 \pm 0,10$  UI·mL<sup>-1</sup>)  
182 (figura 1). Esses dados corroboram os dados de BRITO-CUNHA et al. (2013) onde a melhor  
183 fonte de carbono foi o farelo de trigo.

184 Segundo ROMERO-RODRÍGUEZ et al. (2017) tanto em *Streptomyces* quanto nos  
185 demais microrganismos, a fonte de carbono disponível no meio de cultura influencia a  
186 expressão gênica dos microrganismos. Assim, estes microrganismos produzirão enzimas para  
187 catabolizar as fontes de carbono rapidamente assimiladas, enquanto as enzimas envolvidas na  
188 utilização de outros substratos são reprimidas até que o substrato primário se esgote. Neste  
189 momento o microrganismo procura utilizar outros substratos disponíveis. Embora essa  
190 repressão gênica seja geralmente exercida pela glicose, em diferentes microrganismos outras  
191 fontes de carbono rapidamente metabolizadas também podem causar repressão e, inclusive,  
192 podem reprimir o catabolismo da glicose (SHAPIRO, 1989).

193 A figura 1 demonstra, ainda, que a utilização de farelo de trigo resultou na detecção de  
194 ambas as enzimas estudadas, enquanto a farinha de CR e JE resultou na inibição de uma das  
195 atividades estudadas. A farinha de CR levou à produção de xilanase, enquanto a farinha de JE  
196 levou a produção de CMCase. Entretanto as atividades observadas foram menores que as  
197 obtidas utilizando farelo de trigo.

198 Os dados sugerem a possibilidade de produção de apenas uma enzima avaliada  
199 conforme o meio utilizado e desta forma excluir etapas posteriores de purificação. A purificação  
200 de enzimas é um processo multietapas e está relacionado com o alto custo de produção. Desta  
201 forma a possibilidade de produção de celulasas ou xilanases de maneira isolada pode ser  
202 vantajosa para eliminar ou diminuir a necessidade da purificação, consequentemente reduzindo  
203 o custo de produção (VIJAYARAGHAVAN; RAJ; VINCENT, 2016).



204

205 **Figura 1.** Atividades enzimáticas de celulasas (a) e xilanases (b) obtidas de *Streptomyces*  
206 *thermocerradoensis* I3 utilizando substrato de farelo de trigo (FT), *Cochlospermum regium*  
207 (CR) e *Jatropha elliptica* (JE) após cinco dias de incubação, a 37 °C.  
208

209 As diferenças observadas nos extratos enzimáticos produzidos utilizando FT, CR e JE  
210 podem estar relacionadas à alta disponibilidade de amido presentes em CR (70 g.100g<sup>-1</sup>) e JE  
211 (44 g.100g<sup>-1</sup>) (BENTO, 2018) e FT (10 g.100g<sup>-1</sup>) (NANDINI; SALIMATH, 2001). Altos teores

212 de amido se mostraram potentes inibidores de celulases e xilanases produzidos por *Penicillium*  
213 *decumbens* (SUN et al., 2008).

214

215

#### 216 **Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante em CR e JE**

217 A farinha de JE (extrato metanólico) apresentou um conteúdo de compostos fenólicos  
218 de  $11,47 \pm 0,87$  mg eq de ácido gálico.g<sup>-1</sup>, enquanto a farinha de CR apresentou  $8,32 \pm 0,45$  mg  
219 eq de ácido gálico.g<sup>-1</sup> (Tabela 1). O farelo de trigo (FT) apresenta uma concentração de  
220 compostos fenólicos de 1,26 mg eq de ácido gálico. g<sup>-1</sup> (VAHER et al., 2010), valores bem  
221 menores aos encontrados nas farinhas de CE e JE. Estudos relacionam a presença de compostos  
222 fenólicos no meio de cultivo a inibição do crescimento e/ou alterações na expressão gênica de  
223 microrganismos, uma vez que alguns compostos fenólicos podem se ligar às proteínas e podem  
224 desativar as enzimas celulolíticas durante a hidrólise da celulose (GONZÁLEZ-BAUTISTA et  
225 al., 2017; KIM et al., 2015; XIMENES et al., 2010). O teor dos compostos fenólicos, bem como  
226 o perfil de compostos fenólicos possivelmente distintos entre FT, CR e JE podem ter  
227 influenciado o desenvolvimento do *S. thermocerradoensis* I3, e conseqüentemente, na produção  
228 de enzimas por esse microrganismo, resultando em maior produção de enzimas com FT como  
229 substrato, quando comparado com ao CR e JE. O trabalho de MATEO ANSON et al. (2012)  
230 relatou que o FT possui uma camada de aleurona composta principalmente por arabinoxilana  
231 com níveis elevados de monômeros de ácido ferúlico. Eles demonstraram ainda que as  
232 atividades de β-glicosidase e celobiohidrolase de *C. Cubensis* foram inibidas apenas nas  
233 concentrações mais altas de compostos fenólicos monoméricos, como o ácido ferúlico.

234 A presença destes compostos, bem como um maior conteúdo de amido e proteínas em  
235 CR e JE podem estar relacionadas à menor atividade enzimática nos extratos obtidos.

236 **Tabela 1.** Compostos fenólicos e atividade antioxidante das farinhas de *Jatropha elliptica* e  
 237 *Cochlospermum regium* (base úmida).

	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>Jatropha elliptica</i>			
Atividade antioxidante*	87.23	0.58	0.66
Compostos fenólicos (ME)	11.47	0.87	7.58
<i>Cochlospermum regium</i>			
Atividade antioxidante*	90.36	0.94	1.04
Compostos fenólicos (ME)	8.32	0.45	5.40

238 \* mg eq ácido gálico (g matéria seca)<sup>-1</sup>; ME extrato metanólico

239 As farinhas de JE e CR apresentaram atividades antioxidante similares aos relatados por  
 240 BENTO et al. (2019) que avaliou a viabilidade dessas farinhas para uso na indústria alimentícia.

241 O consumo de produtos com alto teor de compostos fenólicos e conseqüentemente alta  
 242 atividade antioxidante está relacionada com a prevenção de diversas doenças de caráter  
 243 inflamatório devido a produção excessiva de radicais livres de oxigênio/nitrogênio (TOHMA  
 244 et al., 2017).

245 As farinhas analisadas neste trabalho apresentam altos teores de compostos bioativos.  
 246 A farinha de CR contém taninos, mucilagens, saponinas, esteroides, tri terpenos e flavonóides,  
 247 incluindo kaempferol, naringenina, aromadendrina e dihidrokaempferol-3-O-β-  
 248 glucopiranosido, ácido gálico e ácido elágico (MIRANDA PEDROSO et al., 2019; SOLON,  
 249 2009). A presença desses compostos ou as suas concentrações podem justificar a alta atividade  
 250 antioxidante presente na farinha de CR. Enquanto a farinha de JE demonstrou algumas  
 251 atividades biológicas relacionadas à presença de fatores anti-nutricionais como taninos,  
 252 saponinas, fitatos, nitratos, tripsina e amilase (BENTO et al., 2019).

253 Apesar da presença e a alta concentração dos compostos fenólicos, o que poderia trazer  
 254 inúmeros benefícios ao consumidor tem sido observado que os compostos fenólicos afetam a

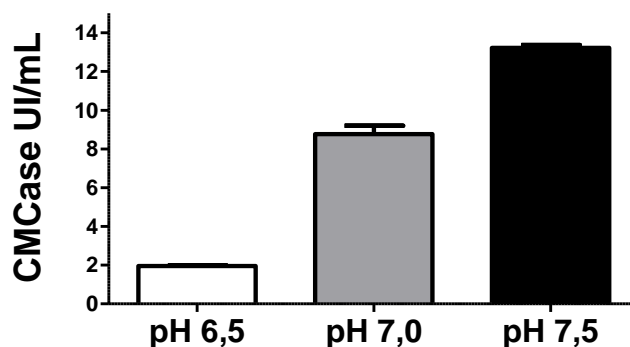
255 atividade das enzimas celulolíticas em diferentes graus, e altas concentrações de certos  
256 monômeros fenólicos podem levar à morte do microrganismo produtor das enzimas. Foi  
257 demonstrado ainda que as atividades de celulase e xilanase apresentam suscetibilidade diferente  
258 para compostos fenólicos (GONZÁLEZ-BAUTISTA et al., 2017).

259 .

### 260 **Influência do pH do meio de cultura na produção das enzimas testadas**

261 O extrato enzimático com menor atividade de CMCCase ocorreu em pH 6,5 ( $1,95 \pm 0,07$   
262 UI. mL<sup>-1</sup>), enquanto o maior valor foi obtido em pH 7,5 ( $13,22 \pm 0,26$  UI. mL<sup>-1</sup>) (Figura 2). Os  
263 dados observados evidenciam que a produção de uma de enzima por um microrganismo pode  
264 ser afetada por vários parâmetros físicos e químicos, dentre os quais o pH é um dos fatores mais  
265 importantes, pois pode afetar a síntese e secreção de proteínas, bem como a produção de  
266 metabólitos de fermentação (Prasetyo et al., 2010).

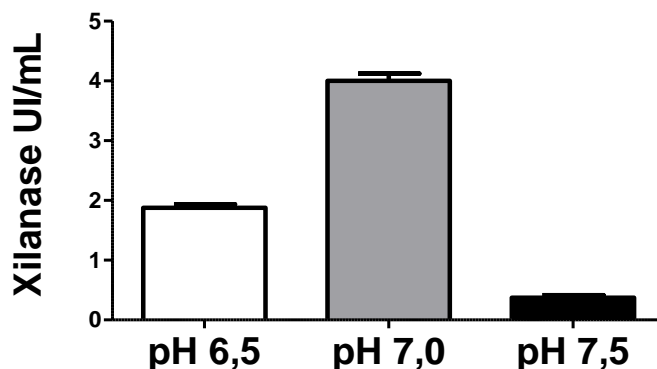
267 Estes resultados então de acordo com os encontrados por ZHANG et al. (2016), que ao  
268 avaliar a produção de celulases e xilanases por *Streptomyces griseorubens* JSD-1. Eles  
269 constataram que o pH 8,0 levou a um aumento de 47.9, 29.5, e 113.6 % na produção de celulase,  
270 xilanase e FPase respectivamente.



271

272 **Figura 2** - Atividade enzimática da endoglucanase (CMCase) obtida por fermentação  
273 semissólida a partir de substrato de farelo de trigo em três diferentes valores de pH, após cinco  
274 dias de incubação, a 37 °C.  
275

276 A maior atividade de xilanase foi obtida no pH 7,0 e a menor atividade foi encontrada  
277 em pH 7,5. (Figura 3).



278

279 **Figura 3** - Atividade enzimática da xilanase obtida por fermentação semissólida utilizando  
280 *Streptomyces thermocerradoensis* I3 a partir de substrato de farelo de trigo em três diferentes  
281 valores de pH, após cinco dias de incubação, a 37 °C.

282

283 Relatos de diversos autores indicam que o pH próximo a neutralidade é ideal para a  
284 produção de compostos bioativos em culturas de *Streptomyces* (GOGOI et al., 2008; OSKAY,  
285 2011; SINGH et al., 2009). Resultado semelhante foi relatado ao avaliar a influência do pH na  
286 atividade de xilanases isoladas de *Streptomyces* sp. CS428.(G.C et al., 2013) Os estudos de  
287 BUNDALE et al. (2015) também relatam que o pH neutro foi o ideal tanto para o crescimento  
288 quanto para a produção de metabólitos bioativos em quatro cepas diferentes de *Streptomyces*.

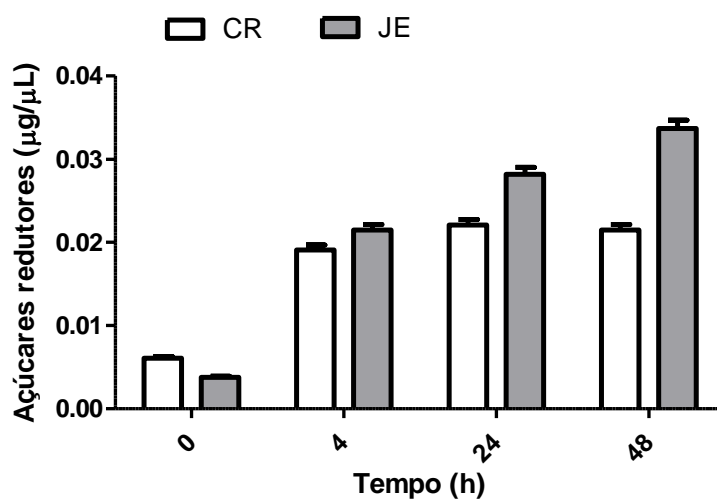
### 289 **Modificação das farinhas CR e JE com tratamento enzimático**

290 Apesar das farinhas obtidas neste trabalho não se mostraram eficientes para obtenção de  
291 uma maior atividade enzimática, elas ainda despertam interesse uma vez que são utilizadas na  
292 medicina popular por apresentar propriedades farmacológicas. A modificação de farinhas e  
293 amidos por hidrólise enzimática é uma alternativa para alterar características nutricionais destes  
294 produtos. Farinhas modificadas apresentam características físico-químicas distintas da farinha  
295 natural (não modificada), o que contribui para aplicações no desenvolvimento de novos  
296 produtos. Além de alterações nas características tecnológicas (exemplo, capacidade de absorção

297 de água e óleo, propriedades térmicas e viscoelásticas), farinhas modificadas com tratamento  
298 enzimático podem apresentar variações no conteúdo de proteínas, carboidratos (açúcares) e  
299 fenólicos (LIU et al., 2017; XUE et al., 2017). A hidrólise dos polissacarídeos e a liberação de  
300 polifenóis aumenta a biodisponibilidade destes. Verificou-se que polifenóis monoméricos e  
301 alguns oligoméricos são absorvidos enquanto as formas poliméricas são mal absorvidas  
302 (GONTHIER et al., 2003; SHOJI et al., 2006).

303 O tratamento dessas farinhas com o extrato enzimático produzido poderia resultar na  
304 liberação de uma maior concentração de princípios ativos, visto que o extrato enzimático  
305 estudado atua sobre polissacarídeos. A hidrólise parcial ou total de polissacarídeos pode resultar  
306 na liberação de mais compostos de interesse (LAVECCHIA; ZUORRO, 2016; OLIVEIRA et  
307 al., 2019).

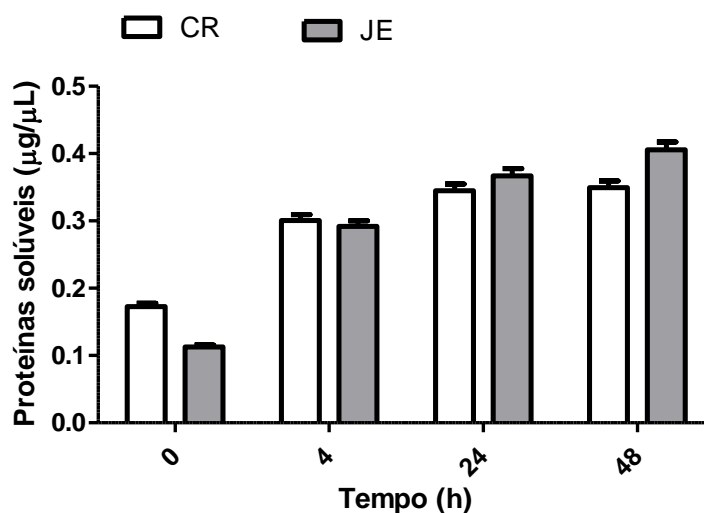
308 O tratamento das farinhas de CR, JE com extrato enzimático produzido resultou no  
309 aumento do teor de açúcares redutores e de proteínas solúveis (Figura 4 e 5).



310 **Figura 4** - Açúcares redutores nos tempos 0, 4, 24 e 48 horas de incubação a 50 °C na farinha  
311 de *Jatropha elliptica* (JE) de *Cochlospermum regium* (CR). Como controle, foram utilizadas  
312 soluções de farinha sem a adição do extrato enzimático.

313 Nas primeiras quatro horas de hidrólise, houve aumentos de aproximadamente 7 vezes  
314 no conteúdo de açúcares redutores. Em seguida, houve um pequeno aumento na farinha de CR.  
315 Na farinha de JE o incremento na quantidade de açúcar redutor continuou elevado.

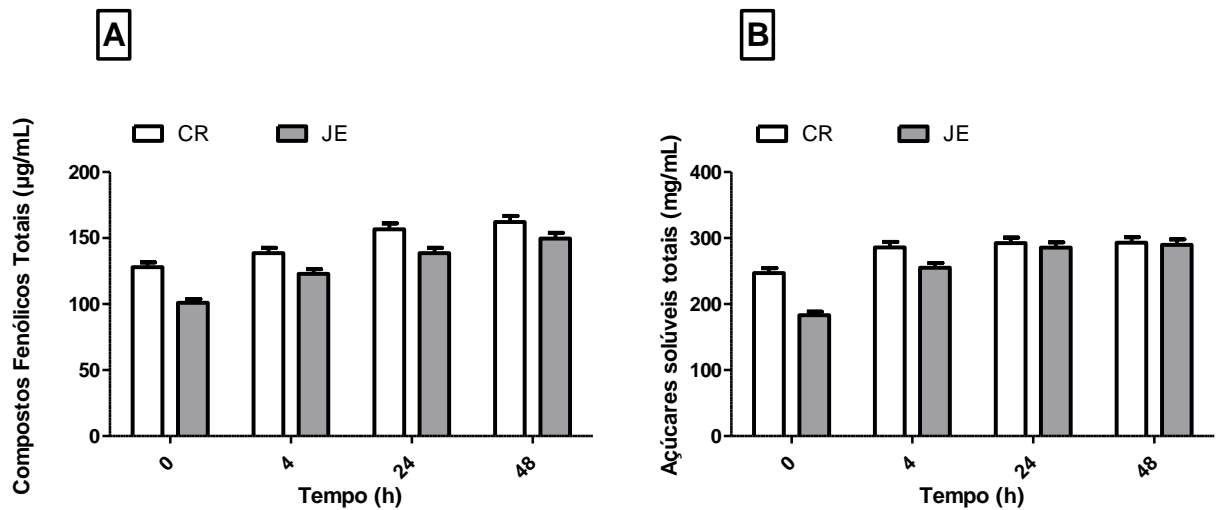
316 O aumento do teor de açúcar redutores está relacionado à hidrólise dos polissacarídeos  
317 em açúcares redutores (KHAWLA et al., 2014). A hidrólise desses polissacarídeos resulta na  
318 liberação de outros compostos presentes nas farinhas testadas, justificando o aumento no teor  
319 de compostos fenólicos. A diferença de composição ou concentração de compostos fenólicos  
320 entre as farinhas pode justificar comportamentos diferentes durante o tratamento enzimático  
321 das farinhas de CR e JE, ocasionando menor liberação de açúcares redutores.



322 **Figura 5** – Concentração de proteínas solúveis nos tempos 0, 4, 24 e 48 horas de incubação a  
323 50 °C na farinha de *Jatropha eliptica* (JE) de *Cochlospermum regium* (CR). Como controle,  
324 foram utilizadas soluções de farinha sem a adição do extrato enzimático.  
325

326 O aumento no teor de proteínas solúveis (Figura 5) também pode ser resultante da  
327 liberação de complexos proteicos associados a polissacarídeos (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ;  
328 MARINA; PLAZA, 2017). O aumento de proteínas solúveis foi da ordem de 2,5 vezes. O  
329 incremento das proteínas solúveis foi semelhante nas duas farinhas, diferentemente do  
330 observado para açúcar redutor.

331 A hidrólise enzimática também promoveu o aumento de cerca de 30% dos compostos  
332 fenólicos (Figura 6A). na farinha com 48 h de exposição ao extrato enzimático e açúcares  
333 solúveis (Figura 6B) totais



334 **Figura 6** - Compostos fenólicos (A) e nível de açúcares solúveis totais (B) nos tempos  
335 0, 4, 24 e 48 horas de incubação a 50 °C na farinha de *Jatropha elliptica* (JE) de *Cochlospermum*  
336 *regium* (CR). Como controle, foram utilizadas soluções de farinha sem a adição do extrato  
337 enzimático.  
338  
339

340 Pode-se inferir que o aumento dos compostos fenólicos nas farinhas modificadas se deve  
341 à hidrólise dos polissacarídeos e consequente liberação dos compostos fenólicos complexados.  
342 Alguns trabalhos também verificaram aumento no conteúdo de compostos fenólicos decorrente  
343 do tratamento enzimático (XUE et al., 2017). Estas alterações e consequente aumento de  
344 fenólicos livres também foi detectada após avaliação do tratamento enzimático promovido por  
345 LIU et al. (2017). Quando complexadas com essas macromoléculas, geralmente apresentam  
346 baixo rendimento na extração por métodos convencionais de extração (extração com solventes)  
347 e por este motivo não são quantificadas na análise quantitativa dos fenólicos, uma vez que  
348 podem ser retidos na matriz dos alimentos e portanto, inacessível aos solventes devido a  
349 diferentes interações com a matriz da planta (CHENG et al., 2014; JAKOBEK, 2015; PEREZ-  
350 JIMENEZ; DIAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO, 2013).

351 Por fim, a liberação de compostos fenólicos complexados com polissacarídeos pode  
352 melhorar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos, aumentando o valor  
353 nutricional dos alimentos submetidos ao tratamento enzimático (ANSON et al., 2009; MATEO  
354 ANSON et al., 2011).

355 A modificação das farinhas de CR e JE com o extrato enzimático resultou no aumento  
356 do conteúdo de açúcar redutor, proteínas solúveis e compostos fenólicos. Tais farinhas  
357 modificadas poderiam ser empregadas para a produção de alimentos como pães e bolos, por  
358 exemplo, conferindo a estes novos produtos um maior aporte em compostos fenólicos, podendo  
359 trazer benefícios à saúde dos consumidores. Uma nova etapa deste estudo está em andamento,  
360 visando aplicação dessas farinhas modificadas.

## 361 **CONCLUSÃO**

362 O farelo de trigo mostrou-se o melhor substrato para produzir celulasas e xilanasas  
363 usando a bactéria *Streptomyces thermocerradoensis* I3. O pH mais adequado para produzir  
364 extratos enzimáticos contendo celulasas e xilanasas foi de 7,5 e 7,0, para CMCase e xilanase,  
365 respectivamente. Por outro lado, extratos enzimáticos produzidos com farinha de *Jathrofa*  
366 *eliptica* e *Cochlospermum regium*, como substrato, apresentaram atividade para uma das duas  
367 enzimas estudadas (CMCase ou xilanase, respectivamente). Esse resultado é importante quando  
368 se deseja obter extrato com apenas uma das enzimas, resultando em impacto no custo de  
369 produção ou purificação dessas enzimas. Os resultados obtidos sugerem que o extrato  
370 enzimático produzido foi capaz de modificar as farinhas de *Jathrofa eliptica* e *Cochlospermum*  
371 *regium*, proporcionando um aumento no conteúdo de polifenóis, açúcares e de proteínas  
372 solúveis. Logo, as farinhas modificadas pela utilização do extrato enzimático produzido podem  
373 ser aplicadas no desenvolvimento de novos produtos alimentícios com maior teor de compostos  
374 bioativos (polifenóis), alta atividade antioxidante e maior conteúdo de proteínas solúveis.

375 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 376 ANSON, N. M.; SELINHEIMO, E.; HAVENAAR, R.; AURA, A. M.; MATTILA, I.;  
377 LEHTINEN, P.; BAST, A.; POUTANEN, K.; HAENEN, G. R. Bioprocessing of wheat bran  
378 improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. **Journal of**  
379 **Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p.6148. 2009. Disponível em:  
380 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19537710>>. Acesso em. doi: 10.1021/jf900492h  
381
- 382 ATALAH, J.; CÁCERES-MORENO, P.; ESPINA, G.; BLAMEY, J. M. Thermophiles and  
383 the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v.280, p.478.  
384 2019. Disponível em:  
385 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419301877>>. Acesso em. doi:  
386 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>  
387
- 388 BENTO, J. A. C. Caracterização e aplicação de farinhas e féculas de Lírio-do-brejo  
389 (*Hedychium coronarium* koen), Algodãozinho-do-campo (*Cochlospermum regium*) e Batata-  
390 de-teiú (*Jatropha elliptica* (Pohl) Muell Arg.). 2018. Disponível em: em. doi:  
391
- 392 BENTO, J. A. C.; NETO, M. A. D. S.; RODRIGUEZ, A. G.; BATAUS, L. A. M.; CALIARI,  
393 M.; JUNIOR, M. S. S. Physical, chemical, technological and toxicological characteristics of  
394 teiu potato flour (*Jatropha elliptica* (Pohl) Oken). **Emirates Journal of Food and**  
395 **Agriculture**, v.31, n.3, p.172. 2019. Disponível em: em. doi: 10.9755/ejfa.2019.v31.i3.1925  
396
- 397 BOOK, A. J.; LEWIN, G. R.; MCDONALD, B. R.; TAKASUKA, T. E.; DOERING, D. T.;  
398 ADAMS, A. S.; BLODGETT, J. A.; CLARDY, J.; RAFFA, K. F.; FOX, B. G.; CURRIE, C.  
399 R. Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a  
400 phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose. **Applied and Environment**  
401 **Microbiology**, v.80, n.15, p.4692. 2014. Disponível em:  
402 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837391>>. Acesso em. doi: 10.1128/AEM.01133-  
403 14  
404
- 405 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
406 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**,  
407 v.72, n.1-2, p.248. 1976. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>.  
408 Acesso em. doi: 10.1006/abio.1976.9999  
409
- 410 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to  
411 evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25. 1995.  
412 Disponível em: em. doi: 10.1016/s0023-6438(95)80008-5  
413
- 414 BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; DE CAMPOS, I. T. N.; DE FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M.  
415 Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes.  
416 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.3, p.598. 2013. Disponível em:  
417 <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0193-3>>. Acesso em. doi: 10.1007/s12010-013-0193-3  
418
- 419 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
420 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
421 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **J Agri Environ Sci**, v.4, n.1, p.90. 2015.

422 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.15640/jaes.v4n1a12>>. Acesso em. doi:  
423 10.15640/jaes.v4n1a12  
424

425 BUNDALE, S.; BEGDE, D.; NASHIKKAR, N.; KADAM, T.; UPADHYAY, A. J. A. I. M.  
426 Optimization of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces*  
427 spp. isolated from soil. **Advances in Microbiology**, v.5, n.06, p.441. 2015. Disponível em:  
428 em. doi: 10.4236/aim.2015.56045  
429

430 CARVALHO, R. S.; CAROLLO, C. A.; DE MAGALHÃES, J. C.; PALUMBO, J. M. C.;  
431 BOARETTO, A. G.; NUNES E SÁ, I. C.; FERRAZ, A. C.; LIMA, W. G.; DE SIQUEIRA, J.  
432 M.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-  
433 enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots:  
434 Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African Journal of**  
435 **Botany**, v.114, p.181. 2018. Disponível em:  
436 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629917308773>>. Acesso em. doi:  
437 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.010>  
438

439 CAVALHEIRO, L.; GUARIM-NETO, G. J. B. L. Y. D. C. P. M. Y. A. Ethnobotany and  
440 regional knowledge: Combining popular knowledge with the biotechnological potential of  
441 plants in the Aldeia Velha community, Chapada dos Guimaraes, Mato Grosso, Brazil. v.17,  
442 n.2, p.197. 2018. Disponível em: em. doi,  
443

444 CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent  
445 advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v.8, n.6, p.238. 2018. Disponível em: em. doi:  
446 10.3390/catal8060238  
447

448 CHENG, A.; YAN, H.; HAN, C.; CHEN, X.; WANG, W.; XIE, C.; QU, J.; GONG, Z.; SHI,  
449 X. Acid and alkaline hydrolysis extraction of non-extractable polyphenols in blueberries  
450 optimisation by response surface methodology&nbsp;nbsp;. **Czech Journal of Food Sciences**,  
451 v.32, n.No. 3, p.218. 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000338755800003>. Acesso  
452 em. doi: 10.17221/257/2013-cjfs  
453

454 DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, G.; MARINA, M. L.; PLAZA, M. Strategies for the extraction  
455 and analysis of non-extractable polyphenols from plants. **Journal of Chromatography A**,  
456 v.1514, p.1. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778531>>.  
457 Acesso em. doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.066  
458

459 FERREIRA-RODRIGUES, S. C.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, M. G.; GAUTUZ, J.  
460 A. A.; SILVA, M. G.; COGO, J. C.; BATISTA-SILVA, C.; DOS SANTOS, C. P.; GROppo,  
461 F. C.; COGO-MÜLLER, K.; OSHIMA-FRANCO, Y. Anti-Inflammatory and Antithrombotic  
462 Properties of *Jatropha Elliptica*, a Plant from Brazilian Cerrado Biome. **Advanced**  
463 **pharmaceutical bulletin**, v.6, n.4, p.573. 2016. Disponível em:  
464 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28101464>  
465 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241415/>>. Acesso em. doi:  
466 10.15171/apb.2016.071  
467

468 G.C, P.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; SEONG, C. N.; CHO, S. S.; LEE, H. J.; YOO, J. C. A  
469 novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp.  
470 CS428. **Process Biochemistry**, v.48, n.8, p.1188. 2013. Disponível em:

471 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313002766>>. Acesso em. doi:  
472 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.007>  
473  
474 GAMA, A. R.; BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; DE SOUZA, G. R. L.;  
475 CARNEIRO, L. C.; BATAUS, L. A. M. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel  
476 bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**,  
477 v.n/a, n.n/a, p.e2934. 2019. Disponível em:  
478 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
479 10.1002/btpr.2934  
480  
481 \_\_\_\_\_. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel bifunctional  
482 xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. v.36, n.2, p.e2934. 2020. Disponível  
483 em: <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
484 10.1002/btpr.2934  
485  
486 GOGOI, D. K.; DEKA BORUAH, H. P.; SAIKIA, R.; BORA, T. C. Optimization of process  
487 parameters for improved production of bioactive metabolite by a novel endophytic fungus  
488 *Fusarium* sp. DF2 isolated from *Taxus wallichiana* of North East India. **World Journal of**  
489 **Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.1, p.79. 2008. Disponível em:  
490 <<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9442-3>>. Acesso em. doi: 10.1007/s11274-007-9442-3  
491  
492 GONTHIER, M. P.; DONOVAN, J. L.; TEXIER, O.; FELGINES, C.; REMESY, C.;  
493 SCALBERT, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. **Free Radical Biology and**  
494 **Medicine**, v.35, n.8, p.837. 2003. Disponível em:  
495 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0141861933&doi=10.1016%2fS0891-5849%2803%2900394-0&partnerID=40&md5=609e2d07eef3eca7e2260b1c47553399>>. Acesso em. doi:  
496 10.1016/S0891-5849(03)00394-0  
497  
498  
499  
500 GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; SANTANA-MORALES, J. C.; RÍOS-FRÁNQUEZ, F. J.;  
501 POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; CRISTIANI-URBINA, E.;  
502 PONCE-NOYOLA, T. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of  
503 *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, v.196,  
504 p.32. 2017. Disponível em:  
505 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236117300947>>. Acesso em. doi:  
506 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.080>  
507  
508 JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food**  
509 **Chemistry**, v.175, p.556. 2015. Disponível em:  
510 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577120>>. Acesso em. doi:  
511 10.1016/j.foodchem.2014.12.013  
512  
513 KHAWLA, B. J.; SAMEH, M.; IMEN, G.; DONYES, F.; DHOUBA, G.; RAOUDHA, E. G.;  
514 OUMÈMA, N.-E. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic  
515 and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v.52, p.144. 2014. Disponível  
516 em: <<Go to ISI>://WOS:000332189200021>. Acesso em. doi:  
517 10.1016/j.indcrop.2013.10.025  
518

519 KIM, Y.; KREKE, T.; KO, J. K.; LADISCH, M. R. Hydrolysis-determining substrate  
520 characteristics in liquid hot water pretreated hardwood. **Biotechnol Bioeng**, v.112, n.4, p.677.  
521 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323809>>. Acesso em. doi:  
522 10.1002/bit.25465

523

524 LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A. Chapter 19 - Cellulase Applications in Pigment and  
525 Bioactive Compound Extraction. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **New and Future Developments**  
526 **in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier. v.  
527 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00019-8>, 2016. p.209. ISBN 978-0-444-63507-  
528 5.

529

530 LIU, W.; BRENNAN, M. A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C. S. Effect of cellulase, xylanase  
531 and alpha-amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread  
532 dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v.234, p.93. 2017. Disponível em:  
533 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28551272>>. Acesso em. doi:  
534 10.1016/j.foodchem.2017.04.160

535

536 MATEO ANSON, N.; AURA, A. M.; SELINHEIMO, E.; MATTILA, I.; POUTANEN, K.;  
537 VAN DEN BERG, R.; HAVENAAR, R.; BAST, A.; HAENEN, G. R. Bioprocessing of  
538 wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and  
539 exerts antiinflammatory effects ex vivo. **Journal of Nutrition**, v.141, n.1, p.137. 2011.  
540 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106920>>. Acesso em. doi:  
541 10.3945/jn.110.127720

542

543 MATEO ANSON, N.; HEMERY, Y. M.; BAST, A.; HAENEN, G. R. Optimizing the  
544 bioactive potential of wheat bran by processing. **Food Funct**, v.3, n.4, p.362. 2012.  
545 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336890>>. Acesso em. doi:  
546 10.1039/c2fo10241b

547

548 MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.  
549 **Analytical chemistry**, v.31, n.3, p.426. 1959. Disponível em:  
550 <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em. doi: 10.1021/ac60147a030

551

552 MIRANDA PEDROSO, T. F.; BONAMIGO, T. R.; DA SILVA, J.; VASCONCELOS, P.;  
553 FELIX, J. M.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, R. I. C.; DOS SANTOS, A. C.; VOLOBUFF,  
554 C. R. F.; FORMAGIO, A. S. N.; TRICHEZ, V. D. K. Chemical constituents of  
555 *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation,  
556 and anticholinesterase effects in Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.111,  
557 p.1383. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30841453>>. Acesso  
558 em. doi: 10.1016/j.biopha.2019.01.005

559

560 NANDINI, C. D.; SALIMATH, P. V. Carbohydrate composition of wheat, wheat bran,  
561 sorghum and bajra with good chapati/roti (Indian flat bread) making quality. **Food**  
562 **Chemistry**, v.73, n.2, p.197. 2001. Disponível em:  
563 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600002788>>. Acesso em. doi:  
564 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00278-8)

565

566 OLIVEIRA, D. M.; MOTA, T. R.; OLIVA, B.; SEGATO, F.; MARCHIOSI, R.;  
567 FERRARESE-FILHO, O.; FAULDS, C. B.; DOS SANTOS, W. D. Feruloyl esterases:

568 Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive  
569 compounds. **Bioresource Technology**, v.278, p.408. 2019. Disponível em:  
570 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241930077X>>. Acesso em. doi:  
571 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>  
572

573 OSKAY, M. Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial  
574 Metabolite Production by *Streptomyces* Sp., KGG32. **International Journal of Agriculture  
575 and Biology**, v.13, n.3. 2011. Disponível em: em. doi: 10–598/HNB/2011/13–3–317–324  
576

577 PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application  
578 of Microbial Enzymes. In: BRAHMACHARI, G. (Ed.). **Biotechnology of Microbial  
579 Enzymes**: Academic Pressv. 10.1016/b978-0-12-803725-6.00002-9, 2017. p.13. ISBN  
580 9780128037256.  
581

582 PEIXOTO, J.; SILVA, L. P.; KRÜGER, R. H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped  
583 microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous  
584 materials**, v.324, p.634. 2017. Disponível em:  
585 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438941631055X>>. Acesso em. doi:  
586 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.037>  
587

588 PEREZ-JIMENEZ, J.; DIAZ-RUBIO, M. E.; SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable  
589 polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutr  
590 Res Rev**, v.26, n.2, p.118. 2013. Disponível em:  
591 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930641>>. Acesso em. doi:  
592 10.1017/S0954422413000097  
593

594 POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do pantanal. 1994. Disponível em: em. doi:  
595

596 PRAJAPATI, A. S.; PANCHAL, K. J.; PAWAR, V. A.; NORONHA, M. J.; PATEL, D. H.;  
597 SUBRAMANIAN, R. B. Review on Cellulase and Xylanase Engineering for Biofuel  
598 Production. **Industrial Biotechnology**, v.14, n.1, p.38. 2018. Disponível em:  
599 <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ind.2017.0027>>. Acesso em. doi:  
600 10.1089/ind.2017.0027  
601

602 RAMADA, M. H.; LOPES, F. A.; ULHOA, C. J.; SILVA RDO, N. Optimized microplate  
603 beta-1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. **J Microbiol Methods**, v.81,  
604 n.1, p.6. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096308>>. Acesso  
605 em. doi: 10.1016/j.mimet.2010.01.010  
606

607 RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. J. B. A review on  
608 bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. v.5, n.4, p.93.  
609 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5354/5/4/93/htm#>>. Acesso em. doi:  
610 10.3390/bioengineering5040093  
611

612 RIBEIRO, P. H. S.; SANTOS, M. L. D.; CAMARA, C. A. G. D.; BORN, F. S.; FAGG, C. W.  
613 SEASONAL CHEMICAL COMPOSITIONS OF THE ESSENTIAL OILS OF TWO *Eugenia*  
614 SPECIES AND THEIR ACARICIDAL PROPERTIES %J *Química Nova*. v.39, p.38. 2016.  
615 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-  
616 40422016000100038&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000100038&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.5935/0100-4042.20150161

617  
618 ROMERO-RODRÍGUEZ, A.; ROCHA, D.; RUIZ-VILLAFÁN, B.; GUZMÁN-TRAMPE,  
619 S.; MALDONADO-CARMONA, N.; VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M.; ZELARAYÁN, A.;  
620 RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*:  
621 new insights and lessons learned. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33,  
622 n.9, p.162. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2328-0>>. Acesso em.  
623 doi: 10.1007/s11274-017-2328-0  
624  
625 SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M.; SAHIDIN, I. Medicinal property,  
626 phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review.  
627 **Phytochemistry**, v.85, p.7. 2013. Disponível em:  
628 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153517>>. Acesso em. doi:  
629 10.1016/j.phytochem.2012.10.009  
630  
631 SHAPIRO, S. **Regulation of secondary metabolism in actinomycetes**. CRC Press, 1989.  
632 ISBN 0849369274.  
633  
634 SHARMA, D.; SHARMA, G.; MAHAJAN, R. Development of strategy for simultaneous  
635 enhanced production of alkaline xylanase-pectinase enzymes by a bacterial isolate in short  
636 submerged fermentation cycle. **Enzyme and Microbial Technology**, v.122, p.90. 2019.  
637 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022918305337>>.  
638 Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.12.008>  
639  
640 SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; AKIYAMA, H.; KANDA, T.; OHTAKE, Y.;  
641 GODA, Y. Apple Procyanidin Oligomers Absorption in Rats after Oral Administration:  
642 Analysis of Procyanidins in Plasma Using the Porter Method and High-Performance Liquid  
643 Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food**  
644 **Chemistry**, v.54, n.3, p.884. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf052260b>>.  
645 Acesso em. doi: 10.1021/jf052260b  
646  
647 SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Chapter 48 - Enzymes Used in the Food Industry:  
648 Friends or Foes? In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**: Academic  
649 Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>, 2019. p.827. ISBN 978-0-12-  
650 813280-7.  
651  
652 SINGH, V.; KHAN, M.; KHAN, S.; TRIPATHI, C. K. M. Optimization of actinomycin V  
653 production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm.  
654 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, n.2, p.379. 2009. Disponível em:  
655 <<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1828-0>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-008-1828-0  
656  
657 SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of  
658 total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu  
659 reagent. In: (Ed.). **Oxidants and Antioxidants Part A**: Elsevier, v.299, 1999. p.152.  
660 (Methods in Enzymology). ISBN 9780121822002.  
661  
662 SOBRINHO, I. D. S. J.; BATAUS, L. A. M.; MAITAN, V. R.; ULHOA, C. J. Purification  
663 and Properties of an N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces cerradoensis*.  
664 **Biotechnology Letters**, v.27, n.17, p.1273. 2005. Disponível em:  
665 <<https://doi.org/10.1007/s10529-005-0218-2>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10529-005-0218-2

666  
667 SOLON, S. **Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de Cochlospermum regium**  
668 **(Mart. et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae.** 2009. 99 (Doutorado). Faculdade de Ciências  
669 da Saúde, Universidade de Brasília  
670  
671 SÓLON, S.; BRANDÃO, L. F. G.; SIQUEIRA, J. M. Genus Cochlospermum Kunth with  
672 emphasis on ethnobotanic, pharmacological, toxicological, and chemical aspects of the  
673 Cochlospermum regium (Mart. Et. Schr.). **Pilger. Revista Eletrônica De Farmácia**, v.6, n.3,  
674 p.1. 2009. Disponível em: em. doi,  
675  
676 SOLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G.; MACEDO, C. D. S. D.; KLEIN, A.;  
677 DIAS-JUNIOR, C. A.; SIQUEIRA, J. M. D. Phenolic derivatives and other chemical  
678 compounds from Cochlospermum regium. **Química Nova**, v.35, p.1169. 2012. Disponível  
679 em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000600019&nrm=iso)  
680 [40422012000600019&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000600019&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/S0100-40422012000600019  
681  
682 SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production  
683 of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by Penicillium decumbens. 2008. Totowa, NJ. Humana  
684 Press. p.239.  
685  
686 TOHMA, H.; GÜLÇİN, İ.; BURSAL, E.; GÖREN, A. C.; ALWASEL, S. H.; KÖKSAL, E.  
687 Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (Zingiber officinale Rosc.)  
688 determined by HPLC-MS/MS. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.11,  
689 n.2, p.556. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11694-016-9423-z>>. Acesso em.  
690 doi: 10.1007/s11694-016-9423-z  
691  
692 TOPAKAS, E.; PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Xylanases: Characteristics,  
693 Sources, Production, and Applications. In: (Ed.). **Bioprocessing Technologies in Biorefinery**  
694 **for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**.  
695 10.1002/9781118642047.ch9, 2013. p.147.  
696  
697 TSOPMO, A.; COOPER, A.; JODAYREE, S. J. A. J. O. F. S.; TECHNOLOGY. Enzymatic  
698 hydrolysis of oat flour protein isolates to enhance antioxidative properties. v.2, n.4, p.206.  
699 2010. Disponível em: em. doi,  
700  
701 VAGHARI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; MOHAMMADLOU, M.; BERENJIAN,  
702 A.; ANARJAN, N.; JAFARI, N.; NASIRI, S. Application of magnetic nanoparticles in smart  
703 enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v.38, n.2, p.223. 2016. Disponível em:  
704 <<https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10529-015-1977-z  
705  
706 VAHER, M.; MATSO, K.; LEVANDI, T.; HELMJA, K.; KALJURAND, M. Phenolic  
707 compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat  
708 varieties. **Procedia Chemistry**, v.2, n.1, p.76. 2010. Disponível em: <<Go to  
709 ISI>://WOS:000275999700011>. Acesso em. doi: 10.1016/j.proche.2009.12.013  
710  
711 VÁRNAI, A.; MÄKELÄ, M. R.; DJAJADI, D. T.; RAHIKAINEN, J.; HATAKKA, A.;  
712 VIKARI, L. Chapter Four - Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases:  
713 Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion. In:

714 SARIASLANI, S. e GADD, G. M. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic  
715 Press, v.88, 2014. p.103. ISBN 0065-2164.  
716

717 VIJAYARAGHAVAN, P.; RAJ, S. R. F.; VINCENT, S. G. P. Chapter 4 - Industrial  
718 Enzymes: Recovery and Purification Challenges. In: DHILLON, G. S. e KAUR, S. (Ed.).  
719 **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. San Diego: Academic  
720 Pressv. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00004-6>, 2016. p.95. ISBN 978-0-12-  
721 802392-1.  
722

723 WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Curr prot food anal chemv**.  
724 10.1002/0471142913.faa0101s06. 2002. Disponível em: em. doi:  
725 10.1002/0471142913.faa0101s06  
726

727 XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by  
728 phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, n.3-4, p.170. 2010. Disponível em:  
729 <<Go to ISI>://WOS:000274773500003>. Acesso em. doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001  
730

731 XU, E.; WU, Z.; PAN, X.; LONG, J.; WANG, F.; XU, X.; JIN, Z.; JIAO, A. Effect of  
732 enzymatic (thermostable  $\alpha$ -amylase) treatment on the physicochemical and antioxidant  
733 properties of extruded rice incorporated with soybean flour. **Food Chemistry**, v.197, p.114.  
734 2016. Disponível em:  
735 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615301084>>. Acesso em. doi:  
736 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.109>  
737

738 XUE, Y.; WANG, X.; CHEN, X.; HU, J.; GAO, M.-T.; LI, J. Effects of different cellulases  
739 on the release of phenolic acids from rice straw during saccharification. **Bioresource**  
740 **Technology**, v.234, p.208. 2017. Disponível em:  
741 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417302560>>. Acesso em. doi:  
742 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.127>  
743

744 ZHANG, D.; LUO, Y.; CHU, S.; ZHI, Y.; WANG, B.; ZHOU, P. Enhancement of Cellulase  
745 and Xylanase Production Using pH-Shift and Dissolved Oxygen Control Strategy with  
746 *Streptomyces griseorubens* JSD-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.178, n.2,  
747 p.338. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1875-9>>. Acesso em. doi:  
748 10.1007/s12010-015-1875-9  
749

750

751

### CAPÍTULO 3

752

**O IMPACTO DO PRÉ TRATAMENTO COM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO**

753

**DE *STREPTOMYCES* SP I7 E NA FERMENTAÇÃO E NO PERFIL QUÍMICO DA**

754

**CACHAÇA**

755

Menandes Alves de Souza Neto <sup>1\*</sup>, Juliana Aparecida Correia Bento <sup>1</sup>, Lairy Silva Coutinho <sup>4</sup>,

756

Ubirajara Coutinho Filho<sup>4</sup>, Márcio Caliar<sup>1</sup>, Armando Garcia Rodrigues<sup>2</sup> Luciano Morais

757

Lião<sup>3</sup>, Vinicius Silva Pinto<sup>3</sup> e Luiz Artur Mendes Bataus<sup>2</sup>

758

<sup>1</sup>Food Engineering Department, Federal University of Goiás – UFG, CEP 74690-900, Goiânia,

759

Goiás, Brazil.

760

<sup>2</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás – UFG, CEP 74690-900, Goiânia,

761

Goiás, Brazil.

762

<sup>3</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Goiás – UFG, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

763

<sup>4</sup>Center for Exact Sciences and Technology, Federal University of Uberlândia – UFU, CP 593,

764

CEP 38400000, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

765

\*Corresponding author: Phone: +55 (62) +556235211493; E-mail: [menandesneto@gmail.com](mailto:menandesneto@gmail.com)

## 766 **Resumo**

767 A fermentação da cana produz dois produtos importantes: cachaça e bioetanol. A cachaça é  
768 uma bebida destilada apreciada e comercializada em todo o mundo. Este trabalho teve como  
769 objetivo avaliar os efeitos do extrato enzimático bruto produzido por *Streptomyces* sp. I7 na  
770 fermentação alcoólica, na produção de etanol e no perfil químico das cachaças produzidas. O  
771 extrato bruto apresentou atividades de CMCase e xilanase de  $35,47 \pm 1,22$  e  $9,18 \pm 0,28$  UI.  
772  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. A adição do extrato enzimático no caldo de cana promoveu diferenças  
773 entre os tratamentos quanto ao valor de pH, teor de sólidos solúveis, teor total de açúcar e  
774 compostos fenólicos. Em relação ao teor de açúcar residual, houve redução da sacarose ( $2,76 \pm$   
775  $0,3$  a  $1,96 \pm 0,82$   $\text{g.L}^{-1}$ ); conteúdo de glicose ( $61,61 \pm 0,2$  a  $17,46 \pm 0,2$   $\text{g.L}^{-1}$ ) e frutose ( $423,69$   
776  $\pm 1,3$  a  $81,48 \pm 0,4$   $\text{g.L}^{-1}$ ), o teor de álcool e a concentração de etanol aumentaram ( $37,1\%$  para  
777  $43,1\%$ ) e ( $292,80 \pm 0,9$  a  $340,04 \pm 1,1$   $\text{g.L}^{-1}$ ). Além disso, houve redução no teor de acidez total,  
778 ésteres totais e carbamato de etila devido ao tratamento com o extrato bruto ativo. As cachaças  
779 produzidas estão em conformidade com a legislação brasileira, destacando a redução da acidez  
780 total, ésteres e carbamato de etila devido ao tratamento enzimático. O pré-tratamento com o  
781 extrato obtido de *Streptomyces* sp. I7 melhorou o rendimento da fermentação alcoólica na  
782 produção de cachaça e pode ser utilizado em outros processos de fermentação visando a  
783 produção de bioetanol.

784 **Palavras-chave:** Celulases, xilanases, hidrólise enzimática, pré tratamento, fermentação  
785 etanólica e biocombustíveis.

## 786 **1. Introdução**

787 O processo de fermentação da cana no Brasil gera dois produtos de grande importância  
788 econômica: cachaça e bioetanol. A cachaça é a denominação típica e exclusiva dos destilados

789 produzidos no Brasil, que pode atingir 38 a 48% em teor alcoólico a 20 °C. É obtida pela  
790 destilação do mosto fermentado do caldo de cana e possui características sensoriais distintas  
791 (BRASIL, 2005). Quimicamente a cachaça é uma matriz etanol/água, contendo uma grande  
792 diversidade de compostos, como álcoois superiores, ésteres etílicos, aldeídos, cetonas e ácidos  
793 orgânicos, os quais são responsáveis por seu sabor e aroma distintos (AMORIM; SCHWAN;  
794 DUARTE, 2016). A composição final da cachaça é diretamente influenciada pelas etapas  
795 preparação do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento. O conjunto dessas etapas  
796 promovem mudanças sensoriais relacionada aos atributos de qualidade (GRANATO et al.,  
797 2014).

798 Os compostos presentes em menores concentrações são denominados como secundários  
799 ou congêneres. Esses componentes são especialmente importantes porque contribuem para as  
800 características sensoriais químicas da bebida. Alguns congêneres, quando em altas  
801 concentrações, apresentam risco de toxicidade como por exemplo: o metanol, o acetato de etila  
802 Os teores limite para a presença desses compostos em cachaças são estabelecidos pelas  
803 Instruções Normativas do Ministério da Agricultura e Pecuária nº 13/2005 2005 (BRASIL,  
804 2005) e nº 28/2014 (BRASIL, 2014).

805 Vários fatores podem contribuir para a produção de congêneres, dentre estes fatores  
806 destacam-se as condições do processo de fermentação, a espécie de levedura utilizada ou as  
807 condições de destilação (DE SOUZA et al., 2012; PORTUGAL et al., 2017; VIDAL et al.,  
808 2013a). A produção de congêneres pode ser reduzida através de pré-tratamento do caldo de  
809 cana, visando redução das impurezas que atuam como precursores na formação dos compostos  
810 secundários, que podem depreciar a composição e a qualidade do destilado (RIBEIRO et al.,  
811 2017).

812 Diferentes métodos de pré-tratamento em processos fermentativos para a produção de  
813 etanol tem sido empregados visando o aumento da produtividade, a otimização de outras

814 variáveis e até o número de procedimentos necessários (JAGTAP et al., 2019). Nesse contexto,  
815 a aplicação de enzimas na degradação de materiais lignocelulósicos e resíduos agrícolas tem  
816 sido utilizada para a produção de etanol de segunda geração, melhorando o rendimento dos  
817 processos fermentativos (COUTURIER et al., 2016; GUPTA et al., 2016). O uso de enzimas  
818 pode favorecer o aumento do rendimento no processo de produção da cachaça, através da maior  
819 oferta de açúcares fermentescíveis, diminuição da formação de compostos secundários e alterar  
820 características sensoriais, podendo agregar valor de mercado ao produto.

821 As bactérias do gênero *Streptomyces* demonstram capacidade de produção de diversas  
822 enzimas, em diferentes meios e condições de cultivo (LAW et al., 2019). Alguns autores  
823 demonstraram a capacidade de *Streptomyces* sp. de produzir xilanases e celulasas, enzimas  
824 amplamente utilizadas pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (BRITO-CUNHA  
825 et al., 2013; BRITO-CUNHA et al., 2015; GAMA et al., 2019).

826 Diferentes metodologias são utilizadas para análise de amostras complexas como os  
827 alimentos. A ressonância magnética nuclear (RMN) de  $H^1$  permite detectar e quantificar muitos  
828 compostos, incluindo moléculas em baixas concentrações (compostos secundários). A RMN é  
829 utilizada para avaliar alterações durante o metabolismo, possíveis adulterações, contaminações  
830 e indicação geográfica em vinhos, cervejas e destilados (GIL; DUARTE, 2008; SERAFIM;  
831 LANÇAS, 2019). Porém, não foram encontradas na literatura a utilização desta técnica para a  
832 determinação do perfil químico de cachaças.

833 O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulasas e xilanases por  
834 *Streptomyces* sp. I7 e os efeitos do pré-tratamento com extrato enzimático sobre à fermentação,  
835 produção de etanol e perfil químico da cachaça produzida utilizando a ressonância magnética  
836 nuclear.

## 837 **2. Material e metodo**

### 838 **2.1 Microrganismos**

839 Uma cepa de *Streptomyces* denominada isolado sete (I7) foi usada para produzir os  
840 extratos enzimáticos conforme BRITO-CUNHA et al. (2013). Leveduras de *Saccharomyces*  
841 *cerevisiae* (Fleischman, Pederneiras SP, Brasil) foram adquiridas localmente para a  
842 fermentação alcoólica.

### 843 **2.2 Fermentação semissólida e obtenção dos extratos enzimáticos**

844 Uma suspensão de esporos de *Streptomyces* sp. I7 ( $10^6$  aproximadamente) foi inoculada  
845 em Erlenmeyers contendo 15 mL de meio mínimo pré-autoclavado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  
846  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  -  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 5 g de substrato de farelo de trigo.  
847 No final de um período de incubação de 5 dias a  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , foram adicionados 50 mL de água  
848 e 50 mL de Tween-80 ( $0,1 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), centrifugados a 7500 RPM por 15 min a  $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e o  
849 sobrenadante armazenado congelado ( $-20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), em tubos falcon, até a realização dos ensaios.

### 850 **2.2 Caldo de cana**

851 O caldo de cana foi obtido pela moagem da cana (*Saccharum officinarum* Linn.), sem a  
852 etapa de filtração, em julho de 2018, em um mercado local em Goiânia, Goiás. O caldo foi  
853 armazenado em garrafas plásticas (PET) com tampa e transportado sob refrigeração ( $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ )  
854 para o Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás,  
855 onde as fermentações foram promovidas.

### 856 **2.3 Atividade enzimática**

857 A atividade da carboximetilcelulase (CMCase-endoglucanase) foi avaliada através da  
858 incubação de 50  $\mu\text{L}$  do extrato bruto com 50  $\mu\text{L}$  de carboximetilcelulose (CMC) diluída em  
859 tampão de citrato de sódio a 1% (pH 4,8) por 60 minutos a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  em um termociclador (Bio -  
860 Rad, Berkeley, Califórnia, EUA, termociclador T100) (HANSEN et al., 2015). A atividade da

861 xilanase foi avaliada incubando 10 µl do extrato bruto com 90 µl de xilana Beechwood (Sigma  
862 Chemical Co., St. Louis, MO) diluído em tampão de citrato de sódio a 1% (pH 4,8) a 50 °C por  
863 um período de 5 min. As reações acima foram fervidas com 100 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico  
864 (DNS) para medir a quantidade de açúcares redutores liberados (RAMADA., 2010). Uma curva  
865 padrão para xilose foi preparada em concentrações de 0,3 a 4,2 mg. mL<sup>-1</sup>. Uma unidade de  
866 atividade (UI) correspondia a 1 µM de glicose (CMCase) ou xilana (xilanase) liberada por  
867 minuto.

#### 868 **2.4 Pré tratamento do caldo de cana, fermentação alcoólica e destilação**

869 O teor de sólidos solúveis foi determinado de acordo com a AOAC (2012) utilizando  
870 um refratômetro de bancada (Nova Instruments, Nova WYA-2S, Brasil) e os resultados  
871 expressos em ° BRIX. O caldo de cana foi diluído com água destilada para atingir 16 ° Brix.  
872 Foram realizadas três repetições de dois tratamentos, o primeiro considerado como controle, no  
873 qual o extrato enzimático bruto foi submetido à desnaturação enzimática por ebulição em água  
874 a 100 ± 1 °C por 10 minutos. O outro tratamento utilizou o extrato enzimático bruto com as  
875 enzimas ativas (sem desnaturação) na proporção de 1: 1000 (v / v). Os caldos de cana de açúcar  
876 + extrato (desnaturados no controle ou não) foram então incubados a 50 ± 1 °C em um agitador  
877 a 80 RPM por duas horas, após o resfriamento do caldo em temperatura ambiente até atingir 30  
878 °C ± 1 °C, foi inoculada a levedura. Foram adicionados, em Erlenmeyers de 2 litros, um litro  
879 de suco de cana e 10 g de levedura comercial da espécie *Saccharomyces cerevisiae*  
880 (aproximadamente 10<sup>14</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) e incubados em um agitador com temperatura controlada a  
881 30 ± 1 °C e agitação a 80 rpm por 48 horas. Alíquotas foram coletadas após 0, 2, 8, 16, 24, 32,  
882 40 e 48 horas. Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Após a fermentação, o  
883 mosto fermentado de cana foi destilado em frascos de fundo redondo com capacidade de 1 L,  
884 colocados em mantas aquecedoras e acoplados a uma coluna Vigreux de 60 cm e condensador  
885 de 50 cm. A temperatura para destilação foi mantida entre 90 e 92 ± 1 °C e o destilado foi

886 separado em três frações. As frações de cabeça, coração e cauda foram separadas por graduação  
887 alcoólica. A bebida final, fração coração, foi armazenada em frascos de vidro, com tampa e  
888 mantidas a temperatura ambiente para análise.

## 889 **2.5 Avaliação do processo fermentativo**

890 O pH e o teor de sólidos solúveis (TSS) foram determinados após 0, 2, 8, 16, 24, 32, 40  
891 e 48 horas, e o total de açúcares e compostos fenólicos após 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas. O  
892 pH foi medido utilizando um potenciômetro (Tecnal, TEC-51, Piracicaba, Brasil), com o  
893 eletrodo inserido diretamente na amostra, e o conteúdo total de sólidos solúveis (Brix),  
894 utilizando um refratômetro digital (Nova Instruments, Nova WYA-2S, Brasil), conforme  
895 recomendado pela AOAC (2012). O método fenol-sulfúrico foi utilizado para determinar o teor  
896 total de açúcar, de acordo com DUBOIS et al. (1956) Os compostos fenólicos totais foram  
897 determinados pelo método de FOLIN , CIOCALTEU (1927) e SOUSA et al. (2007).

## 898 **2.6 Análise de açúcares residuais, ácidos e etanol por HPLC**

899 Os cromatogramas da fração coração das cachaças produzidas com e sem tratamento  
900 enzimático do caldo de cana foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência  
901 (Shimadzu, Shimadzu LC-20, Japão), sendo o cromatógrafo equipado com um detector de  
902 índice de refração (RID) para a determinação dos açúcares e álcoois e um detector ultravioleta  
903 visível (UV-Vis) com a leitura a 210 nm. Uma coluna de Supelcogel Ca, operada a 80 °C com  
904 água deionizada (0,5 mL / min) foi usada para a separação.

## 905 **2.7 Determinação da concentração de etanol e caracterização química da cachaça por** 906 **Ressonância Magnética Nuclear H<sup>1</sup>**

907 Todas as análises de RMN foram realizadas a 20 °C usando um espectrômetro Bruker  
908 Avance III 500 operando a 11,75 T, observando H<sup>1</sup> a 500,13 MHz. O espectrômetro foi  
909 equipado com uma sonda TBI de quatro canais de detecção inversa de 5 mm (H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup>, C<sup>13</sup> e  
910 núcleo X), e o shimming e o pulso foram ajustados automaticamente. Para cada análise, 100 µL

911 da amostra de cachaça foram dissolvidos em 400 µL de óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) e 0,1% (m / v)  
912 de sal de sódio do ácido 2,2,3,3-d<sub>4</sub>-3- (trimetilsilil) propiônico (TMSP-*d*<sub>4</sub>) usado como padrão  
913 interno.

914 Os espectros utilizados para determinar o teor de álcool e congêneres nas cachaças  
915 foram adquiridos usando uma única sequência de pulso de excitação (zg Bruker), com 128  
916 varreduras, um tempo de aquisição de 3,3 s, pontos de domínio de tempo de 64 k distribuídos  
917 em uma largura espectral de 20 ppm , atraso de reciclagem de 20 s e ganho de 203. Os espectros  
918 foram processados aplicando uma função exponencial sobre o FID por um fator de ampliação  
919 de linha de 0,3 Hz. Os componentes foram quantificados pelo método de referência eletrônico  
920 ERETIC2, utilizando uma amostra padrão de sacarose Bruker de 2,0 mmolar de sacarose (aq).  
921 Os perfis químicos das cachaças foram caracterizados por experimentos de RMN de <sup>1</sup>H usando  
922 a sequência de pulsos Bruker *noesygppr1d* para suprimir os sinais de hidrogênio etanol (δ 1,20;  
923 3,65) e água (δ 4,80). Estes compostos foram observados com teores muito superiores aos  
924 demais componentes, comprometendo a observação dos sinais dos compostos minoritários.

925 Foram adquiridos 256 espectros com um tempo de aquisição de 3,3 s, pontos no  
926 domínio do tempo de 64 k distribuídos em uma largura espectral de 20 ppm, atraso de  
927 reciclagem de 20 s, tempo de mistura igual a 150 milissegundos e ganho do receptor de 203.  
928 Os espectros foram processados aplicando uma função exponencial sobre o FID por um fator  
929 de ampliação de linha de 0,3 Hz.

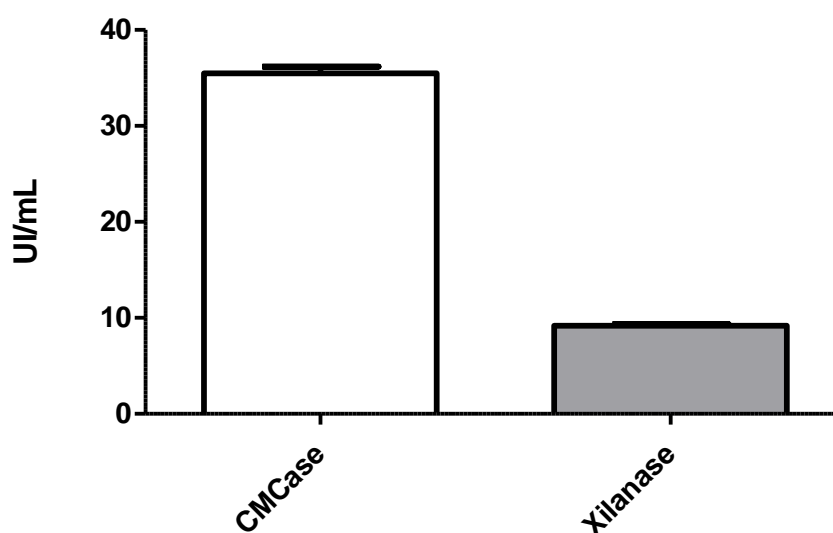
## 930 **2.8 Análises estatísticas**

931 Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de três repetições.  
932 Diferenças significativas entre as médias dos parâmetros foram calculadas pela análise de  
933 variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni com nível de significância p <0,05 pelo  
934 software Graph pad prism 5®.

### 935 3. Resultados e discussão

#### 936 3.1 Ensaios enzimáticos

937 A atividade de CMCase detectada foi de  $35.47 \pm 1.22 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$  e de xilanase  $9.18 \pm 0.28$   
938  $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Fig. 1). Ao utilizar *Streptomyces thermoalkaliphilus* WU et al. (2018) determinou a  
939 atividade de endoglicanase de  $19.5 \pm 1.5 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Valores bem menores foram determinados  
940 por MEDOUNI-HAROUNE et al. (2017), após 7 dias de fermentação usando *Streptomyces*  
941 SIM3 (atividade máxima de celulase  $1.44 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$  e xilanase  $11.2 \pm 0.12 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Estes  
942 resultados indicam a viabilidade da produção de enzimas lignolíticas através da fermentação  
943 semissólida por *Streptomyces* sp. I7.

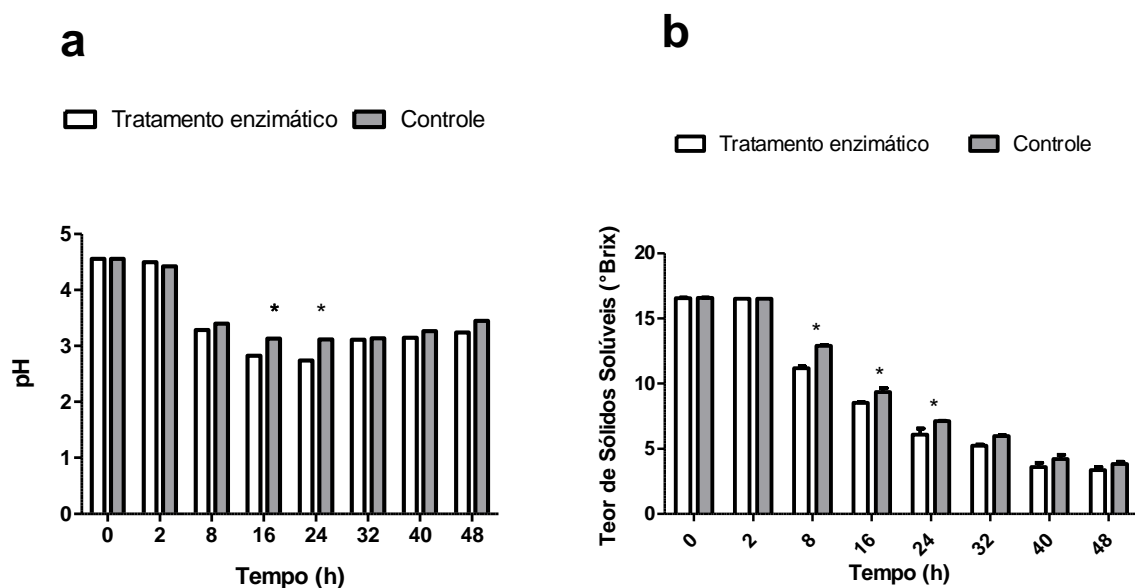


944 **Figura 1.** Atividades enzimáticas de CMCase e Xilanase nos extratos obtidos de *Streptomyces* sp. I7 utilizando  
945 farelo de trigo como substrato, após cinco dias de incubação a 30 °C.  
946  
947

#### 948 3.2 Avaliação do processo fermentativo

949 O valor do pH do meio de cultura foi acompanhado por até 48 de incubação. Um dos  
950 processos de incubação continha o extrato com enzimas ativas, enquanto no outro foi  
951 adicionando o mesmo volume de do extrato enzimas inativadas pelo calor (pré-tratamento a  
952 100 °C). Em ambos os processos fermentativos a redução do pH foi mais acentuada após 8

953 horas (Figura 2A) porém, houve diferença estatística nos tempos de 16 e 24 horas. Essa  
 954 diferença entre os tratamentos pode ser justificada pela ação enzimática gerando produtos  
 955 diferentes e a liberação de ácidos orgânicos provenientes da degradação do polissacarídeos  
 956 ligados à parede celular (KHOSRAVI; RAZAVI, 2020). Também foi verificado aumento do  
 957 pH no tratamento de controle após 40 e 48 horas de tempo de fermentação (Figura 2A).



958  
 959 Figura 2. Variação no pH (a) e no teor de sólidos solúveis (b) durante 48 horas de fermentação alcoólica do caldo  
 960 de cana tratado com extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. I7. \* representa diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )  
 961 entre os tratamentos.

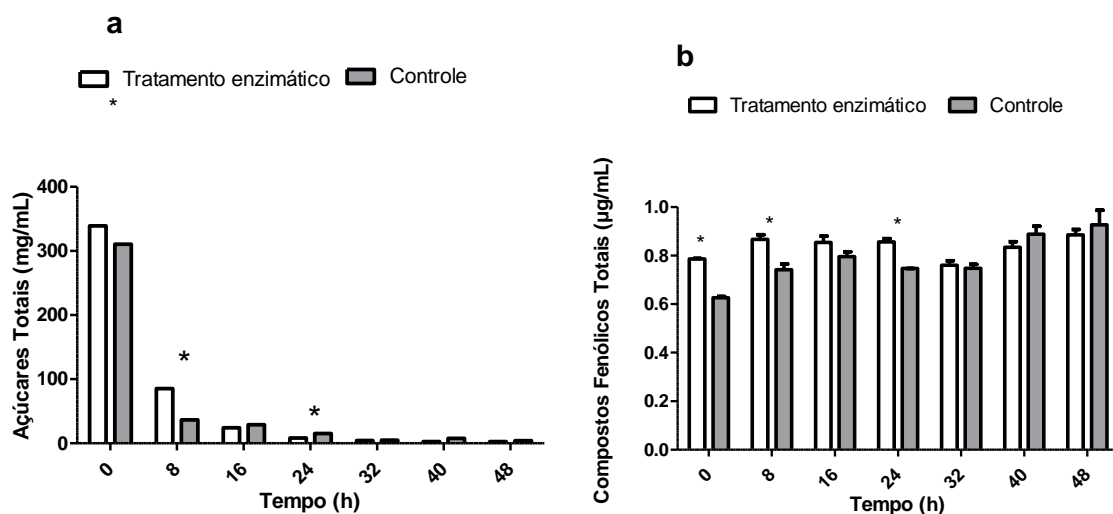
962  
 963 O pH das fermentações industriais está na faixa de 4,5 a 5,5, visando reduzir a carga  
 964 microbiológica de microrganismos contaminantes, durante o estágio final da fermentação o pH  
 965 se aproxima de 3,5. A redução do pH é característica dos processos fermentativos, uma vez que  
 966 há um aumento na concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e na produção de ácidos orgânicos  
 967 como ácido lático, ácido etanoico e ácido succínico (AQUARONE et al., 2001; RESENDE  
 968 OLIVEIRA et al., 2018).

969 Em relação ao TSS, não houve variação durante as duas primeiras horas de fermentação.  
 970 Entretanto, entre os tratamentos, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas  
 971 após 8, 16 e 24 horas. Além disso, foram encontrados valores menores no conteúdo de sólidos

972 solúveis no tratamento enzimático após 32, 40 e 48 horas em comparação com os valores  
973 encontrados para o tratamento não enzimático, embora a diferença não tenha sido significativa  
974 (Figura 2B). A manutenção do pH e do conteúdo do TSS nas duas primeiras horas de  
975 fermentação é justificada por as leveduras estarem na fase lag ou adaptação que começa após a  
976 inoculação. Durante este período ocorrem ajustes nas condições físicas de cultivo e na  
977 disponibilidade de nutrientes. À medida que a levedura se adapta ao meio, ela pode sintetizar  
978 enzimas e só então começar a metabolizar os nutrientes do meio e multiplicar-se (ROLFE et  
979 al., 2012).

980 A redução do conteúdo de TSS durante a fermentação é um comportamento esperado e  
981 comportamentos inesperados podem sugerir a má condução do processo, como o controle de  
982 temperatura inadequado ou contaminação por outros microrganismos (SANTOS, 2010). De  
983 acordo com LU et al. (2018) a redução do TSS está relacionada ao crescimento celular e ao  
984 consumo de açúcar pela levedura para conversão em etanol.

985 Os açúcares totais apresentaram uma redução de 74% ( $339,06 \pm 1,70$  para  $85,06 \pm 4,54$   
986  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), nas primeiras oito horas de fermentação no tratamento enzimático comparado com  
987 uma redução de  $310.37 \pm 1.59$  para  $36.50 \pm 1.95 \text{ mg.mL}^{-1}$  no tratamento controle (88%). O  
988 tratamento contendo enzimas ativas deve ter atuado sobre polissacarídeos presentes no caldo  
989 de cana, resultando numa maior quantidade de açúcares redutores, levando a uma maior  
990 quantidade nas primeiras horas de fermentação. Comparando-se os tratamentos, observou-se  
991 diferença estatisticamente significativa após 0, 8 e 24 horas de fermentação ( $p < 0,05$ ) (Figura  
992 3a).



993 **Figura 3.** Concentração de açúcares totais ( $\text{mg. mL}^{-1}$ ) (a) e Concentração de compostos fenólicos totais (b). ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) durante 48 horas de fermentação alcoólica do caldo de cana tratado com extrato enzimático bruto de *Streptomyces sp. 17* \* representa diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

994

995

996

997

998 O caldo de cana contém de 0,85 a 1,45% de sólidos solúveis na forma de açúcares não

999 redutor, proteínas, polissacarídeos e ceras (CHEN; CHOU, 1993). O caldo de cana contém de

1000 3 a 5% de sólidos solúveis na forma de corantes, precursores de cores. Possui ainda cerca de

1001 0,85-1,45% de sólidos solúveis na forma de açúcares, proteínas, polissacarídeos e ceras. Os

1002 Polissacarídeos presentes no caldo de cana podem ser nativos da planta de cana-de-açúcar (por

1003 exemplo, hemicelulose) ou podem ser produzidos por ação bacteriana ou nas etapas de

1004 processamento (dextrana) Este produtos alteram a viscosidade do caldo de cana e reduzem a

1005 produtividade nas usinas (CUDDIHY; PORRO; RAUH, 2001; GODSHALL;

1006 VERCELLOTTI; TRICHE, 2002; IMRIE; TILBURY, 1972).

1007 O caldo de cana-de-açúcar contém compostos fenólicos que são pigmentos vegetais de

1008 baixo peso molecular que podem estar ligados a polissacarídeos (GODSHALL, 1999). Os

1009 compostos fenólicos totais também apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos

1010 após 0, 8 e 24 horas (Figura 3B). As cachaças apresentaram grande variação no perfil dos

1011 compostos fenólicos e, conseqüentemente, atividades antioxidantes muito diferentes, de acordo

1012 com os compostos presentes e sua capacidade de complexidade metálica, principalmente com  
1013 cobre (BETTIN et al., 2002).

1014 Compostos fenólicos são metabólitos vegetais secundários que podem formar  
1015 complexos com componentes da parede celular, proteínas, polissacarídeos, de fibras ou lipídios.  
1016 Os compostos fenólicos insolúveis geralmente não são extraídos com solventes utilizados na  
1017 preparação de extratos para quantificação dos compostos fenólicos, nem quantificados na  
1018 análise quantitativa dos fenólicos, uma vez que permanecem retidos na matriz alimentar  
1019 (CHENG et al., 2014; JAKOBEK, 2015; PEREZ-JIMENEZ; DIAZ-RUBIO; SAURA-  
1020 CALIXTO, 2013). Ao utilizar somente solventes para a extração de compostos fenólicos,  
1021 DOMINGUEZ-RODRIGUEZ; MARINA , PLAZA (2017) verificou que os compostos  
1022 fenólicos ligados à macromoléculas da parede celular permaneceram nos resíduos. Assim,  
1023 pode-se inferir que o aumento da concentração de açúcares totais e compostos fenólicos no  
1024 caldo de cana tratado enzimático, ocorreu devido à hidrólise de polissacarídeos e consequente  
1025 liberação dos compostos fenólicos.

### 1026 **3.3 Perfil de açúcares residuais, ácidos orgânicos e etanol por HPLC**

1027 A Tabela 1 apresenta os açúcares residuais, ácidos orgânicos e álcoois detectados e  
1028 quantificados na cachaça produzida.

1029

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036 **Tabela 1.** Perfil químico da fração coração das cachaças produzidas com e sem tratamento  
 1037 enzimático com extrato bruto de *Streptomyces* sp. I7 após 48 horas de fermentação com  
 1038 *Saccharomyces cerevisiae* obtidos por cromatografia líquida de alta performance e ressonância  
 1039 magnética nuclear de  $H^1$ .

Componentes	Cachaça com tratamento enzimático	Cachaça sem tratamento enzimático
Sacarose	1.96 ± 0.8	2.76 ± 0.3
Glicose	17.46 ± 0.2	61.61 ± 0.2
Frutose	81.48 ± 0.4	423.69 ± 1.3
Ácido lático	0.72 ± 1.2	0.44 ± 1.18
Ácido propiônico	0.10 ± 0.1	0.12 ± 1.78
Glicerol	42.75 ± 2.5	46.50 ± 3.45
Etanol	339.72 ± 1.1	289.23 ± 1.8
Teor alcóolico (%) *	43.1%	37.1%
Etanol (g.L <sup>-1</sup> ) *	340.04 ± 1.1	292.80 ± 0.9

1040 Concentração em g.L<sup>-1</sup>. \* resultados obtidos por ressonância magnética nuclear  $H^1$  Demais  
 1041 resultados obtidos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.  
 1042

1043 Em relação aos açúcares residuais detectados, verificou-se redução de sacarose, glicose  
 1044 e frutose com a utilização do pré-tratamento enzimático. Valores de açúcares residuais  
 1045 detectados neste trabalho são bem menores do que os detectados por VIDAL et al. (2013b) ao  
 1046 avaliar o impacto da suplementação de nitrogênio em meios fermentativos. A redução desses  
 1047 três açúcares residuais deve-se, possivelmente, ao maior consumo destes e corrobora a maior  
 1048 concentração de etanol quando comparados os tratamentos.

1049 Quanto à quantificação dos ácidos orgânicos, não houve diferença entre os valores para  
 1050 o ácido propiônico. Em relação ao ácido lático, estes foram maiores no tratamento enzimático.  
 1051 Propionato é produzido a partir da redução de piruvato com lactato como produto intermediário:  
 1052 o primeiro lactato é produzido a partir da redução de piruvato por catálise com lactato

1053 desidrogenase; em seguida, o lactato é reduzido a propionato por propionato desidrogenase  
1054 (LEE; SALERNO; RITTMANN, 2008). FENG et al. (2014) demonstraram a relação entre o  
1055 potencial de oxidação do meio e a produção de propionato. Esta razão pode ser alterada pelo  
1056 número de compostos fenólicos presentes no meio no tratamento com atividade enzimática. Em  
1057 relação à produção de ácido láctico, isso pode ser influenciado pelo tipo de substrato utilizado,  
1058 pelas condições de pré-tratamento, pH, temperatura, etc.(ZHOU et al., 2018).

1059 Comparando-se a concentração de etanol entre os tratamentos, foi produzido mais etanol  
1060 no processo fermentativo com o tratamento enzimático. Esse fato foi verificado tanto pela  
1061 análise cromatográfica quanto pelas análises da RMN. Comparando-se a concentração de etanol  
1062 entre os tratamentos, foi produzido mais etanol no processo fermentativo com o tratamento  
1063 enzimático. Esse fato foi verificado tanto pela análise cromatográfica quanto pelas análises por  
1064 RMN.

1065 Outro possível mecanismo que justificaria a maior produção de etanol no processo  
1066 fermentativo com o tratamento enzimático, poderia ser a redução de espécies reativas de  
1067 oxigênio que ao reagirem com os compostos fenólicos liberados, reduziriam o estresse  
1068 oxidativo (CHEYNIER et al., 2002).

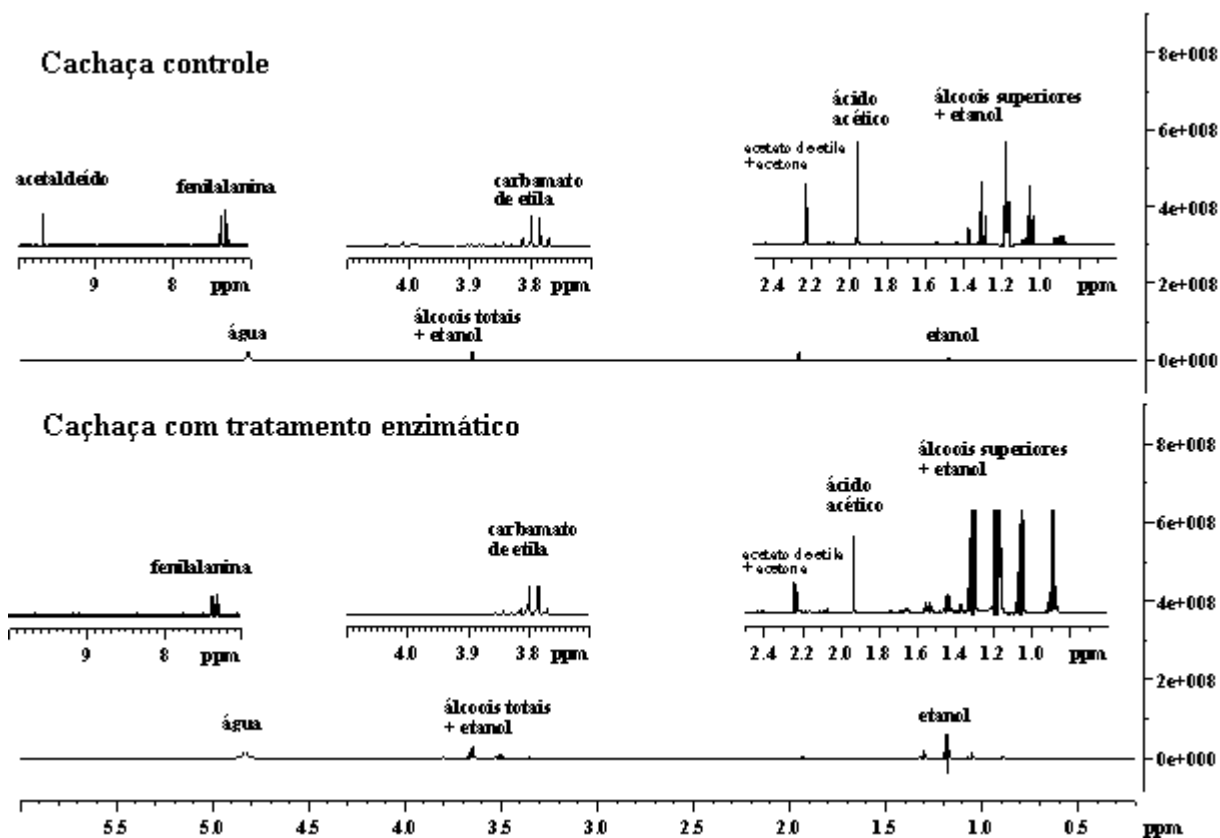
1069 A presença de compostos fenólicos e nitrogenados favoreceu a produção de etanol e a  
1070 fermentação de xilose XUE et al. (2018). Já o trabalho de NGAMSIRISOMSAKUL et al.  
1071 (2019) verificou o aumento de 7,1 vezes na produção de etanol por *Chlorella* sp. através do  
1072 tratamento hidrotérmico associado a ação de enzimas amilolíticas.

1073 O Glicerol é o segundo álcool mais abundante produzido pelas leveduras durante a  
1074 fermentação de açúcar, uma vez que mantém a osmoregulação e o equilíbrio redox, sendo ainda  
1075 responsável pelo sabor adocicado e viscosidade em vinhos mas também foram identificados em  
1076 cachaças (GARCIA et al., 2015; HATZAKIS; ARCHAVLIS; DAIS, 2007; HO et al., 2018). A  
1077 principal razão pela qual as leveduras sintetizam e acumulam glicerol intracelularmente é

1078 devido às suas propriedades protetoras contra o estresse, particularmente o estresse hiper  
1079 osmótico e térmico. Além disso, a formação dependente de elétrons de glicerol a partir do  
1080 intermediário metabólico central dihidroxiacetona fosfato (DHAP) também pode servir como  
1081 um coletor redox favorecendo a reoxidação do  $\text{NAD}^+$  citosólico. O metabolismo de síntese e  
1082 as funções do glicerol foram descritos para *S. Cerevisiae* (HOHMANN, 2015; STRUCKO et  
1083 al., 2018). Uma produção maior de glicerol durante a fermentação alcoólica é observada quando  
1084 reoxidação do NADH em  $\text{NAD}^+$  é diminuída, quando por exemplo, o acetaldeído se encontra  
1085 ligado ao bissulfito, de modo que ele não pode mais servir como acceptor de elétrons para  
1086 NADH citosólico (NEUBERG, 1918). Tal fato pode ter contribuído para uma maior produção  
1087 de glicerol no tratamento controle e conseqüentemente menor rendimento na produção de  
1088 etanol.

### 1089 **3.4 Perfil químico do destilado por RMN**

1090 No comparativo entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de cachaça com o  
1091 tratamento enzimático e sem tratamento nota-se a presença de região espectral entre  $\delta$  2,0-0,8,  
1092 caracterizada pela presença dos sinais dos hidrogênios de álcoois alifáticos (Figura 4). Em  $\delta$   
1093 0,89, foi identificado um tripleto que foi atribuído aos hidrogênios metílicos ( $-\text{CH}_3$ ) do 1-  
1094 propanol. Seu isômero, 2-propanol (álcool isopropílico) foi identificado pelo duplete em  $\delta$  1,15,  
1095 sinal referente aos hidrogênios metílicos, quimicamente equivalentes. Em  $\delta$  1,07, o tripleto  
1096 intenso foi caracterizado como referente aos hidrogênios metílicos do etanol. Os isômeros 1 e  
1097 2-butanol foram caracterizados pelos complexos padrões de sinais entre  $\delta$  1,70-1,20,  
1098 decorrentes dos hidrogênios diastereotópicos e enantiotópicos. O 1-pentanol (álcool amílico),  
1099 foi caracterizado por três conjuntos de sinais em  $\delta$  1,56; 1,33; 0,90. Os demais sinais dos álcoois  
1100 foram atribuídos na faixa espectral entre  $\delta$  4,0-3,4, característica de hidrogênios de carbonos  
1101 ligados diretamente a átomos altamente eletronegativos (ex: HC-OH).



1102

1103 **Figura 4.** Comparação entre as frações coração dos destilados obtidos por processos com e sem ação enzimática.

1104

1105 Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , também foram identificados sinais de ácidos orgânicos,

1106 como o acético e láctico, atribuídos em  $\delta$  1,92 e 4,4, respectivamente. A propanona (acetona) foi

1107 caracterizada por um simpleto em  $\delta$  2,23, próximo ao simpleto do acetato de etila, em  $\delta$  2,04.

1108 Outro éster identificado foi o carbamato de etila (uretano) por um tripleto próximo a  $\delta$  1,3 e um

1109 quarteto em  $\delta$  3,9. O acetaldeído (etanal) foi caracterizado por um duplete em  $\delta$  2,20 e por um

1110 quarteto em  $\delta$  9,70. A glicose foi atribuída por dois dupletos com baixas intensidade em  $\delta$  5,21

1111 e 4,6. Na região de alta desblindagem, o sistema de spins dos hidrogênios aromáticos da

1112 fenilalanina foi atribuído por um duplete em  $\delta$  7,3 e dois tripletos em 7,36 e  $\delta$  7,42.

1113 A quantificação dos compostos presentes e os valores máximos permitidos estão presentes na

1114 tabela 2.

1115 **Tabela 2.** Quantificação dos congêneres encontrados nas cachaças produzidas com o

1116 tratamento enzimático e o controle utilizando o método ERETIC

Componentes	Cachaça com tratamento enzimático	Cachaça Controle	Valores máximos <sup>8</sup>
Acidez <sup>1</sup>	23,1 ± 1,3	91,1 ± 1,1	150
Ésteres totais <sup>2</sup>	12,2 ± 0,3	28,6 ± 0,4	200
Aldeídos totais <sup>3</sup>	6,0 ± 0,8	4,12 ± 0,3	30
Furfural e hidroximetilfurfural <sup>4</sup>	Traços (não quantificável)	Traços (não quantificável)	5
Metanol <sup>5</sup>	6,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	20
Carbamato de etila <sup>6</sup>	4,0 ± 0,2	7,8 ± 0,3	150
Acroleína <sup>7</sup>	Traços (não quantificável)	Traços (não quantificável)	360

1117 1: Acidez volátil expressa em ácido etanóico, em mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 2: Ésteres totais expressos como  
1118 acetato de etila, em mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 3: Aldeídos totais como acetaldeído, em mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool  
1119 anidro. em mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 5: Metanol não mais do que 20,0 mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 6:  
1120 Carbamato de etila não superior a 150µg.L<sup>-1</sup>.7: Acroleína (2-propenal) não superior a 5 mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool  
1121 anidro. 8: Valores máximos em mg.100 mL<sup>-1</sup> conforme determinado pela INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 13, de  
1122 29 de junho de 2005.  
1123

1124 Neste estudo observou-se redução de 74% na acidez através do tratamento enzimático  
1125 em relação ao controle. Algumas espécies de *S. cerevisiae* podem reduzir a acidez volátil quando  
1126 o teor de álcool é superior a 11% (v/v) (TESFAW; ASSEFA, 2014). A Acidez elevada é uma  
1127 das principais causas da rejeição sensorial da cachaça pelos consumidores (ODELLO et al.,  
1128 2009). Assim, pode-se inferir que a cachaça tratada com enzima poderia ser melhor aceita  
1129 sensorialmente.

1130 O ácido etanóico também foi detectado, juntamente com outros ácidos orgânicos  
1131 voláteis, como ácido láctico e ácido propiônico, que contribuem para o aroma das bebidas  
1132 destiladas, uma vez que são fixadores de vários compostos aromáticos, e dão corpo às bebidas

1133 destiladas (LÉAUTÉ, 1990). O ácido etanóico foi determinado conforme mostrado na tabela 1.  
1134 A cachaça tratada com enzima apresentou maior acidez volátil (2,22) do que o controle (0,763).  
1135 Essa diferença pode estar relacionada à produção de outros compostos orgânicos voláteis não  
1136 identificados nas análises realizadas. A acetona também foi encontrada tanto nas amostras de  
1137 cachaça tratada com enzimas quanto no controle.

1138 Com relação aos ésteres, foi demonstrado que o tratamento enzimático favoreceu a  
1139 redução dos ésteres presentes na cachaça. Ésteres geralmente adicionam um aroma fresco e  
1140 frutado às bebidas, mas em quantidades excessivas, eles também podem levar a sabores  
1141 indesejáveis (LIU; HOLLAND; CROW, 2004). Um perfil de ésteres bem equilibrado é,  
1142 portanto, fundamental para os produtos fermentados, para produzir um sabor agradável. Os  
1143 principais contribuintes para o sabor de um produto são os ésteres de acetato, incluindo acetato  
1144 de etila (aroma doce), acetato isoamílico (banana) e acetato de feniletila (aroma floral)  
1145 (DZIALO et al., 2017; VERSTREPEN et al., 2003).

1146 O aldeído acético foi identificado e quantificado em ambos os tratamentos, sendo  
1147 encontrado em maior concentração na cachaça tratada com enzima. No entanto, ambas as  
1148 cachaças apresentaram valores para aldeídos abaixo do valor máximo determinado pela  
1149 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 13, de junho de 2005 (Tabela 2). Acetaldeído e outros aldeídos  
1150 (fórmico, butírico, isobutírico, valérico e capróico) foram encontrados em várias bebidas  
1151 destiladas, geralmente presentes nas frações mais voláteis, sendo o acetaldeído geralmente  
1152 predominante. Acetaldeído tem um odor pungente que aumenta o sabor pungente das bebidas  
1153 (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991). Em geral, aldeídos com cadeias contendo menos de 8  
1154 átomos de carbono têm odores penetrantes, geralmente desagradáveis, que são considerados  
1155 indesejáveis. Por outro lado, aldeídos de cadeia longa são caracterizados por aromas agradáveis  
1156 (ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2011; LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2012). O acetaldeído é  
1157 formado durante a fermentação pela redução do etanol e seus teores elevados têm efeitos tóxicos

1158 associados a sintomas como náusea, sudorese, pulsação rápida, dores de cabeça e vômitos.  
1159 Também é conhecido como um composto cancerígeno (PFLAUM et al., 2016).

1160 Furfural e hidroximetilfural são aldeídos aromáticos resultantes da decomposição  
1161 química dos carboidratos, que podem resultar da pirólise da folhagem durante a colheita, o que  
1162 leva à desidratação parcial de uma pequena fração dos açúcares presentes. A desidratação  
1163 parcial das pentoses leva à formação de furfural (2-furfuraldeído) e à desidratação de hexoses  
1164 para hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furfuraldeído) (CHI et al., 2009). No presente  
1165 estudo, não foram detectados sinais de furfural ou hidroximetilfurfural nas condições analíticas  
1166 utilizadas das amostras. Furfural é tóxico para humanos induzindo dor, dor de garganta,  
1167 diarreia, vômito e dor de cabeça (J. ROHSENOW; HOWLAND, 2010; RUSU COLDEA et al.,  
1168 2011). Furfuraldeído também pode se originar durante o processo de destilação devido à  
1169 pirogênese da matéria orgânica depositada na parte inferior dos barris. Em cachaças  
1170 envelhecidas, o furfural pode vir da reação entre ácidos e seus polímeros originários da madeira  
1171 utilizada na construção dos barris (hemiceluloses) (CRUZ; CANAS; BELCHIOR, 2012;  
1172 YOKOYA, 1995).

1173 Além do etanol, as leveduras podem produzir outros álcoois conhecidos como álcoois  
1174 superiores, como, por exemplo: propanol, butanol, isobutanol e álcool amílico. A presença  
1175 desses álcoois nas cachaças é importante para seu caráter aromático, mas quando em excesso,  
1176 aumentam a toxicidade para o consumidor (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018;  
1177 LACHENMEIER; HAUPT; SCHULZ, 2008). Apesar de não terem sido quantificados é  
1178 possível observar na figura 4 um perfil diferente em relação a presença destes álcoois nos  
1179 tratamentos avaliados.

1180 Verificou-se que houve um aumento de seis vezes nas concentrações de metanol nas  
1181 cachaças tratadas com enzimas quando comparadas com a cachaça de controle. Apesar do  
1182 aumento, os níveis detectados obedeceram a Instrução normativa (BRASIL, 2005) Este

1183 composto pode ter origem durante a fermentação devido à ação das enzimas pécnicas presentes  
1184 na levedura, que atuam sobre o ácido galacturônico das partículas de bagaço de cana presentes  
1185 no meio (MOREIRA; NETTO; MARIA, 2012; TASLI et al., 2018). Estudos posteriores serão  
1186 realizados visando identificar a presença de pectinases no extrato enzimático.

1187         A presença de metanol em níveis elevados é indesejável por causa de sua toxicidade,  
1188 que causa distúrbios visuais, anormalidades no sistema nervoso central, como confusão, coma  
1189 ou até mesmo morte. Estas partículas sólidas podem ser eliminadas por filtração, tratamentos  
1190 químicos ou térmicos visando a floculação, coagulação e sedimentação dos coloides, tais etapas  
1191 não foram realizadas neste trabalho visando a presença de bagacilho no meio (SCHWAN et al.,  
1192 2001). Embora não haja relatos na literatura sobre o tratamento enzimático do caldo de cana-  
1193 de-açúcar por *Streptomyces* sp, pode-se deduzir que o aumento do teor de metanol pode ter sido  
1194 relacionado à ação do extrato enzimático

1195         Em relação ao carbamato de etila (CE), verificou-se redução de 48% nos níveis  
1196 comparando os tratamentos. O CE é encontrado em bebidas alcoólicas e resulta principalmente  
1197 da reação entre etanol e compostos contendo nitrogênio, como ureia, carbamoilfosfato e cianeto  
1198 (CHEN et al., 2017). Estes precursores são comumente gerados pelo metabolismo da arginina  
1199 por *Saccharomyces cerevisiae* ou pela presença de outros microrganismos durante a  
1200 fermentação, como bactérias lácticas (NOBREGA et al., 2015). É um composto cancerígeno e  
1201 genotóxico para muitas espécies, incluindo ratos, hamsters, macacos e humanos (VAZQUEZ  
1202 et al., 2017). Resultados semelhantes foram encontrados por ANDRADE SOBRINHO et al.  
1203 (2009) ao avaliar a qualidade das cachaças artesanais e atribuíram a ausência de carbamato de  
1204 etila ao processo de destilação e a separação correta das frações "cabeça", "coração" e "cauda".

1205         Não foram detectadas moléculas de acroleína, em ambos os tratamentos, pela  
1206 metodologia utilizada. A acroleína é um composto cancerígeno também conhecido como 2-  
1207 propenal. Formado durante a fermentação, é derivado da desidratação do glicerol ou produzido

1208 devido à contaminação bacteriana. É uma substância altamente mutagênica, e a exposição à  
1209 acroleína pode estar associada à patogênese do diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e a  
1210 indução do estresse mitocondrial/retículo endoplasmático (CHEN et al.; MOGHE et al., 2015).  
1211 Vapores de acroleína são utilizados no gás lacrimogêneo, muito irritantes para os olhos, nariz  
1212 e garganta, e podem estar associados com o aroma de pimenta (ZACARONI et al., 2011).

#### 1213 **4. Conclusão**

1214 O processo de fermentação semissólida de farelo de trigo com o *Streptomyces* sp. I7  
1215 produziu um extrato bruto com atividades de celulasas e xilanasas. Este extrato apresenta  
1216 potencial para subsequente purificação e produção com fins comerciais destas enzimas. A  
1217 aplicação destes extratos no pré-tratamento do caldo de cana promoveu o aumento dos açúcares  
1218 totais e de compostos fenólicos nos fermentados. Promoveu ainda o aumento da concentração  
1219 de etanol e do teor alcoólico. As análises por RMN das cachaças permitiram a identificação de  
1220 compostos minoritários e a redução da acidez volátil, ésteres totais e carbamato de etila e o  
1221 aumento dos aldeídos totais, gerando cachaças com diferentes perfis químicos. O pré-  
1222 tratamento enzimático teve impacto positivo no perfil químico e no rendimento da produção de  
1223 etanol, apresentando potencial para sua aplicação industrial seja na produção de cachaça ou  
1224 para a indústria de bioetanol.

#### 1225 **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1226 ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A. D.; BELLUCO, A. E. D. S. Chemical profile of sugarcane  
1227 spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. **Food Sci. Technol**,  
1228 v.31, n.2, p.355. 2011. Disponível em: em. doi: [http://dx.doi.org/10.1590/S0101-](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000200012)  
1229 [20612011000200012](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000200012)  
1230
- 1231 AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaca): Effects of  
1232 mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research**  
1233 **International**, v.85, p.76. 2016. Disponível em:

1234 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29544855>>. Acesso em. doi:  
1235 10.1016/j.foodres.2016.04.014  
1236  
1237 ANDRADE SOBRINHO, L. G. D.; CAPPELINI, L. T. D.; SILVA, A. A. D.; GALINARO,  
1238 C. A.; BUCHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Teores de carbamato de  
1239 etila em aguardentes de cana e mandioca: parte II. **Quimica Nova**, v.32, n.1, p.116. 2009.  
1240 Disponível em: em. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100022>  
1241  
1242 AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists:**  
1243 Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Washington DC, 2012.  
1244  
1245 BETTIN, S.; ISIQUE, W.; FRANCO, D.; ANDERSEN, M.; KNUDSEN, S.; SKIBSTED, L.  
1246 Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation  
1247 and radical scavenging. **European Food Research and Technology**, v.215, n.2, p.169. 2002.  
1248 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00217-002-0517-y>>. Acesso em. doi:  
1249 10.1007/s00217-002-0517-y  
1250  
1251 BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good Manufacturing  
1252 Practices, Hazard Analysis and Critical Control Point plan proposal for distilleries of cachaça.  
1253 **Sci agri**, v.75, n.5, p.432. 2018. Disponível em:  
1254 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162018000500432&nrm=iso)  
1255 [90162018000500432&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162018000500432&nrm=iso)>. Acesso em. doi: [http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2017-](http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0040)  
1256 [0040](http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0040)  
1257  
1258 BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005.** Aprovar o  
1259 Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente  
1260 de Cana e para Cachaça, em observância ao Anexo à presente Instrução Normativa. MAPA.  
1261 Brasília: Diário Oficial da União: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: 3 p.  
1262 2005.  
1263  
1264 \_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014.** UNIÃO, D. O. D. Brasília,  
1265 DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.  
1266  
1267 BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; DE CAMPOS, I. T. N.; DE FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M.  
1268 Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes.  
1269 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.3, p.598. 2013. Disponível em:  
1270 <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0193-3>  
1271 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12010-013-0193-3.pdf>>. Acesso em. doi:  
1272 10.1007/s12010-013-0193-3  
1273  
1274 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
1275 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
1276 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **Journal of Agriculture and**  
1277 **Environmental Sciences**, v.4, n.1, p.90. 2015. Disponível em: em. doi:  
1278 10.15640/jaes.v4n1a12  
1279  
1280 CHEN, D.; REN, Y.; ZHONG, Q.; SHAO, Y.; ZHAO, Y.; WU, Y. Ethyl carbamate in  
1281 alcoholic beverages from China: Levels, dietary intake, and risk assessment. **Food Control**,  
1282 v.72, p.283. 2017. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.047

1283  
1284 CHEN, H. J.; WANG, C. C.; CHAN, D. C.; CHIU, C. Y.; YANG, R. S.; LIU, S. H. Adverse  
1285 effects of acrolein, a ubiquitous environmental toxicant, on muscle regeneration and mass. **J**  
1286 **CACHEXIA SARCOPENI**, v.10, n.1, p.165. 2019. Disponível em:  
1287 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30378754>>. Acesso em. doi: 10.1002/jcsm.12362  
1288  
1289 CHEN, J. C.; CHOU, C. C. **Cane sugar handbook: a manual for cane sugar**  
1290 **manufacturers and their chemists**. John Wiley & Sons, 1993. ISBN 0471530379.  
1291  
1292 CHENG, A.; YAN, H.; HAN, C.; CHEN, X.; WANG, W.; XIE, C.; QU, J.; GONG, Z.; SHI,  
1293 X. Acid and alkaline hydrolysis extraction of non-extractable polyphenols in blueberries  
1294 optimisation by response surface methodology &nbsp;. **Czech J Food Sci**, v.32, n.No. 3,  
1295 p.218. 2014. Disponível em: em. doi: 10.17221/257/2013-cjfs  
1296  
1297 CHEYNIER, V.; ATANASOVA, V.; FULCRAND, H.; MAZAURIC, J.-P.; MOUTOUNET,  
1298 M. Oxygen in wine and its role in phenolic reactions during ageing. **Uses of Gases in**  
1299 **Winemaking.**, p.23. 2002. Disponível em: em. doi:  
1300  
1301 CHI, C.; ZHANG, Z.; CHANG, H.-M.; JAMEEL, H. Determination of Furfural and  
1302 Hydroxymethylfurfural Formed From Biomass Under Acidic Conditions. **Journal of Wood**  
1303 **Chemistry and Technology**, v.29, n.4, p.265. 2009. Disponível em:  
1304 <<https://doi.org/10.1080/02773810903096025>>. Acesso em. doi:  
1305 10.1080/02773810903096025  
1306  
1307 COUTURIER, M.; BENNATI-GRANIER, C.; URIO, M. B.; RAMOS, L. P.; BERRIN, J.-G.  
1308 Fungal Enzymatic Degradation of Cellulose. In: (Ed.). **Green Fuels Technology**: Springerv.  
1309 10.1007/978-3-319-30205-8\_6, 2016. cap. Chapter 6, p.133. (Green Energy and  
1310 Technology). ISBN 978-3-319-30203-4  
1311 978-3-319-30205-8.  
1312  
1313 CRUZ, S.; CANAS, S.; BELCHIOR, A. P. Effect of ageing system and time on the quality of  
1314 wine brandy aged at industrial-scale. **Ciência Téc. Vitiv**, v.27, n.2, p.83. 2012. Disponível  
1315 em: <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0254-](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)  
1316 [02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em. doi,  
1317 [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0254-](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)  
1318 [02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)  
1319  
1320 CUDDIHY, J. A.; PORRO, M. E.; RAUH, J. S. The presence of total polysaccharides in  
1321 sugar production and methods for reducing their negative effects. **J Am Soc Sugar Technol**,  
1322 v.21, p.73. 2001. Disponível em: em. doi,  
1323  
1324 DE SOUZA, A. P. G.; DE ARAÚJO VICENTE, M.; KLEIN, R. C.; FIETTO, L. G.;  
1325 COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. D. C. F.; ARAÚJO, L. D.; DA SILVA, P. H. A.;  
1326 BOUILLET, L. E. M.; CASTRO, I. M. Strategies to select yeast starters cultures for  
1327 production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**,  
1328 v.101, n.2, p.379. 2012. Disponível em: em. doi,  
1329  
1330 DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, G.; MARINA, M. L.; PLAZA, M. Strategies for the extraction  
1331 and analysis of non-extractable polyphenols from plants. **Journal of Chromatography A**,

1332 v.1514, p.1. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778531>>.  
1333 Acesso em. doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.066  
1334

1335 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric  
1336 Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v.28,  
1337 n.3, p.350. 1956. Disponível em: em. doi: 10.1021/ac60111a017  
1338

1339 DZIALO, M. C.; PARK, R.; STEENSELS, J.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J.  
1340 Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS**  
1341 **Microbiology Review**, v.41, n.Supp\_1, p.S95. 2017. Disponível em:  
1342 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28830094>>. Acesso em. doi: 10.1093/femsre/fux031  
1343

1344 FENG, Y.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; CHEN, S. Enhanced anaerobic digestion of waste  
1345 activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. **Water Research**, v.52, p.242.  
1346 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275106>>. Acesso em. doi:  
1347 10.1016/j.watres.2013.10.072  
1348

1349 FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J.**  
1350 **biol. Chem**, v.73, n.2, p.627. 1927. Disponível em: em. doi,  
1351

1352 GAMA, A. R.; BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; DE SOUZA, G. R. L.;  
1353 CARNEIRO, L. C.; BATAUS, L. A. M. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel  
1354 bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**,  
1355 v.n/a, n.n/a, p.e2934. 2019. Disponível em:  
1356 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
1357 10.1002/btpr.2934  
1358

1359 GARCIA, A. C.; SERAFIM, F. A. T.; KEUKELEIRE, D. D.; FRANCO, D. W. Evaluation of  
1360 Glycerol Profiles in Sugarcane Spirits (Cachaças). **Journal of the Brazilian Chemical**  
1361 **Society**, v.26, p.57. 2015. Disponível em:  
1362 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532015000100057&nrm=iso)  
1363 [50532015000100057&nrm=iso](http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140213)>. Acesso em. doi: [http://dx.doi.org/10.5935/0103-](http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140213)  
1364 [5053.20140213](http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140213)  
1365

1366 GIL, A. M.; DUARTE, I. F. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of  
1367 wine, beer, and spirits. In: (Ed.). **Modern magnetic resonance**: Springer, 2008. p.1689.  
1368

1369 GODSHALL, M.; VERCELLOTTI, J. R.; TRICHE, R. Effect of macromolecules on sugar  
1370 processing: comparison of cane and beet macromolecules. Avh Association 9th Symposium,  
1371 Reims, March, France, 2002. p.23.  
1372

1373 GODSHALL, M. A. Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white  
1374 sugar. Proceedings of sixth international symposium organized by association Andrew van  
1375 Hook (AvH), 1999. p.28.  
1376

1377 GRANATO, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.;  
1378 ALABURDA, J. Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial  
1379 Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers. **Food Research International**, v.60,  
1380 p.212. 2014. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.foodres.2013.09.044

1381  
1382 GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.;  
1383 BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable  
1384 and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v.41, n.7, p.633. 2016. Disponível em:  
1385 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211037>>. Acesso em. doi:  
1386 10.1016/j.tibs.2016.04.006  
1387  
1388 HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B.  
1389 Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and  
1390 submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.50, n.9, p.1327. 2015. Disponível em: em.  
1391 doi,  
1392  
1393 HATZAKIS, E.; ARCHAVLIS, E.; DAIS, P. Determination of Glycerol in Wines Using 31P-  
1394 NMR Spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.84, n.7, p.615. 2007.  
1395 Disponível em: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/s11746-007-1099-4>>.  
1396 Acesso em. doi: 10.1007/s11746-007-1099-4  
1397  
1398 HO, P.-W.; KLEIN, M.; FUTSCHIK, M.; NEVOIGT, E. Glycerol positive promoters for  
1399 tailored metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast**  
1400 **Research**, v.18, n.3. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsyr/foy019>>. Acesso  
1401 em: 5/19/2020. doi: 10.1093/femsyr/foy019  
1402  
1403 HOHMANN, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. **Current**  
1404 **Genetics**, v.61, n.3, p.373. 2015. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-](https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0)  
1405 [0](https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0)>. Acesso em. doi: 10.1007/s00294-015-0475-0  
1406  
1407 IMRIE, F.; TILBURY, R. Polysaccharides in sugar cane and its products. **Sugar Technology**  
1408 **Reviews**, v.1, p.291. 1972. Disponível em: em. doi,  
1409  
1410 J. ROHSENOW, D.; HOWLAND, J. The Role of Beverage Congeners in Hangover and  
1411 Other Residual Effects of Alcohol Intoxication: A Review. **Curr Drug Abuse Rev**, v.3, n.2,  
1412 p.76. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712591>>. Acesso em.  
1413 doi: 10.2174/1874473711003020076  
1414  
1415 JAGTAP, R. S.; MAHAJAN, D. M.; MISTRY, S. R.; BILAIYA, M.; SINGH, R. K.; JAIN,  
1416 R. Improving ethanol yields in sugarcane molasses fermentation by engineering the high  
1417 osmolarity glycerol pathway while maintaining osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.  
1418 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.2, p.1031. 2019. Disponível em:  
1419 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30488283>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-018-  
1420 9532-1  
1421  
1422 JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food**  
1423 **Chemistry**, v.175, p.556. 2015. Disponível em:  
1424 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577120>>. Acesso em. doi:  
1425 10.1016/j.foodchem.2014.12.013  
1426  
1427 KHOSRAVI, A.; RAZAVI, S. H. The role of bioconversion processes to enhance  
1428 bioaccessibility of polyphenols in rice. **Food Bioscience**, v.35, p.100605. 2020. Disponível

1429 em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429219310788>>. Acesso em.  
1430 doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100605>  
1431

1432 LACHENMEIER, D. W.; HAUPT, S.; SCHULZ, K. Defining maximum levels of higher  
1433 alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products. **Regulatory Toxicology and**  
1434 **Pharmacology**, v.50, n.3, p.313. 2008. Disponível em:  
1435 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295386>>. Acesso em. doi:  
1436 10.1016/j.yrtph.2007.12.008  
1437

1438 LAW, J. W.-F.; PUSPARAJAH, P.; AB MUTALIB, N.-S.; WONG, S. H.; GOH, B.-H.; LEE,  
1439 L.-H. A review on mangrove actinobacterial diversity: The roles of *streptomyces* and novel  
1440 species discovery. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v.2, n.1. 2019. Disponível  
1441 em: em. doi: doi.org/10.36877/pmmb.a0000024  
1442

1443 LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.41,  
1444 n.1, p.90. 1990. Disponível em: em. doi,  
1445

1446 LEE, H. S.; SALERNO, M. B.; RITTMANN, B. E. Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub>  
1447 production in glucose fermentation. **Environmental Science and Technology**, v.42, n.7,  
1448 p.2401. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18504972>>. Acesso  
1449 em. doi: 10.1021/es702610v  
1450

1451 LIU, S. Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy  
1452 products: a review. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.923. 2004. Disponível em:  
1453 em. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.02.010  
1454

1455 LÓPEZ-VÁZQUEZ, C.; ORRIOLS, I.; PERELLÓ, M.-C.; DE REVEL, G. Determination of  
1456 aldehydes as pentafluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME-GC/MS.  
1457 **Food Chemistry**, v.130, n.4, p.1127. 2012. Disponível em: em. doi,  
1458

1459 LU, Y.; CHAN, L.-J.; LI, X.; LIU, S.-Q. Effects of sugar concentration on mango wine  
1460 composition fermented by *Saccharomyces cerevisiae*  
1461 MERIT.ferm. **International Journal of Food Science & Technology**, v.53, n.1, p.199. 2018.  
1462 Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.13574>>. Acesso em.  
1463 doi: 10.1111/ijfs.13574  
1464

1465 MEDOUNI-HAROUNE, L.; ZAIDI, F.; MEDOUNI-ADRAR, S.; KERNOU, O. N.;  
1466 AZZOUZ, S.; KECHA, M. Bioconversion of Olive Pomace by Submerged Cultivation of  
1467 *Streptomyces* sp. S1M3I. **Proc Indian Natl Sci Acad B Biol Sci**, v.88, n.4, p.1425. 2017.  
1468 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40011-017-0880-x>>. Acesso em. doi:  
1469 10.1007/s40011-017-0880-x  
1470

1471 MOGHE, A.; GHARE, S.; LAMOREAU, B.; MOHAMMAD, M.; BARVE, S.; MCCLAIN,  
1472 C.; JOSHI-BARVE, S. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human  
1473 disease. **Toxicological Sciences**, v.143, n.2, p.242. 2015. Disponível em:  
1474 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628402>>. Acesso em. doi: 10.1093/toxsci/kfu233  
1475

1476 MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; MARIA, C. A. B. D. A fração volátil das aguardentes  
1477 de cana produzidas no Brasil. **Química Nova**, v.35, n.9, p.1819. 2012. Disponível em: em.  
1478 doi: 10.1590/s0100-40422012000900022  
1479

1480 NEUBERG, C. **Natürliche und erzwungene Glycerinbildung bei der alkoholischen**  
1481 **Gärung**. 1918.  
1482

1483 NGAMSIRISOMSAKUL, M.; REUNGSANG, A.; LIAO, Q.; KONGKEITKAJORN, M. B.  
1484 Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment  
1485 and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v.141, p.482. 2019. Disponível em:  
1486 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148119304847>>. Acesso em. doi:  
1487 <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.008>  
1488

1489 NOBREGA, I. C.; PEREIRA, G. E.; SILVA, M.; PEREIRA, E. V.; MEDEIROS, M. M.;  
1490 TELLES, D. L.; ALBUQUERQUE, E. C., JR.; OLIVEIRA, J. B.; LACHENMEIER, D. W.  
1491 Improved sample preparation for GC-MS-SIM analysis of ethyl carbamate in wine. **Food**  
1492 **Chemistry**, v.177, p.23. 2015. Disponível em:  
1493 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660853>>. Acesso em. doi:  
1494 10.1016/j.foodchem.2014.12.031  
1495

1496 NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. **Volatile compounds in food and**  
1497 **beverages**, p.547. 1991. Disponível em: em. doi:  
1498

1499 ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; SILVA, A. A. D.; GALINARO, C. A.;  
1500 FRANCO, D. W. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1839. 2009.  
1501 Disponível em: em. doi: 10.1590/s0100-40422009000700029  
1502

1503 PEREZ-JIMENEZ, J.; DIAZ-RUBIO, M. E.; SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable  
1504 polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutr**  
1505 **Res Rev**, v.26, n.2, p.118. 2013. Disponível em:  
1506 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930641>>. Acesso em. doi:  
1507 10.1017/S0954422413000097  
1508

1509 PFLAUM, T.; HAUSLER, T.; BAUMUNG, C.; ACKERMANN, S.; KUBALLA, T.; REHM,  
1510 J.; LACHENMEIER, D. W. Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update.  
1511 **Archives of Toxicology**, v.90, n.10, p.2349. 2016. Disponível em:  
1512 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27353523>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00204-016-  
1513 1770-3  
1514

1515 PORTUGAL, C. B.; DE SILVA, A. P.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. How  
1516 native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? **Food**  
1517 **Research International**, v.91, p.18. 2017. Disponível em:  
1518 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916305555>>. Acesso em. doi:  
1519 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.022>  
1520

1521 RIBEIRO, M. L. D.; FERREIRA, O. E.; TEIXEIRA, V.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J.  
1522 R. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência**  
1523 **Agrônômica**, v.48, p.458. 2017. Disponível em:

1524 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-)  
1525 [6690.2017000300458&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-6690.20170053)>. Acesso em. doi: doi.org/10.5935/1806-6690.20170053  
1526  
1527 RUSU COLDEA, T. E.; SOCACIU, C.; PARV, M.; VODNAR, D. Gas-Chromatographic  
1528 Analysis of Major Volatile Compounds Found in Traditional Fruit Brandies from  
1529 Transylvania, Romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v.39, n.2,  
1530 p.109. 2011. Disponível em: em. doi: 10.15835/nbha3926053  
1531  
1532 SANTOS, F. S. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas.**  
1533 UFV, 2010.  
1534  
1535 SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; DA SILVA, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.  
1536 E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie Van**  
1537 **Leeuwenhoek**, v.79, n.1, p.89. 2001. Disponível em: em. doi,  
1538  
1539 SERAFIM, F. A.; LANÇAS, F. M. Sugarcane spirits (cachaça) quality assurance and  
1540 traceability: An analytical perspective. In: (Ed.). **Production and Management of**  
1541 **Beverages**: Elsevier, 2019. p.335.  
1542  
1543 SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.;  
1544 ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.;  
1545 BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.  
1546 **Química Nova**, v.30, n.2, p.351. 2007. Disponível em: em. doi:  
1547 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>  
1548  
1549 STRUCKO, T.; ZIRNGIBL, K.; PEREIRA, F.; KAFKIA, E.; MOHAMED, E. T.; RETTEL,  
1550 M.; STEIN, F.; FEIST, A. M.; JOUHTEN, P.; PATIL, K. R.; FORSTER, J. Laboratory  
1551 evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces*  
1552 *cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v.47, p.73. 2018. Disponível em:  
1553 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717617304032>>. Acesso em. doi:  
1554 <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.006>  
1555  
1556 TASLI, N. G.; CIMEN, F. K.; KARAKURT, Y.; UCAK, T.; MAMMADOV, R.;  
1557 SULEYMAN, B.; KURT, N.; SULEYMAN, H. Protective effects of Rutin against methanol  
1558 induced acute toxic optic neuropathy: an experimental study. **Int J Ophthalmol**, v.11, n.5,  
1559 p.780. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29862175>>. Acesso em.  
1560 doi: 10.18240/ijo.2018.05.10  
1561  
1562 TESFAW, A.; ASSEFA, F. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces*  
1563 *cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization.  
1564 **Int Sch Res Notices**, v.2014, p.532852. 2014. Disponível em:  
1565 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379305>>. Acesso em. doi: 10.1155/2014/532852  
1566  
1567 VAZQUEZ, L.; PRADOS, I. M.; REGLERO, G.; TORRES, C. F. Identification and  
1568 quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes commonly  
1569 utilized for polyunsaturated fatty acid concentration. **Food Chemistry**, v.229, p.28. 2017.  
1570 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28372175>>. Acesso em. doi:  
1571 10.1016/j.foodchem.2017.01.123  
1572

1573 VERSTREPEN, K. J.; VAN LAERE, S. D.; VANDERHAEGEN, B. M.; DERDELINCKX,  
1574 G.; DUFOUR, J. P.; PRETORIUS, I. S.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.;  
1575 DELVAUX, F. R. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-  
1576 ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. **Applied and**  
1577 **Environment Microbiology**, v.69, n.9, p.5228. 2003. Disponível em:  
1578 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957907>>. Acesso em. doi:  
1579 10.1128/aem.69.9.5228-5237.2003  
1580  
1581 VIDAL, E. E.; DE BILLERBECK, G. M.; SIMÕES, D. A.; SCHULER, A.; FRANÇOIS, J.  
1582 M.; DE MORAIS JR, M. A. Influence of nitrogen supply on the production of higher  
1583 alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food**  
1584 **Chemistry**, v.138, n.1, p.701. 2013a. Disponível em: em. doi,  
1585  
1586 VIDAL, E. E.; DE BILLERBECK, G. M.; SIMÕES, D. A.; SCHULER, A.; FRANÇOIS, J.  
1587 M.; DE MORAIS, M. A. Influence of nitrogen supply on the production of higher  
1588 alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food**  
1589 **Chemistry**, v.138, n.1, p.701. 2013b. Disponível em:  
1590 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612017219>>. Acesso em. doi:  
1591 <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.147>  
1592  
1593 WU, H.; LIU, B.; OU, X.; PAN, S.; SHAO, Y.; HUANG, F. *Streptomyces thermoalkaliphilus*  
1594 sp. nov., an alkaline cellulase producing thermophilic actinomycete isolated from tropical  
1595 rainforest soil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.111, n.3, p.413. 2018. Disponível em:  
1596 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29110157>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10482-017-  
1597 0964-x  
1598  
1599 XUE, S.; JONES, A. D.; SOUSA, L.; PIOTROWSKI, J.; JIN, M.; SARCS, C.; DALE, B. E.;  
1600 BALAN, V. Water-soluble phenolic compounds produced from extractive ammonia  
1601 pretreatment exerted binary inhibitory effects on yeast fermentation using synthetic  
1602 hydrolysate. **PloS One**, v.13, n.3, p.e0194012. 2018. Disponível em:  
1603 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29543873>>. Acesso em. doi:  
1604 10.1371/journal.pone.0194012  
1605  
1606 YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Fundacao Tropical de Pesquisas e  
1607 Tecnologia Andre Tosello, 1995.  
1608  
1609 ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. D. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J.  
1610 P. D.; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Analysis of organic contaminants and  
1611 copper in cachaça. **Quimica Nova**, v.34, n.2, p.320. 2011. Disponível em: em. doi:  
1612 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000200026>  
1613  
1614 ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J. W. C.; ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids  
1615 production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic  
1616 metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v.248, n.Pt A, p.68. 2018. Disponível em:  
1617 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28693950>>. Acesso em. doi:  
1618 10.1016/j.biortech.2017.06.121  
1619  
1620

1621

## CAPÍTULO 4

1622

**ALTERAÇÕES NA FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL**

1623

**QUÍMICO DE CACHAÇA PRODUZIDA COM PRÉ TRATAMENTO COM**

1624

**EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE *STREPTOMYCES* SP I7 E LEVEDURA**

1625

**PARA CERVEJA BELGIAN ALE**

1626

Menandes Alves de Souza Neto <sup>1\*</sup>, Juliana Aparecida Correia Bento <sup>1</sup>, Márcio

1627

Caliari<sup>1</sup>, Luciano Morais Lião<sup>3</sup> Vinicius Silva Pinto<sup>3</sup>, Armando Garcia Rodriguez<sup>2</sup> e

1628

Luiz Artur Mendes Bataus<sup>2</sup>

1629

<sup>1</sup>Food Engineering Department, Federal University of Goiás – UFG, CEP 74690-

1630

900, Goiânia, Goiás, Brasil.

1631

<sup>2</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás – UFG,

1632

CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

1633

<sup>3</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Goiás – UFG, 74690-900,

1634

Goiânia, Goiás, Brasil.

1635

\*Corresponding author: Phone: +55 (62) +556235211493; E-mail:

1636

[menandesneto@gmail.com](mailto:menandesneto@gmail.com)

1637 **Resumo**

1638 A cachaça é uma bebida fermento-destilada do caldo de cana apreciada e comercializada  
1639 mundialmente. Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos do uso da levedura para cerveja  
1640 Belgium Ale M27, adição de extrato enzimático produzido por *Streptomyces sp* I7 na  
1641 fermentação alcoólica, na produtividade de etanol e no perfil químico das cachaças produzidas.  
1642 A ação do extrato enzimático promoveu diferenças em relação ao pH, ao teor de sólidos  
1643 solúveis, ao teor de açúcares totais e compostos fenólicos. O teor alcoólico das cachaças foi de  
1644 34,2%; 39,7% e 42,1% para o tratamento controle (C, enzimas inativadas pelo calor), T1 e T2  
1645 (maior quantidade de enzimas) respectivamente. As concentrações de etanol obtidas foram  
1646  $270,2 \pm 1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $313,6 \pm 0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $332,6 \pm 1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o C, T1 e T2 respectivamente. Os  
1647 tratamentos enzimáticos promoveram a redução da acidez total de  $37,3 \pm 1,5 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (C)  
1648 para  $25,4 \pm 1,3 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T1) e  $22,2 \pm 1,0 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T2); ésteres totais de  $4,40 \pm 0,4$   
1649  $\text{mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (controle) para  $3,9 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T1) e  $3,03 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T2) e  
1650 metanol  $2,1 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ,  $0,62 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T1) e  $0,51 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (T2). Não  
1651 foram detectados furfural, hidroximetilfurfural e acroleína, em nenhum dos tratamentos  
1652 estudados. As cachaças produzidas atendem à legislação brasileira e as condições de  
1653 fermentação testadas podem ser utilizado para outros processos fermentativos como por  
1654 exemplo, a produção de bioetanol.

1655 **Palavras-chave:** Celulases, xilanases, pré tratamento enzimático, fermentação etanólica e  
1656 M27.

1657 **Introdução**

1658 Segundo a legislação brasileira a cachaça é definida como a bebida fermento destilada  
1659 produzida a partir do caldo de cana podendo, com teor alcoólico entre 38 a 48% a 20 °C,

1660 apresenta características sensoriais peculiares sendo uma bebida mundialmente comercializada  
1661 (BRASIL, 2005; PAIVA et al., 2017). Apesar da existência, em 2018, de novecentos e  
1662 cinquenta e um fabricantes registrados no Ministério da Agricultura pecuária ainda é alto índice  
1663 de informalidade dos produtores. A padronização da bebida influenciou o reposicionamento da  
1664 bebida anteriormente considerada um produto de baixo valor em um bem de grande potencial  
1665 econômico e inserção no mercado externo (BRASIL, 2019; FERNANDES BRAGA, 2015).

1666 Do ponto de vista químico a cachaça possui dois componentes predominantes: água e  
1667 etanol. Entretanto, apresenta outros componentes secundários como álcoois superiores, ésteres  
1668 etílicos, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos, que são responsáveis por seu aroma e sabor  
1669 distinto (AMORIM; SCHWAN; DUARTE, 2016). A presença de componentes secundários ou  
1670 congêneres é influenciada diretamente pelo método de produção de cachaça e pelas etapas  
1671 envolvidas no preparo do mosto, pela fermentação, destilação e o envelhecimento. A presença  
1672 destes compostos secundários pode ainda interferir nos atributos sensoriais e de qualidade  
1673 (GRANATO et al., 2014).

1674 Entre os compostos secundários destacam-se o metanol, acetato de etila e aldeídos, os  
1675 quais estão relacionados com toxicidade quando em concentrações elevadas. Os teores  
1676 permitidos destes compostos são determinados pela Instrução Normativa do Ministério da  
1677 Agricultura e Pecuária nº 13/2005 e 28/2014 (BRASIL, 2005) e Instrução Normativa nº 28/2014  
1678 (BRASIL, 2014).

1679 Vários métodos de pré-tratamento do caldo de cana ou da própria cana têm sido  
1680 empregados visando a redução de congêneres e contaminantes ou ainda promover a melhoria  
1681 do rendimento da fermentação alcoólica. Estes processos podem ser classificados em físicos  
1682 (moagem, irradiação, extrusão, entre outros), químicos (ácido diluído, álcalis, líquidos iônicos,  
1683 oxidantes), físico-químicos (explosão de vapor, hidrotérmica, expansão de fibras com amônia)

1684 e biológico (utilização de enzimas) (BRODEUR et al., 2011; SINDHU; BINOD; PANDEY,  
1685 2016).

1686 O pré-tratamento enzimático tem sido amplamente empregado em processos  
1687 fermentativos, sobretudo para a produção de etanol de materiais lignocelulósicos. Este pré  
1688 tratamento apresenta impacto em diferentes parâmetros da fermentação, chegando a alterar a  
1689 quantidade de procedimentos necessários (ANTONOPOULOU et al., 2019). Desta forma, o  
1690 uso de enzimas poderia favorecer o aumento da produção de etanol no processo de produção  
1691 da cachaça, visto que teria uma maior oferta de açúcares para os microrganismos fermentadores,  
1692 além de promover a redução dos compostos secundários, o que poderia favorecer as  
1693 características sensoriais.

1694 Alguns autores demonstraram que a utilização de um extrato enzimático bruto (pool de  
1695 enzimas) disponibiliza um conjunto de enzimas eficientes na hidrólise de composto  
1696 lignocelulolíticos (BRITO-CUNHA et al., 2013; BRITO-CUNHA et al., 2015). Foram obtidas  
1697 múltiplas xilanases e celulases, utilizando *Streptomyces thermocerradoensis* I3, com atuação  
1698 em ampla faixa de pH, temperatura e termo estabilidade. Essas enzimas amplamente utilizadas  
1699 pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosméticos (GAMA et al., 2020).

1700 Outra forma de melhorar a produção ou qualidade das cachaças é a utilização de novos  
1701 microrganismos ou linhagens fermentadoras. A necessidade de produtos inovadores ocasiona a  
1702 procura de novos microrganismos e bioprocessos e conseqüentemente a busca por maior  
1703 eficiência e otimização dos processos. Além de promover incremento em relação ao  
1704 rendimento, o uso de novos microrganismos ou linhagens pode gerar novos perfis de sabor,  
1705 redução do teor de calorias e criar novas bebidas (CUBILLOS et al., 2019; SERAFIM;  
1706 LANÇAS, 2019).

1707 Na produção de cachaças artesanais, ocorre um processo de fermentação natural. Não  
1708 são adicionadas leveduras ao processo de fermentação. Alguns produtores adicionam milho,

1709 farinhas pré-fermentadas como inóculo de microrganismos fermentativos (MENDONÇA et al.,  
1710 2016; PORTUGAL et al., 2016). Já na produção de cervejas são utilizadas diferentes espécies  
1711 e linhagens de leveduras selecionadas. As leveduras utilizadas na produção de cerveja do tipo  
1712 Ale geralmente promovem a formação de substâncias relevantes para o sabor, como ésteres,  
1713 sendo muito utilizadas para a produção de cerveja artesanal (WEBERSINKE et al., 2018).

1714 A viabilidade do uso de leveduras isoladas em usinas de álcool foi demonstrada para a  
1715 produção de cerveja por apresentarem a capacidade de produzir etanol em condições como  
1716 presença de metais, baixo pH, alta concentração de etanol (8-10%) e alta osmolaridade (> 18%  
1717 de concentração de carboidratos) (ARAUJO et al., 2018; CHRISTOFOLETI-FURLAN et al.,  
1718 2020; FIGUEIREDO et al., 2017). Entretanto, não foram encontrados na literatura relatos da  
1719 utilização de microrganismos comercializados para a produção de cerveja na produção de  
1720 cachaça e seus impactos no perfil químico do destilado.

1721 A composição do mosto e as condições de fermentação são conhecidas por afetar o  
1722 desempenho da fermentação e os perfis de sabor. As cepas de levedura para cerveja respondem  
1723 de maneira diferente às várias condições nutricionais e de fermentação, o que cria perfis de  
1724 sabor únicos no produto. Este trabalho tem como objetivo avaliar a utilização de uma levedura  
1725 selecionada para produção de cerveja tipo Belgian Ale na produção de cachaças. O estudo ainda  
1726 avaliou os efeitos da utilização de extrato enzimático bruto em relação ao processo fermentativo  
1727 do caldo de cana, à produção de etanol e na qualidade da cachaça produzida.

1728

1729 **Material e métodos**

1730 **Material**

1731 O extrato enzimático utilizado (atividade da CMCase de  $35,47 \pm 1,22$  UI·mL<sup>-1</sup> e a  
1732 atividade de xilanase de  $9,18 \pm 0,28$  UI·mL<sup>-1</sup>) foi obtido a partir da fermentação semissólida de  
1733 farelo de trigo utilizando cepa de *Streptomyces sp I7*.

1734 No processo de fermentação foram utilizadas leveduras comerciais Mangrove Jack's  
1735 Belgian Ale M27 (Imake Ltd, Auckland, New Zeland). O caldo de cana foi obtido pela moagem  
1736 da cana (*Saccharum officinarum* Linn.), sem a utilização de peneiras ou outros filtros, em julho  
1737 de 2018, comprada em um mercado local de Goiânia, Goiás. O Caldo foi armazenado garrafas  
1738 plásticas (PET) com tampa transportado sob refrigeração ( $6 \pm 1$  °C) para o Laboratório de  
1739 Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás, onde as fermentações  
1740 foram conduzidas.

1741 **Pré tratamento enzimático do caldo de cana**

1742 O teor de sólidos solúveis (TSS) do caldo de cana foi ajustado para 16° Brix, com a  
1743 adição de água destilada. Após ajuste, foram inoculados os extratos enzimáticos dando origem  
1744 aos três tratamentos distintos. O primeiro considerado como o controle (C), utilizou 2mL do  
1745 extrato bruto desnaturado (extrato submetido à fervura em água a 100 °C por 10 minutos) na  
1746 proporção de 1:1000 (v/v) para o caldo de cana. O segundo tratamento (T1) utilizou 2mL do  
1747 extrato bruto com as enzimas ativas 1:1000 (v/v). No tratamento T2 foram adicionados 4 mL  
1748 do extrato bruto com as enzimas ativas 1:500 (v/v). Essa mistura foi incubada a  $50 \pm 1$  °C em  
1749 Shaker a 80 RPM por duas horas.

1750 **Fermentação alcoólica**

1751 O caldo de cana tratado (C, T1 e T2) foi retirado do shaker e, após o resfriamento do  
1752 caldo para 30 °C, a levedura foi inoculada. As fermentações foram conduzidas em três

1753 repetições para cada tratamento, utilizando Biorreator encamisado SL-134 (SOLAB,  
1754 Piracicaba, Brasil) acoplado a banho refrigerado para controle de temperatura, com capacidade  
1755 de trabalho de 6 L. Em cada repetição, foi adicionado 3 litros de caldo de cana tratado e 10g de  
1756 leveduras comerciais M27 (aproximadamente  $10^{14}$  UFC.mL<sup>-1</sup>). A temperatura foi controlada a  
1757  $30 \pm 1$  °C. O processo de fermentação foi conduzido por 48 horas.

#### 1758 **Acompanhamento do processo fermentativo**

1759 Durante a fermentação do caldo de cana, alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos  
1760 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 para avaliação do pH, do teor de sólidos solúveis (TSS), da  
1761 quantidade de açúcares totais e compostos fenólicos. O pH foi mensurado em potenciômetro,  
1762 com inserção do eletrodo diretamente na amostra e o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi  
1763 determinado conforme metodologia da AOAC (2012) utilizando refratômetro de bancada  
1764 (Nova Instruments, Nova WYA-2S, Brasil). Os resultados foram expressos em ° BRIX. Para a  
1765 determinação de açúcares totais foi utilizado o método fenol-sulfúrico conforme DUBOIS et  
1766 al. (1956). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado com o reagente de Folin-  
1767 Ciocalteau, em espectrofotômetro a 740 nm segundo a metodologia de FOLIN , CIOCALTEU  
1768 (1927) e SOUSA et al. (2007). Os dados foram expressos em miliequivalente de ácido gálico  
1769 por mL de amostra.

#### 1770 **Obtenção da cachaça - destilação**

1771 Após a fermentação, o processo de destilação foi realizado utilizando uma manta  
1772 aquecedora, um balão volumétrico de vidro com capacidade de 1 L acoplado a uma coluna de  
1773 Vigreux de 60 cm e um condensador de 50 cm. A temperatura da destilação foi mantida entre  
1774 90 e 92 °C. destilado foi separado em três frações. As frações de cabeça, coração e cauda foram  
1775 separadas. A fração 'Cabeça', que corresponde a 8 a 10% do volume total do vinho; a fração  
1776 'Coração', que corresponde a 80% de o volume e 'cauda', que corresponde a 8 a 10% do volume  
1777 total do vinho (VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020). A fração coração (destinada ao

1778 consumo), foi armazenada em frascos de vidro, com tampa e mantidas a temperatura ambiente  
1779 para análise.

1780 **Determinação do teor de etanol e caracterização dos perfis químicos por**  
1781 **Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$**

1782 Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados em espectrômetro Bruker *Avance III*,  
1783 11,75 Tesla, equipado com sonda de detecção inversa de tripla ressonância (TBI). Foram  
1784 solubilizados 100  $\mu\text{L}$  de amostra de cachaça em 400  $\mu\text{L}$  solução de óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) +  
1785 trimetilsililpropionato de sódio (TMSP- $d_4$ ) 0,1%. Os espectros foram obtidos a 500,0 MHz para  
1786 o núcleo de  $^1\text{H}$ , sem giro da amostra e temperatura constante a 20 °C.

1787 Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados com sequência de pulsos zg (Bruker),  
1788 ajuste automático da homogeneidade do campo magnético (*shimming*), calibração automática  
1789 de pulsos, com 128 promediações com tempo de aquisição de 23,3 segundos, janela espectral  
1790 de 20,0 ppm com número de pontos de aquisição e processamento iguais a 65.536 pontos e  
1791 ganho do receptor fixo em 203. A linha de base e a fase foram corrigidas automaticamente.

1792 Para a etapa de caracterização dos perfis químicos foram adquiridos com sequência de  
1793 pulsos *noesygppr1d* (Bruker), usada para suprimir as intensidades preponderantes dos sinais  
1794 dos hidrogênios do etanol ( $\delta$  1,20; 3,65) e da água ( $\delta$  4,80), presentes em proporções elevadas  
1795 em relação aos demais componentes. Foram realizadas 256 promediações com tempo de  
1796 aquisição igual a 23,3 segundos, janela espectral de 20,0 ppm, tempo de mistura igual a 150  
1797 milissegundos e número de pontos de aquisição e processamento iguais a 65.536 pontos ganho  
1798 do receptor fixo em 203. A linha de base e a fase foram corrigidas automaticamente.

1799 Para a calibração do método ERETIC, usado na quantificação dos analitos, foi usado  
1800 amostra padrão *Bruker* certificada e selada, em tubo contendo 2,0  $\text{mmol.L}^{-1}$  de sacarose + ácido  
1801 4,4-dimetil-4-silapentano sulfônico (DSS) 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  + azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 2,0  $\text{mmol.L}^{-1}$

1802 <sup>1+</sup> D<sub>2</sub>O 10% + H<sub>2</sub>O 90 % (v/v) de. A calibração do dispositivo eletrônico foi feita pela  
1803 integração do sinal do hidrogênio em  $\delta$  5,40 da sacarose.

#### 1804 **Análises estatísticas**

1805 Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três repetições.  
1806 Diferenças significativas entre as médias dos parâmetros foram calculadas pela análise de  
1807 variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferoni com nível de significância  $p < 0,05$  usando  
1808 o software Graph pad prism 5 ®.

1809

#### 1810 **Resultados e discussão**

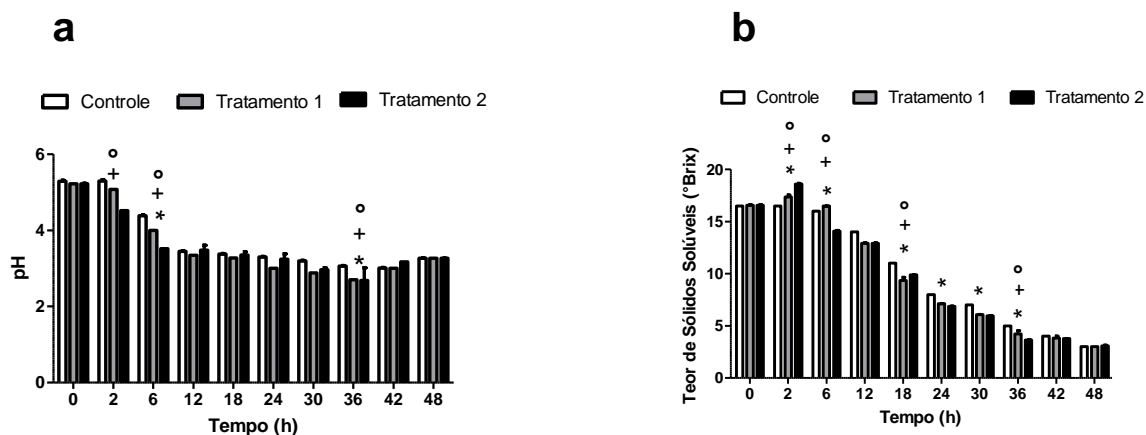
##### 1811 **Acompanhamento do processo fermentativo**

1812 Verificou-se a redução do pH em todos os tratamentos sendo este o comportamento  
1813 esperado durante a fermentação alcoólica pois além do produto principal, o etanol, também são  
1814 produzidos outras substâncias entre elas o ácido acético, lático e propiônico, podendo inclusive  
1815 sinalizar para o término do processo fermentativo (DIONISI; SILVA, 2016) O pH apresentou  
1816 variação durante o processo fermentativo (figura 2a), com diferença estatística entre o C e T1  
1817 nos tempos de 6 e 36 horas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Enquanto C e o T2 apresentou  
1818 diferença estatisticamente significativa nos tempos 2, 6 e 36 horas ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ,  
1819 respectivamente). Ao comparar T1 e T2 verificou se diferença estatística nos tempos 2 e 6 horas  
1820 (ambos  $p < 0,001$ ).

1821 O caldo de cana contém cerca de 80 a 85% de água e uma composição média de  
1822 aproximadamente 30% de sacarose e 70% de materiais lignocelulósicos resultantes do  
1823 processamento do bagaço ou farelo de cana (base seca) (AMALRAJ et al., 2008). Apesar da  
1824 utilização de extrato enzimático contendo enzimas efetivas na hidrólise de compostos

1825 lignocelulósico, não houve uma grande variação pH entre os tratamentos estudados. Este  
1826 resultado sugere que não houve variação do metabolismo das leveduras utilizadas.

1827 O teor de sólidos solúveis (figura 2b) apresentou uma redução em todos os tratamentos  
1828 estudados. Nas duas primeiras horas de incubação houve aumento no teor de TSS. Este aumento  
1829 deve ser resultado da ação das enzimas presentes no extrato utilizado. As celulasas e xilanasas  
1830 atuaram sobre os compostos lignocelulolíticos presentes no caldo de cana, resultando na  
1831 hidrólise ou separação destes compostos, permitindo a liberação de compostos associados.  
1832 Resultado semelhante foi observado por ABBÈS et al. (2011) e AL-HOOTI et al. (2002) ao  
1833 avaliar o tratamento enzimático com celulasas em tâmaras. A redução do teor de sólidos  
1834 solúveis durante a fermentação do caldo de cana, utilizando *S. cerevisiae* também foi reportada  
1835 por (RESENDE OLIVEIRA et al., 2018; TZENG et al., 2010).



1836

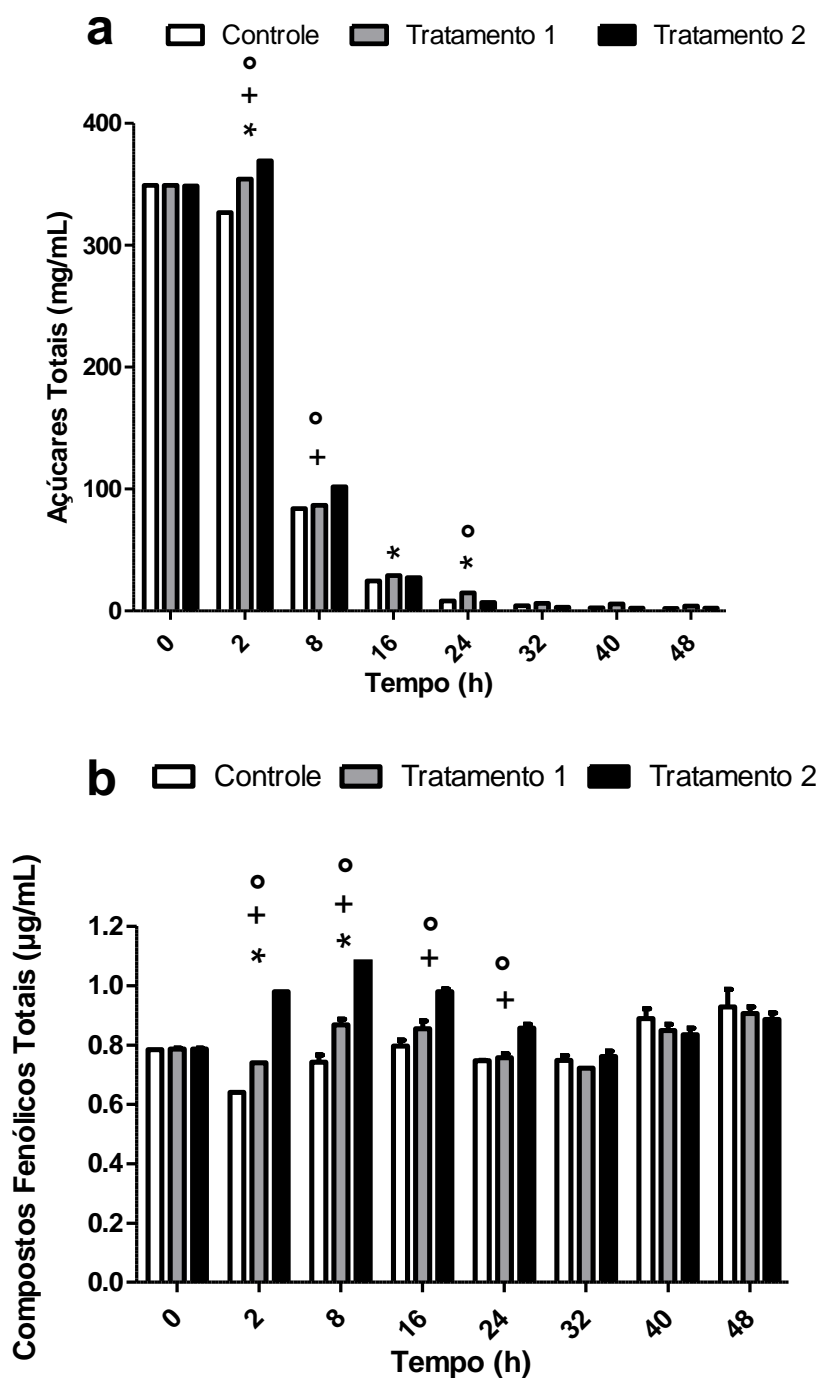
1837 **Figura 2.** Caldo de cana fermentado: (a) variação do pH e (b) variação no teor de sólidos solúveis durante o  
1838 processo fermentativo do caldo cana nos tempos 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas. C: controle; T1 e T2:  
1839 caldo de cana adicionado de extrato enzimático bruto de *Streptomyces sp I7* na proporção 1:1000 e 2:1000,  
1840 respectivamente. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos controle e  
1841 tratamento 1, + representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento controle e o tratamento T2 e °  
1842 representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos controle e tratamento 1 e 2.

1843 A figura 3A mostra a concentração de açúcares durante o processo de fermentação. Os  
1844 tratamentos utilizando as enzimas ativas mostraram uma concentração um pouco maior quando  
1845 comparado como controle. Possivelmente, este aumento é devido a ação do extrato enzimático,  
1846 que disponibilizou maior quantidade de açúcares para o meio fermentativo. SUKUMARAN et

1847 al. (2009) mostraram que o pré-tratamento do caldo de cana com celulase promoveu aumento  
1848 do teor de açúcares totais, resultado da hidrólise dos materiais lignocelulósicos presentes. Os  
1849 dados descritos por estes autores concordam com os resultados obtidos neste trabalho. Os  
1850 açúcares presentes nas diversas matérias primas utilizadas, como a sacarose ou outros, serão  
1851 convertidos por diversos inúmeros microrganismos para a produção de bioetanol (HOSSAIN;  
1852 HAJI ZAINI; MAHLIA, 2017).

1853 Em relação aos compostos fenólicos totais (figura 3b) pode se observar que o  
1854 tratamento enzimático promoveu o aumento do teor de compostos fenólicos em todos os tempos  
1855 analisados. Este aumento também foi verificado por JÖNSSON , MARTÍN (2016) ao utilizar  
1856 o pré-tratamento enzimático para hidrolisar material lignocelulósico para a produção de etanol.  
1857 Com a utilização de enzimas a rede celulósica é clivada, a distribuição de solventes é  
1858 aprimorada, o tamanho das partículas é reduzido, a taxa de transferência de massa é aprimorada,  
1859 o que leva a liberação de polifenóis antes quimicamente ligados a parede celular e  
1860 consequentemente uma maior recuperação destes (BALASUBRAMANIAM et al., 2019).  
1861 Embora a presença de compostos fenólicos esteja relacionada com a redução do rendimento  
1862 fermentativo, ADEBOYE; BETTIGA , OLSSON (2014) demonstraram que diferentes  
1863 compostos fenólicos, frequentemente presentes em hidrolisados lignocelulósicos, apresentam  
1864 toxicidade distintas. e substratos ricos em fenólicos podem ser fermentáveis, uma vez que a  
1865 fermentabilidade depende da concentração e da natureza dos compostos fenólicos neles  
1866 presentes.

1867



1868

1869 **Figura 3.** Concentração de açúcares totais ( $\text{mg. mL}^{-1}$ ) e compostos fenólicos totais em ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) durante o  
 1870 processo fermentativo do caldo cana nos tempos 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas. C: controle; T1 e T2:  
 1871 caldo de cana adicionado de extrato enzimático bruto de *Streptomyces sp* I7 na proporção 1:1000 e 2:1000,  
 1872 respectivamente. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos controle e  
 1873 tratamento 1, + representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento controle e o tratamento T2 e °  
 1874 representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos controle e tratamento 1 e 2.

1875 **Teor alcoólico e concentração de etanol na cachaça**

1876 A determinação do teor alcoólico e da concentração de etanol quantificados na fração  
1877 coração da cachaça encontram-se na tabela 1. O teor alcoólico e a concentração de etanol foram  
1878 verificados aumentos em ambos os tratamentos propostos. Verificou-se o aumento de 13,85%  
1879 quando comparados o controle e T1 (de 34,20 para 39,70) e aumento de 6% quando comparado  
1880 o controle e T2.(de 39,70 para 42,10).Valores semelhantes foram detectados em relação à  
1881 concentração de etanol (de 270,2 para 313,6 quando comparado o controle e o T1 e de 313,6  
1882 para 332,6 quando comparado T1 e T2).

1883 A presença de celulasas e xilanasas no extrato enzimático utilizado aumentou o teor de  
1884 açúcares totais no processo de fermentação (Fig. 3 a). Este aumento foi resultante da hidrólise  
1885 dos compostos lignocelulolíticos pelo extrato enzimática. Além disso, a decomposição da  
1886 hemicelulose (xilana) aumenta a porosidade da fibra de celulose, tornando-a mais acessível à  
1887 ação de celulasas. Ambos os fatores acima levam ao aumento do rendimento de etanol durante  
1888 a etapa final da fermentação por levedura (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). Dessa forma o aumento  
1889 na concentração de açúcares totais resultou no aumento do teor alcoólico total e na produção  
1890 de etanol.

1891 **Tabela 1.** Quantificação do teor alcoólico e da concentração de etanol na fração coração das  
1892 cachaças controle, T1 (1:1000) e T2 (2:1000) obtidos por ressonância magnética nuclear H<sup>1</sup>.

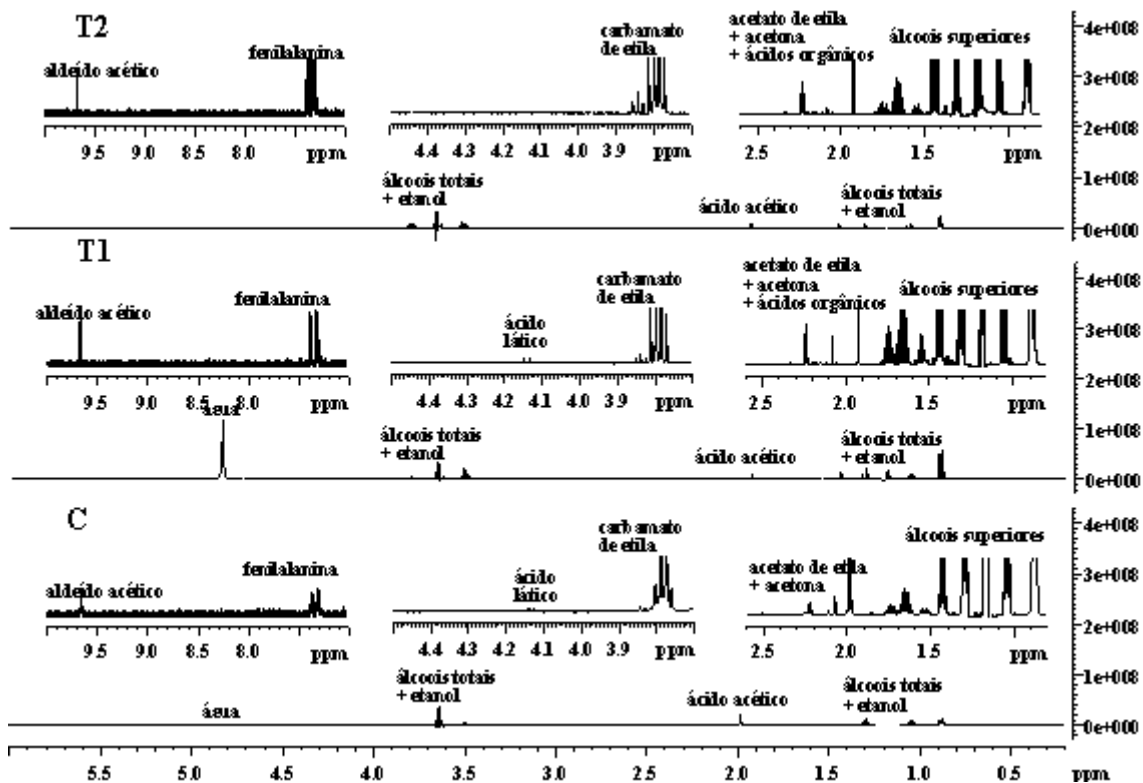
Componentes	Controle	T1	T2
Teor alcóolico (%)	34,2	39,7	42,1
Etanol (g.L-1)	270,2±1,0	313,6±0,9	332,6±1,1

1893 1:1000 e 1:2000 correspondem à relação entre o volume do extrato enzimático utilizado e o  
1894 volume de caldo de cana utilizado na fermentação.

1895 **Análise da cachaça utilizando RMN**

1896 A figura 4 apresenta o comparativo entre os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das amostras dos  
1897 três tratamentos propostos. A região espectral entre  $\delta$  2,0-0,8, foi caracterizada pela presença  
1898 dos sinais dos hidrogênios de álcoois alifáticos. Em  $\delta$  0,89, foi identificado um tripleto que foi

1899 atribuído aos hidrogênios metílicos (-CH<sub>3</sub>) do 1-propanol. Seu isômero, 2-propanol (álcool  
1900 isopropílico) foi identificado pelo duplete em  $\delta$  1,15, sinal referente aos hidrogênios metílicos,  
1901 quimicamente equivalentes. Em  $\delta$  1,07, o tripleto intenso foi caracterizado como referente aos  
1902 hidrogênios metílicos do etanol. Os isômeros 1 e 2 butanóis foram caracterizados pelos  
1903 complexos padrões de sinais entre  $\delta$  1,70-1,20, decorrentes dos hidrogênios diastereotópicos e  
1904 enantiotópicos. O 1-pentanol (álcool amílico), foi caracterizado por três conjuntos de sinais em  
1905  $\delta$  1,56; 1,33; 0,90. Os demais sinais dos álcoois foram atribuídos na faixa espectral entre  $\delta$  4,0-  
1906 3,4, característica de hidrogênios de carbonos ligados diretamente a átomos altamente  
1907 eletronegativos (ex: HC-OH). O metanol, foi identificado na região em questão, em  $\delta$  3,35.



1908

1909 **Figura 4.** Comparação entre as cachacas obtidas por utilizando RMN (Controle, Tratamento 1 e Tratamento 2).  
1910

1911 Nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, também foram identificados sinais de ácidos orgânicos,  
1912 como o acético e láctico, atribuídos em  $\delta$  1,92 e 4,4, respectivamente. A propanona (acetona) foi  
1913 caracterizada por um simpleto em  $\delta$  2,23, próximo ao simpleto do acetato de etila, em  $\delta$  2,04.

1914 Outro éster identificado foi o carbamato de etila (uretano) por um tripleto próximo a  $\delta$  1,3 e um  
1915 quarteto em  $\delta$  3,9. O acetaldeído (etanal) foi caracterizado por um duplete em  $\delta$  2,20 e por um  
1916 quarteto em  $\delta$  9,70. A glicose foi atribuída por dois dupletos com baixas intensidade em  $\delta$  5,21  
1917 e 4,6. Na região de alta desblindagem, o sistema de spins dos hidrogênios aromáticos da  
1918 fenilalanina foi atribuído por um duplete em  $\delta$  7,3 e dois tripletos em 7,36 e  $\delta$  7,42.

1919 A quantificação da Acidez total; Ésteres totais; Aldeídos totais; Furfural e  
1920 Hidroximetilfurfural; Metanol; Carbamato de Etila e Acroleína estão presentes na Tabela 2,  
1921 assim como os valores máximos permitidos conforme a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13,  
1922 DE 29 DE JUNHO DE 2005 (BRASIL, 2005).

1923 Em relação à acidez total verificou se uma redução de 32% e 40% quando comparada a  
1924 cachaça C com o T1 e T2, respectivamente. Quando comparado T1 e T2 verificou-se uma  
1925 redução de 12% no tratamento com maior concentração enzimática (Tabela 2). A acidez é uma  
1926 das principais causas de rejeição sensorial da cachaça pelos consumidores. A alta acidez em  
1927 cachaças pode estar relacionada com a contaminação microbiana, assim a baixa acidez na  
1928 cachaça é um excelente atributo de qualidade (CRAVO et al., 2019; ODELLO et al., 2009).

1929  
1930  
1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946

1947  
1948

**Tabela 2.** Quantificação de congêneres e contaminantes nas cachaças produzidas com e sem o tratamento enzimático a partir do método ERETIC.

Componentes	Controle	T1	T2	Valor máximo <sup>8</sup>
Acidez total <sup>1</sup>	37,3±1,5	25,4±1,3	22,2±1,0	150
Ésteres totais <sup>2</sup>	4,40± 0,4	3,9± 0,2	3,03±0,2	200
Aldeídos totais <sup>3</sup>	1,6±0,2	6,33± 0,3	12,3±0,1	30
	traços			
Furfural e Hidroximetilfurfural <sup>4</sup>	(não quantificável)	traços (não quantificável)	traços (não quantificável)	5
Metanol <sup>5</sup>	2,1±0,1	0,62±0,1	0,51±0,1	20
Carbamato de Etila <sup>6</sup>	2,6±0,2	3,6± 0,2	0,80±0,1	150
	traços			
Acroleína <sup>7</sup>	(não quantificável)	traços (não quantificável)	traços (não quantificável)	360
	vel)			

1949

1:Acidez volátil, expressa em ácido etanóico em mg·100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 2: Ésteres totais, expressos em

1950

acetato de etila, em mg·100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 3: Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg·100 mL<sup>-1</sup> de álcool

1951

anidro. 4: Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg·100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 5: Álcool metílico em

1952

mg·100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. 6: Carbamato de etila em µg.L<sup>-1</sup>. 7: Acroleína (2-propenal) em mg·100 mL<sup>-1</sup> de

1953

álcool anidro. 8: Valores máximos em mg·100 mL<sup>-1</sup> determinados pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE

1954

29 DE JUNHO DE 2005.

1955

Para os valores para ésteres totais, verificou-se a redução de 11% e 31% quando

1956

comparada a cachaça C com o T1 e T2, respectivamente. A maior concentração de enzimas

1957

presente em T2 promoveu uma redução de 22% nos ésteres totais em comparação com T1

1958

(Tabela 2). Os ésteres são compostos produzidos no metabolismo secundário das leveduras

1959 durante a fermentação e/ou pela esterificação de álcoois e ácidos orgânicos durante os processos  
1960 de destilação e envelhecimento. Eles são responsáveis pelo sabor relacionado a notas de  
1961 madeira, baunilha e sutis aromas ligados a frutas e flores, porém em excesso tornam a cachaça  
1962 desagradável. Ésteres podem ser adicionados visando mascarar outros odores (PIRES et al.,  
1963 2014). Segundo HONG et al. (2019) a síntese de alguns ésteres como o acetato de isoamil pode  
1964 ser aumentada caso ocorra o aumentando as concentrações intracelulares de coenzima A (CoA)  
1965 e acetil-CoA. As leveduras possuem vias metabólicas que permitem a geração de acetil-CoA  
1966 citosólico em duas etapas: oxidação de etanol a acetato pela enzima álcool desidrogenase e  
1967 acetaldeído desidrogenase seguido pela transformação de acetato em acetil-CoA pela acetil-  
1968 CoA sintetase (DE SMIDT; DU PREEZ; ALBERTYN, 2012; KRIVORUCHKO et al., 2015).  
1969 O aumento na produção de ésteres detectados neste trabalho pode ter ocorrido através da  
1970 ativação destas vias devido a maior concentração de etanol.

1971 Em relação aos aldeídos totais, verificou-se um aumento de 295% e 668% quando  
1972 comparados os valores obtidos na cachaça C com o T1 e T2, respectivamente. Entre os  
1973 tratamentos T1 e T2 verificou-se o acréscimo de 94%, ou seja, a maior concentração de enzimas  
1974 no caldo de cana favoreceu o aumento de aldeídos no produto (Tabela 2). Os aldeídos  
1975 encontrados em bebidas alcoólicas podem ser produzidos durante a fermentação por degradação  
1976 de aminoácidos, oxidação de álcoois ou auto oxidação de ácidos graxos (BAERT et al., 2012).  
1977 Também podem ser produzidos durante a destilação através da reação de Maillard ou durante  
1978 o processo de envelhecimento. Através da engenharia genética XU et al. (2019) comprovaram  
1979 que a produção de acetaldeído na fabricação de cerveja está intimamente relacionada com o  
1980 equivalente NADH intracelular regulado pelo ciclo do ácido cítrico. No entanto, não houve  
1981 relação significativa entre o acetaldeído produção e metabolismo de aminoácidos. Assim,  
1982 podemos sugerir que as condições dos meios de cultura, como maior teor de açúcares  
1983 fermentescíveis pode ter contribuído para a redução dos teores de aldeídos.

1984 Não foi possível quantificar pela metodologia utilizada os compostos furfural,  
1985 hidroximetilfurfural e acroleína. Os procedimentos utilizados na fermentação e na destilação  
1986 resultaram em baixíssima produção destes compostos. Esses dados são interessantes uma vez  
1987 que mostram que a cachaça produzida pode ser classificada em adequada ou boa quanto a esses  
1988 compostos. Uma vez que esses compostos diminuem a qualidade da cachaça.

1989 Quanto ao metanol verificou-se a redução de 70% e 75% quando comparados os valores  
1990 obtidos na cachaça C com o T1 e T2. Comparando as cachaças T1 e T2 verificou-se uma  
1991 redução de 17% na cachaça obtida do caldo de cana tratado com a maior concentração  
1992 enzimática. O metanol é um álcool indesejável, não apenas na cachaça, mas também em outras  
1993 bebidas alcoólicas devido à sua toxicidade, mesmo em baixas concentrações. Sua síntese está  
1994 associada à presença de fragmentos de cana no processo de fermentação, visto que o mesmo é  
1995 originado da degradação da pectina presente no meio fermentativo (CRAVO et al., 2019).

1996 Quanto ao carbamato de etila (CE), T1 apresentou um aumento de 38% em relação ao  
1997 C, enquanto o T2 apresentou uma redução de 77% (Tabela 2). O carbamato de etila não  
1998 contribui para o aroma, cor ou sabor, não sendo identificado sensorialmente. Entretanto, sua  
1999 detecção é importante devido a sua capacidade carcinogênica (SILVA; VERRUMA-  
2000 BERNARDI; OLIVEIRA, 2020). Glicosídeos cianogênicos, ureia, arginina e citrulina, podem  
2001 gerar CE durante a fermentação. Fatores como temperatura, acidez, propriedades dos  
2002 microrganismos utilizados afetam a produção de CE durante a fermentação. A disponibilidade  
2003 de precursores de EC depende da natureza do microrganismo usado na fermentação.  
2004 *Saccharomyces cerevisiae* degrada arginina em ureia e *Lactobacillus* convertem arginina em  
2005 citrulina, os quais reagem com etanol produzindo CE (GOWD et al., 2018).

2006

2007 **Conclusão**

2008 A fermentação alcoólica do caldo de cana, previamente tratado com extrato enzimático,  
2009 utilizando a levedura M27 possibilitou a obtenção de uma cachaça com perfil químico de  
2010 congêneres e contaminantes bem abaixo do preconizado pela legislação brasileira. Os  
2011 tratamentos enzimáticos promoveram a redução da acidez total; ésteres totais e metanol.  
2012 Também foi verificado o aumento dos teores de álcoois totais, etanol e aldeídos totais, com  
2013 aumento mais pronunciado no tratamento T2, sendo influenciados diretamente pela quantidade  
2014 de enzima utilizada. Logo, concluiu-se que o pré-tratamento enzimático e a utilização de  
2015 levedura não convencional para a produção de cachaça tiveram impacto positivo na qualidade  
2016 e rendimento da produção de etanol, apresentando potencial para sua aplicação industrial, seja  
2017 na indústria de bebidas ou bioetanol.

2018

2019 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

2020 ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Formation of volatile and  
2021 maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels. **Journal of the**  
2022 **Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 529, 2014.

2023

2024 ALMEIDA, J. C. D.; AFERRI, G.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R.; COSTA, G. H.  
2025 G. Cachaça production from sugarcane infested by *Diatrea saccharalis*. **Food Science and**  
2026 **Technology**, v. <http://dx.doi.org/10.1590/fst.38918> 2019.

2027

2028 ALONSO GONZÁLEZ, E.; TORRADO AGRASAR, A.; PASTRANA CASTRO, L. M.;  
2029 ORRIOLS FERNÁNDEZ, I.; PÉREZ GUERRA, N. Production and Characterization of  
2030 Distilled Alcoholic Beverages Obtained by Solid-State Fermentation of Black Mulberry (*Morus*  
2031 *nigra* L.) and Black Currant (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,  
2032 v. 58, n. 4, p. 2529, 2010.

2033

2034 AMALRAJ, V.; RAKKIYAPPAN, P.; NEELAMATHI, D.; CHINNARAJ, S.;  
2035 SUBRAMANIAN, S. Wild cane as a renewable source for fuel and fibre in the paper industry.  
2036 **Current Science**, p. 1599, 2008.

2037

2038 AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaca): Effects of  
2039 mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Res Int**, v. 85, p.  
2040 76, Jul 2016.

2041

2042 AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists:**  
2043 Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Washington DC, 2012.

2044

2045 ARIF, S.; BATOOL, A.; NAZIR, W.; KHAN, R. S.; KHALID, N. 8 - Physiochemical  
2046 Characteristics Nutritional Properties and Health Benefits of Sugarcane Juice. In:  
2047 GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M. (Ed.). **Non-Alcoholic Beverages:** Woodhead  
2048 Publishingv. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00008-6>, 2019. p.227. ISBN 978-  
2049 0-12-815270-6.

2050

2051 BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the  
2052 Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer. **Journal of Agricultural and Food**  
2053 **Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11449, 2012/11/21 2012.

2054

2055 BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology.  
2056 **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 21, p. 8711, 2019/11/01 2019.

2057

2058 BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005.** Aprovar o  
2059 Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de  
2060 Cana e para Cachaça, em observância ao Anexo à presente Instrução Normativa. MAPA.  
2061 Brasília: Diário Oficial da União: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: 3 p.  
2062 2005.

2063

2064 \_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014.** UNIÃO, D. O. D. Brasília, DF:  
2065 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.

2066

2067 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
2068 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
2069 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **J Agri Environ Sci**, v. 4, n. 1, p. 90, 2015.

2070

2071 BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K.;  
2072 RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic  
2073 biomass: a review. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

2074

2075 COUTURIER, M.; BENNATI-GRANIER, C.; URIO, M. B.; RAMOS, L. P.; BERRIN, J.-G.  
2076 Fungal Enzymatic Degradation of Cellulose. In: (Ed.). **Green Fuels Technology:** Springerv.  
2077 10.1007/978-3-319-30205-8\_6, 2016. cap. Chapter 6, p.133. (Green Energy and Technology).  
2078 ISBN 978-3-319-30203-4  
2079 978-3-319-30205-8.

2080

2081 CRAVO, F. D. C.; SANTIAGO, W. D.; DA SILVA LUNGUINHO, A.; BARBOSA, R. B.;  
2082 DA SILVA OLIVEIRA, R. E.; ALVARENGA, G. F.; SANTOS, S. D.; SOUZA, R. H. Z.; DE  
2083 SOUZA, E. C.; DE ALMEIDA, K. J. Composition of Cachaças Produced from Five Varieties  
2084 of Sugarcane and the Correlation of the Presence of Dhurrin in the Cane with That of Ethyl  
2085 Carbamate in the Product. **American Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 2, p. 339, 2019.

2086

2087 DING, J.; BIERMA, J.; SMITH, M. R.; POLINER, E.; WOLFE, C.; HADDUCK, A. N.;  
2088 ZARA, S.; JIRIKOVIC, M.; VAN ZEE, K.; PENNER, M. H. Acetic acid inhibits nutrient  
2089 uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: auxotrophy confounds the use of yeast deletion libraries  
2090 for strain improvement. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7405, 2013.  
2091

2092 DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Ethanol production during batch fermentation with  
2093 *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. **Applied and  
2094 environmental microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1286, 1987.  
2095

2096 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric  
2097 Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.  
2098 3, p. 350, 1956.  
2099

2100 EDWARDS, M. C.; DORAN-PETERSON, J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol  
2101 production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 565, August 01 2012.  
2102

2103 FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J. biol.  
2104 Chem**, v. 73, n. 2, p. 627, 1927.  
2105

2106 FORMIGARI, A.; IRATO, P.; SANTON, A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in  
2107 metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. **Comparative Biochemistry  
2108 and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 443, 2007.  
2109

2110 GRANATO, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.;  
2111 ALABURDA, J. Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial  
2112 Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers. **Food research international**, v. 60, p.  
2113 212, 2014.  
2114

2115 GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J.-G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.;  
2116 BERLIN, A.; EDIVALDO FILHO, X.; EZEJI, T. Fungal enzymes for bio-products from  
2117 sustainable and waste biomass. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 7, p. 633, 2016.  
2118

2119 HONG, K.-Q.; FU, X.-M.; DONG, S.-S.; XIAO, D.-G.; DONG, J. Modulating acetate ester  
2120 and higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae* through the cofactor engineering.  
2121 **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 46, n. 7, p. 1003, July 01 2019.  
2122

2123 JAGTAP, R. S.; MAHAJAN, D. M.; MISTRY, S. R.; BILAIYA, M.; SINGH, R. K.; JAIN, R.  
2124 Improving ethanol yields in sugarcane molasses fermentation by engineering the high  
2125 osmolarity glycerol pathway while maintaining osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.  
2126 **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, n. 2, p. 1031, Jan 2019.  
2127

2128 JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-  
2129 products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103,  
2130 2016.  
2131

2132 LANDAUD, S.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Top Pressure and Temperature Control the  
2133 Fusel Alcohol/Ester Ratio through Yeast Growth in Beer Fermentation. **Journal of the  
2134 Institute of Brewing**, v. 107, n. 2, p. 107, 2001.  
2135

2136 LATARULLO, M. B. G.; TAVARES, E. Q. P.; PADILLA, G.; LEITE, D. C. C.;  
2137 BUCKERIDGE, M. S. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. **Frontiers in Plant**  
2138 **Science**, v. 7, n. 1401, 2016-September-20 2016.  
2139  
2140 MELO, E. M.; FERNANDES, J. P.; CUNHA, F. A.; LIRA, J. O.; LIMA, R. A.; LIMA, K. M.;  
2141 ALMEIDA, L. F. A new method for the determination of total furanic aldehyde compounds in  
2142 Brazilian cachaça samples using liquid–liquid extraction and UV detection. **Analytical**  
2143 **Methods**, v. 8, n. 39, p. 7047, 2016.  
2144  
2145 ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; SILVA, A. A. D.; GALINARO, C. A.;  
2146 FRANCO, D. W. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v. 32, p. 1839, 2009.  
2147  
2148 PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer’s  
2149 aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.  
2150 **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937, March 01 2014.  
2151  
2152 RESENDE OLIVEIRA, É.; CALIARI, M.; SOARES SOARES JÚNIOR, M.; RIBEIRO  
2153 OLIVEIRA, A.; CRISTINA MARQUES DUARTE, R.; VALÉRIO DE BARROS VILAS  
2154 BOAS, E. Assessment of chemical and sensory quality of sugarcane alcoholic fermented  
2155 beverage. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 1, p. 72, January 01 2018.  
2156  
2157 RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R. P.; MÄKELÄ, M.  
2158 R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and**  
2159 **Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614, 2014.  
2160  
2161 SCHADEWEG, V.; BOLES, E. n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited  
2162 by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. **Biotechnology for biofuels**, v. 9,  
2163 n. 1, p. 44, 2016/02/24 2016.  
2164  
2165 SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. 11 - Sugarcane Spirits (Cachaça) Quality Assurance and  
2166 Traceability: An Analytical Perspective. In: GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M. (Ed.).  
2167 **Production and Management of Beverages**: Woodhead Publishingv.  
2168 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00011-0>, 2019. p.335. ISBN 978-0-12-815260-  
2169 7.  
2170  
2171 SILVA, J. H. D. N. E.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. D. Cachaça  
2172 Production in Brazil and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). **Scientia Agricola**, v. 77,  
2173 2020.  
2174  
2175 SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass–  
2176 An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76, 2016.  
2177  
2178 SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.;  
2179 ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.;  
2180 BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química**  
2181 **Nova**, v. 30, n. 2, p. 351, 2007.  
2182

- 2183 SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase  
2184 production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for  
2185 bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421, 2009/02/01/ 2009.  
2186
- 2187 TZENG, D. I.; CHIA, Y. C.; TAI, C. Y.; OU, A. S. M. Investigation of chemical quality of  
2188 sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.  
2189 **Journal of food quality**, v. 33, n. 2, p. 248, 2010.  
2190
- 2191 WEBERSINKE, F.; KLEIN, H.; FLIEHER, M.; URBAN, A.; JÄGER, H.; FORSTER, C.  
2192 Control of Fermentation By-Products and Aroma Features of Beer Produced with Scottish Ale  
2193 Yeast by Variation of Fermentation Temperature and Wort Aeration Rate. **Journal of the**  
2194 **American Society of Brewing Chemists**, v. 76, n. 3, p. 147, 2018/07/03 2018.  
2195
- 2196 ПОНОМАРЕВА, О.; БОРИСОВА, Е.; ПРОХОРЧИК, И. Кислотоустойчивые штаммы  
2197 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для производства кислых элей. **Вестник**  
2198 **международной академии холода**, n. 1, 2018.  
2199
- 2200 ABBÈS, F.; BOUAZIZ, M. A.; BLECKER, C.; MASMOUDI, M.; ATTIA, H.; BESBES, S.  
2201 Date syrup: Effect of hydrolytic enzymes (pectinase/cellulase) on physico-chemical  
2202 characteristics, sensory and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**,  
2203 v.44, n.8, p.1827. 2011. Disponível em:  
2204 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811001071>>. Acesso em. doi:  
2205 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.020>  
2206
- 2207 ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds  
2208 determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces*  
2209 *cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v.4, n.1, p.46. 2014. Disponível em:  
2210 <<https://doi.org/10.1186/s13568-014-0046-7>>. Acesso em. doi: 10.1186/s13568-014-0046-7  
2211
- 2212 AL-HOOTI, S. N.; SIDHU, J. S.; AL-SAQER, J. M.; AL-OTHMAN, A. Chemical  
2213 composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment.  
2214 **Food Chemistry**, v.79, n.2, p.215. 2002. Disponível em:  
2215 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602001346>>. Acesso em. doi:  
2216 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00134-6)  
2217
- 2218 AMALRAJ, V.; RAKKIYAPPAN, P.; NEELAMATHI, D.; CHINNARAJ, S.;  
2219 SUBRAMANIAN, S. Wild cane as a renewable source for fuel and fibre in the paper  
2220 industry. **Current Science**, p.1599. 2008. Disponível em: em. doi:  
2221
- 2222 AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaca): Effects of  
2223 mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research**  
2224 **International**, v.85, p.76. 2016. Disponível em:  
2225 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29544855>>. Acesso em. doi:  
2226 10.1016/j.foodres.2016.04.014  
2227
- 2228 ANTONOPOULOU, G.; KAMPRANIS, A.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Enhancement  
2229 of Liquid and Gaseous Biofuels Production From Agro-Industrial Residues After  
2230 Thermochemical and Enzymatic Pretreatment. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.3,

2231 n.92. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2019.00092>>.  
2232 Acesso em. doi: 10.3389/fsufs.2019.00092  
2233  
2234 AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.  
2235 **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 2012.  
2236 Disponível em: em. doi:  
2237  
2238 ARAUJO, T. M.; SOUZA, M. T.; DINIZ, R. H. S.; YAMAKAWA, C. K.; SOARES, L. B.;  
2239 LENCZAK, J. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; GOLDMAN, G. H.; BARBOSA, E. A.;  
2240 CAMPOS, A. C. S.; CASTRO, I. M.; BRANDAO, R. L. Cachaca yeast strains: alternative  
2241 starters to produce beer and bioethanol. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.111, n.10, p.1749.  
2242 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29663103>>. Acesso em. doi:  
2243 10.1007/s10482-018-1063-3  
2244  
2245 BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the  
2246 Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer. **Journal of Agricultural and Food**  
2247 **Chemistry**, v.60, n.46, p.11449. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf303670z>>.  
2248 Acesso em. doi: 10.1021/jf303670z  
2249  
2250 BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology.  
2251 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.21, p.8711. 2019. Disponível em:  
2252 <<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-019-10146-  
2253 0  
2254  
2255 BALASUBRAMANIAM, V. G.; AYYAPPAN, P.; SATHVIKA, S.; ANTONY, U. Effect of  
2256 enzyme pretreatment in the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols. **J**  
2257 **Food Sci Technol**, v.56, n.3, p.1583. 2019. Disponível em:  
2258 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30956339>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13197-019-  
2259 03672-2  
2260  
2261 BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005. Aprovar o  
2262 Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente  
2263 de Cana e para Cachaça, em observância ao Anexo à presente Instrução Normativa. MAPA.  
2264 Brasília: Diário Oficial da União: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: 3 p.  
2265 2005.  
2266  
2267 \_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014.** UNIÃO, D. O. D. Brasília,  
2268 DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.  
2269  
2270 \_\_\_\_\_. **A cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes / Secretaria de**  
2271 **Defesa Agropecuária.** . MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília:  
2272 MAPA/AECE,  
2273 [https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/A](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/A%20Cacha%C3%A7a%20no%20Brasil%20%E2%80%93%20Dados%20de%20registro%20de%20Cacha%C3%A7a%20e%20aguardente..pdf)  
2274 [%20Cacha%C3%A7a%20no%20Brasil%20%E2%80%93%20Dados%20de%20registro%20de%20Cacha%C3%A7a%20e%20aguardente..pdf](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/A%20Cacha%C3%A7a%20no%20Brasil%20%E2%80%93%20Dados%20de%20registro%20de%20Cacha%C3%A7a%20e%20aguardente..pdf): 27 p. 2019.  
2275  
2276  
2277 BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; DE CAMPOS, I. T. N.; DE FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M.  
2278 Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes.

2279 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.3, p.598. 2013. Disponível em:  
2280 <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0193-3>  
2281 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12010-013-0193-3.pdf>>. Acesso em. doi:  
2282 10.1007/s12010-013-0193-3  
2283  
2284 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
2285 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
2286 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **J Agri Environ Sci**, v.4, n.1, p.90. 2015.  
2287 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.15640/jaes.v4n1a12>>. Acesso em. doi:  
2288 10.15640/jaes.v4n1a12  
2289  
2290 BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.;  
2291 RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic  
2292 biomass: a review. **Enzyme Res**, v.2011, p.787532. 2011. Disponível em:  
2293 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687609>>. Acesso em. doi: 10.4061/2011/787532  
2294  
2295 CHRISTOFOLETI-FURLAN, R. M.; PORTUGAL, C. B.; VARIZE, C. S.; MUYNARSK, E.  
2296 S. M.; ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel  
2297 starters for high-gravity brewing. **Food Research International**, v.135, p.109282. 2020.  
2298 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920303070>>.  
2299 Acesso em. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109282  
2300  
2301 CRAVO, F. D. C.; SANTIAGO, W. D.; DA SILVA LUNGUINHO, A.; BARBOSA, R. B.;  
2302 DA SILVA OLIVEIRA, R. E.; ALVARENGA, G. F.; SANTOS, S. D.; SOUZA, R. H. Z.;  
2303 DE SOUZA, E. C.; DE ALMEIDA, K. J. Composition of Cachaças Produced from Five  
2304 Varieties of Sugarcane and the Correlation of the Presence of Dhurrin in the Cane with That  
2305 of Ethyl Carbamate in the Product. **American Journal of Plant Sciences**, v.10, n.2, p.339.  
2306 2019. Disponível em: em. doi: 10.4236/ajps.2019.102025  
2307  
2308 CUBILLOS, F. A.; GIBSON, B.; GRIJALVA-VALLEJOS, N.; KROGERUS, K.; NIKULIN,  
2309 J. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**,  
2310 v.36, n.6, p.383. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30698853>>.  
2311 Acesso em. doi: 10.1002/yea.3380  
2312  
2313 DE SMIDT, O.; DU PREEZ, J. C.; ALBERTYN, J. Molecular and physiological aspects of  
2314 alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS**  
2315 **Yeast Research**, v.12, n.1, p.33. 2012. Disponível em:  
2316 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094012>>. Acesso em: 5/19/2020. doi:  
2317 10.1111/j.1567-1364.2011.00760.x  
2318  
2319 DIONISI, D.; SILVA, I. M. O. Production of ethanol, organic acids and hydrogen: an  
2320 opportunity for mixed culture biotechnology? **Reviews in Environmental Science and**  
2321 **Bio/Technology**, v.15, n.2, p.213. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11157-016-9393-y>>.  
2322 Acesso em. doi: 10.1007/s11157-016-9393-y  
2323  
2324 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric  
2325 Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v.28,  
2326 n.3, p.350. 1956. Disponível em: em. doi: 10.1021/ac60111a017  
2327

2328 FERNANDES BRAGA, M. V. K., I. B. . A Cachaça como patrimônio: turismo, cultura e  
2329 sabor. **Revista de Turismo Contemporâneo**, v. v. 3, n.2. 2015. Disponível em:  
2330 <<https://periodicos.ufrn.br/turismocontemporaneo/article/view/7763>>. Acesso em. doi,  
2331 <https://periodicos.ufrn.br/turismocontemporaneo/article/view/7763>  
2332

2333 FIGUEIREDO, B. I. C.; SARAIVA, M. A. F.; DE SOUZA PIMENTA, P. P.; DE SOUZA  
2334 TESTASICCA, M. C.; SAMPAIO, G. M. S.; DA CUNHA, A. C.; AFONSO, L. C. C.;  
2335 VIEIRA DE QUEIROZ, M.; DE MIRANDA CASTRO, I.; BRANDAO, R. L. New Lager  
2336 Brewery Strains Obtained by Crossing Techniques Using Cachaca (Brazilian Spirit) Yeasts.  
2337 **Applied and Environment Microbiology**, v.83, n.20, p.e01582. 2017. Disponível em:  
2338 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778887>>. Acesso em. doi: 10.1128/AEM.01582-  
2339 17  
2340

2341 FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J.**  
2342 **biol. Chem.**, v.73, n.2, p.627. 1927. Disponível em: em. doi,  
2343

2344 GAMA, A. R.; BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; DE SOUZA, G. R. L.;  
2345 CARNEIRO, L. C.; BATAUS, L. A. M. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel  
2346 bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**,  
2347 v.36, n.2, p.e2934. 2020. Disponível em:  
2348 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
2349 10.1002/btpr.2934  
2350

2351 GOWD, V.; SU, H.; KARLOVSKY, P.; CHEN, W. Ethyl carbamate: An emerging food and  
2352 environmental toxicant. **Food Chemistry**, v.248, p.312. 2018. Disponível em:  
2353 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461732037X>>. Acesso em. doi:  
2354 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.072>  
2355

2356 GRANATO, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.;  
2357 ALABURDA, J. Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial  
2358 Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers. **Food Research International**, v.60,  
2359 p.212. 2014. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.foodres.2013.09.044  
2360

2361 HONG, K. Q.; FU, X. M.; DONG, S. S.; XIAO, D. G.; DONG, J. Modulating acetate ester  
2362 and higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae* through the cofactor engineering.  
2363 **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.46, n.7, p.1003. 2019. Disponível  
2364 em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969383>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10295-  
2365 019-02176-4  
2366

2367 HOSSAIN, N.; HAJI ZAINI, J.; MAHLIA, T. M. I. A Review of Bioethanol Production from  
2368 Plant-based Waste Biomass by Yeast Fermentation. **International Journal of Technology**,  
2369 v.8, n.1, p.5. 2017. Disponível em: em: 2020/05/19. doi: 10.14716/ijtech.v8i1.3948  
2370

2371 JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-  
2372 products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v.199, p.103.  
2373 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482946>>. Acesso em. doi:  
2374 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>  
2375

2376 KRIVORUCHKO, A.; ZHANG, Y.; SIEWERS, V.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Microbial  
2377 acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v.28, p.28.  
2378 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25485951>>. Acesso em. doi:  
2379 10.1016/j.ymben.2014.11.009  
2380  
2381 MENDONÇA, J. G. P.; CARDOSO, M. D. G.; SANTIAGO, W. D.; RODRIGUES, L. M. A.;  
2382 NELSON, D. L.; BRANDÃO, R. M.; DA SILVA, B. L. Determination of ethyl carbamate in  
2383 cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. v.122, n.1, p.63. 2016.  
2384 Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jib.308>>. Acesso em. doi:  
2385 10.1002/jib.308  
2386  
2387 ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; SILVA, A. A. D.; GALINARO, C. A.;  
2388 FRANCO, D. W. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1839. 2009.  
2389 Disponível em: em. doi: 10.1590/s0100-40422009000700029  
2390  
2391 PAIVA, A. L. D.; SOUZA, R. B. D.; BARRETO, I. D. D. C.; BRITO, M. J. D. Fluxo das  
2392 Exportações Brasileiras de Cachaça: traços da influência do Estado no setor. **Revista de**  
2393 **Economia e Sociologia Rural**, v.55, p.733. 2017. Disponível em:  
2394 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso)  
2395 [20032017000400733&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/1234-56781806-94790550407  
2396  
2397 PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer's  
2398 aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.  
2399 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, n.5, p.1937. 2014. Disponível em:  
2400 <<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-013-5470-0  
2401  
2402 PORTUGAL, C. B.; ALCARDE, A. R.; BORTOLETTO, A. M.; DE SILVA, A. P. The role  
2403 of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food**  
2404 **Research and Technology**, v.242, n.9, p.1587. 2016. Disponível em:  
2405 <<https://doi.org/10.1007/s00217-016-2659-3>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00217-016-2659-3  
2406  
2407 RESENDE OLIVEIRA, É.; CALIARI, M.; SOARES SOARES JÚNIOR, M.; RIBEIRO  
2408 OLIVEIRA, A.; CRISTINA MARQUES DUARTE, R.; VALÉRIO DE BARROS VILAS  
2409 BOAS, E. Assessment of chemical and sensory quality of sugarcane alcoholic fermented  
2410 beverage. **Journal of food science and technology**, v.55, n.1, p.72. 2018. Disponível em:  
2411 <<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2792-4>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13197-017-2792-4  
2412  
2413 SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. Sugarcane Spirits (Cachaça) Quality Assurance and  
2414 Traceability: An Analytical Perspective. In: GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M.  
2415 (Ed.). **Production and Management of Beverages**: Woodhead Publishingv. 10.1016/b978-0-  
2416 12-815260-7.00011-0, 2019. p.335. ISBN 9780128152607.  
2417  
2418 SILVA, J. H. D. N. E.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. D. Cachaça  
2419 Production in Brazil and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). **Scientia Agricola**, v.77.  
2420 2020. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162020000201800&nrm=iso)  
2421 [90162020000201800&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162020000201800&nrm=iso)>. Acesso em. doi: [http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-](http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0135)  
2422 [0135](http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0135)  
2423

- 2424 SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass–  
2425 An overview. **Bioresource Technology**, v.199, p.76. 2016. Disponível em: em. doi,  
2426
- 2427 SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.;  
2428 ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.;  
2429 BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.  
2430 **Química Nova**, v.30, n.2, p.351. 2007. Disponível em: em. doi:  
2431 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>  
2432
- 2433 SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase  
2434 production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for  
2435 bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, n.2, p.421. 2009. Disponível em:  
2436 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148108002176>>. Acesso em. doi:  
2437 10.1016/j.renene.2008.05.008  
2438
- 2439 TZENG, D. I.; CHIA, Y. C.; TAI, C. Y.; OU, A. S. M. Investigation of chemical quality of  
2440 sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) wine during fermentation by *Saccharomyces*  
2441 *cerevisiae*. **Journal of Food Quality**, v.33, n.2, p.248. 2010. Disponível em: em. doi,  
2442
- 2443 VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. D. J. S. A. Cachaça Production in Brazil  
2444 and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). v.77, n.2. 2020. Disponível em: em. doi:  
2445 10.1590/1678-992x-2018-0135  
2446
- 2447 WEBERSINKE, F.; KLEIN, H.; FLIEHER, M.; URBAN, A.; JÄGER, H.; FORSTER, C.  
2448 Control of Fermentation By-Products and Aroma Features of Beer Produced with Scottish Ale  
2449 Yeast by Variation of Fermentation Temperature and Wort Aeration Rate. **Journal of the**  
2450 **American Society of Brewing Chemists**, v.76, n.3, p.147. 2018. Disponível em:  
2451 <<https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1469082>>. Acesso em. doi:  
2452 10.1080/03610470.2018.1469082  
2453
- 2454 XU, X.; NIU, C.; LIU, C.; LI, Q. Unraveling the Mechanisms for Low-Level Acetaldehyde  
2455 Production during Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces pastorianus* Lager Yeast.  
2456 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.7, p.2020. 2019. Disponível em:  
2457 <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06868>>. Acesso em. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06868  
2458
- 2459

2460

## CAPÍTULO 5

2461 **O EFEITO DA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DO CALDO**  
2462 **DE CANA COM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO ISOLADO DE *STREPTOMYCES***  
2463 **SP. I7 NO PERFIL QUÍMICO DA CACHAÇA ARTESANAL.**

2464 Menandes Alves de Souza Neto <sup>1\*</sup>, Juliana Aparecida Correia Bento <sup>1</sup>, Aline  
2465 Rodrigues Gama<sup>2</sup>, Márcio Caliari<sup>1</sup>, Luciano Moraes Leão<sup>3</sup> Vinicius Silva Pinto<sup>3</sup> e Luiz Artur  
2466 Mendes Bataus<sup>2</sup>

2467 <sup>1</sup>Food Engineering Department, Federal University of Goiás – UFG, CP 131, CEP  
2468 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

2469 <sup>2</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás – UFG, CP 131, CEP  
2470 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

2471 <sup>3</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Goiás – UFG, CP 131, CEP 74690-900,  
2472 Goiânia, Goiás, Brazil.

2473 **Resumo:** Este trabalho avaliou a produção de enzimas lignolíticas utilizando *Streptomyces sp*  
2474 I7, os impactos da utilização do extrato enzimático no processo fermentativo e na composição  
2475 química dos destilados produzidos. O extrato bruto de *Streptomyces sp I7* apresentou atividade  
2476 de CMCase ( $35,47 \pm 1,22$  UI mL<sup>-1</sup>) e xilanase ( $9,18 \pm 0,28$  U.) O uso do extrato promoveu  
2477 diferenças no perfil do pH, no teor de sólidos solúveis, teor de açúcares totais e compostos  
2478 fenólicos. A concentração de etanol ( $338,12 \pm 1,4$  e  $313,6 \pm 0,9$  g.L<sup>-1</sup>) e teor alcoólico (42,8 e  
2479 39,7%) foram maiores na amostra com enzimas ativas. A análise dos perfis químicos  
2480 demonstrou que a sacarificação induziu a redução da acidez total ( $70,2 \pm 0,3$  e  $134,5 \pm 0,8$  g.L<sup>-1</sup>),  
2481 aldeídos totais ( $8,1 \pm 0,2$  e  $8,8 \pm 0,3$ ), metanol ( $0,2 \pm 0,1$  e  $0,60 \pm 0,1$ ) e Carbamato de Etila  
2482 ( $3,3 \pm 0,2$  e  $3,8 \pm 0,1$ ). Houve o aumento em relação ao teor de ésteres totais ( $9,7 \pm 0,2$  e  $6,2 \pm 0,3$ ).  
2483 Essas alterações sugerem uma melhoria em atributos de qualidade na cachaça produzida através  
2484 do processo fermentativo com a utilização do extrato enzimático. A utilização do extrato

2485 enzimático pode contribuir para a melhoria do rendimento de processos industriais de produção  
2486 de bebidas e biocombustíveis.

2487 **Palavras chave:** Celulases, Xilanases, Hidrólise Enzimática, tratamento pré-fermentação e  
2488 cachaça

2489 \*Corresponding author: Phone: +55 (62) +556235211493; E-mail: [menandesneto@gmail.com](mailto:menandesneto@gmail.com)

## 2490 **INTRODUÇÃO**

2491 A Cachaça é bebida genuinamente brasileira e exclusiva da aguardente de cana  
2492 produzida no Brasil, produzida através da fermentação seguida da destilação, atingindo 38 a  
2493 48% de graduação alcoólica a 20 °C (BRASIL, 2003; 2005). A cachaça tem sido um produto  
2494 de destaque e de grande importância econômica. Em 2018, foram produzidos mais de 8,41  
2495 milhões de litros, a cachaça foi exportada para mais de 77 países e movimentou US\$ 15,61  
2496 milhões (IBRAC, 2019; PAIVA et al., 2017).

2497 A produção de cachaça pode ser dividida em dois grupos: a cachaça industrial a partir  
2498 de microrganismos selecionados e produção em larga escala. Já o segundo grupo é o das  
2499 cachaças artesanais, produzidas em pequena escala e com a utilização de microrganismos  
2500 provenientes da fermentação espontânea. Desta forma, as cachaças artesanais apresentam  
2501 características sensoriais próprias e geralmente são associadas a um produto de maior qualidade  
2502 (NEUTZLING et al., 2015).

2503 A cachaça artesanal geralmente utiliza a fermentação espontânea, onde a levedura é  
2504 selecionada por vários métodos, incluindo o desenvolvimento da microbiota fermentativa  
2505 apenas no caldo de cana de açúcar ou a mistura do caldo de cana de açúcar com milho triturado  
2506 e farinha de arroz ou soja (BARBOSA et al., 2018; D'SILVA et al., 2019a).

2507 Esta metodologia permite o desenvolvimento de diversos microrganismos que podem,  
2508 individualmente, contribuir para a qualidade do produto através da síntese de produtos  
2509 minoritários (congêneres) como ácidos, álcoois e ésteres ou ainda reduzir o rendimento da  
2510 fermentação alcoólica. As concentrações elevadas de produtos minoritários estão relacionadas  
2511 com menor aceitação sensorial e conseqüentemente a redução da qualidade do produto ou ainda  
2512 trazer risco à saúde dos consumidores (DE SOUZA et al., 2012; PORTUGAL et al., 2016;  
2513 PORTUGAL et al., 2017). A regulamentação para limites para a presença de congêneres e  
2514 contaminantes é estabelecida pela Instrução Normativa nº 13/2005 (BRASIL, 2003b) e  
2515 Instrução Normativa nº 28/2014 (BRASIL, 2014).

2516 A fermentação espontânea é considerada um processo mais lento, com menor  
2517 aproveitamento dos açúcares disponíveis, resultando em elevado teor de açúcares residuais e  
2518 menores concentrações de etanol, quando comparada com a fermentação comercial  
2519 (CARVALHO et al., 2015). Leveduras selvagens são consideradas nativas do ambiente, podem  
2520 ser do gênero *Saccharomyces* ou não e podem causar excesso de produção de espuma, perda  
2521 do teor alcoólico e de eficiência fermentativa. Esta perda é proporcional ao nível de  
2522 contaminação presente, e modificações na morfofisiologia de leveduras *Saccharomyces*  
2523 *cerevisiae* podem acentuar estes traços indesejáveis para a fermentação (LORENZ; CUTLER;  
2524 HEITMAN, 2000).

2525 Alguns procedimentos têm sido utilizados para melhorar o processo de fermentação  
2526 natural. Um dos procedimentos utilizados é a adição de hidróxido de cálcio até atingir pH 6,0  
2527 promovendo a coagulação de partículas presentes em suspensão no caldo de cana e posterior  
2528 aquecimento até a fervura (RIBEIRO et al., 2017) O tratamento térmico é uma opção que  
2529 objetiva a redução da população microbiana do caldo e contribui para a manutenção do número  
2530 de células viáveis de leveduras, a menor síntese de ácidos orgânicos e o aumento da produção

2531 de álcool (ALVES et al., 2018). Outro método é a realização de um pré-tratamento enzimático  
2532 do caldo de cana, o qual possibilita a degradação da lignina e hemicelulose presentes no caldo  
2533 de cana e conseqüentemente aumentando o teor de açúcares fermentescíveis oriundos da  
2534 degradação destes polissacarídeos (CANILHA et al., 2012).

2535 A hidrólise enzimática da celulose requer três classes de enzimas celulolíticas  
2536 (celulases): (1) endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EG, E.C. 3.2.1.4) que atacam regiões de baixa  
2537 cristalinidade na fibra de celulose, criando extremidades livres; (2) celobio-hidrolases ou  
2538 exoglucanase (CBH, E.C. 3.2.1.91) que liberam a celobiose; (3)  $\beta$ -glicosidases (E.C.3.2.1.21)  
2539 que hidrolisam a celobiose para produzir glicose (OBENG et al., 2017). Para decompor a  
2540 hemicelulose, várias enzimas como xilanases,  $\beta$ -xilosidases, glicuronidases, acetilesterases,  
2541 galactomananases e glucomananases são necessárias (MARQUES et al., 2018).

2542 A celulase quebra a celulose em glicose e a xilanase ajuda a decompor a xilana em  
2543 xilose, sendo ambos açúcares fermentescíveis. Além disso, a decomposição da xilana aumenta  
2544 a porosidade da fibra de celulose e a torna mais acessível às celulases. Ambos os fatores acima  
2545 levam ao aumento do rendimento de etanol durante a etapa final da fermentação por levedura  
2546 (BAJAJ; MAHAJAN, 2019).

2547 Diversas bactérias têm demonstrado a capacidade de produzir celulases e xilanases com  
2548 características próprias. Dentre elas destacam-se as pertencentes ao gênero *Streptomyces*.  
2549 devido sua capacidade de produzir celulases e xilanases termo resistentes (BRITO-CUNHA et  
2550 al., 2013; BRITO-CUNHA et al., 2015; DE QUEIROZ BRITO CUNHA et al., 2018; GAMA  
2551 et al., 2019).

2552 A sacarificação e fermentação simultâneas é uma metodologia economicamente  
2553 favorável para a produção de bioetanol a partir de lignocelulósicos quando comparado à

2554 metodologia convencional onde a hidrólise e fermentação acontecem em etapas distintas pois  
2555 o rendimento final de etanol é maior e ainda permite a redução do consumo de energia e dos  
2556 custos de produção são minimizados (LUIZA ASTOLFI et al., 2020; SIRIWONG et al., 2019).

2557 Este trabalho teve por objetivo avaliar os impactos na sacarificação utilizando extrato  
2558 enzimático produzido por *Streptomyces* sp I7. Também avaliou a influência na fermentação  
2559 natural, na atividade enzimática de celulase e xilanase em presença de cachaça e as alterações  
2560 no perfil químico das cachaças obtidas.

## 2561 **MATERIAL E MÉTODOS**

### 2562 **Obtenção e armazenamento do caldo de cana**

2563 O caldo de cana foi obtido pela moagem da cana (*Saccharum officinarum* Linn.), sem  
2564 nenhum processo de filtração, em julho de 2018, em um mercado local em Goiânia, Goiás. O  
2565 Caldo foi armazenado em garrafas plásticas que foram transportadas em temperatura ambiente  
2566 para o Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás,  
2567 onde as fermentações foram promovidas.

### 2568 **Microrganismos**

2569 O caldo de cana, sem nenhum tipo de diluição para ajuste no teor de sólidos solúveis,  
2570 foi incubado a temperatura ambiente por 24 horas, permitindo que a fermentação espontânea  
2571 ocorresse. Após 24 horas de incubação uma amostra foi removida e semeada em placas de petri  
2572 contendo meio Pridham (PRIDHAM et al., 1957). As placas foram incubadas por 5 dias a 32  
2573  $\pm 1$  °C.

2574 Para produção do extrato enzimático foi utilizado o *Streptomyces* sp. I7 pertencente ao  
2575 banco de microrganismos do Laboratório De Bioquímica e Engenharia Genética da  
2576 Universidade Federal de Goiás. As fermentações para obtenção dos extratos ocorreram  
2577 conforme (GAMA et al., 2019).

## 2578 **Caracterização das colônias**

2579 As colônias da levedura selecionada foi avaliada quanto a cor (branca, creme,  
2580 amarelada, laranja, rosa, vermelha, etc.), ao brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou  
2581 fusiforme), superfície (lisa ou rugosa) e elevação (plana, convexa, umbonada) (KURTZMAN;  
2582 FELL; BOEKHOUT, 2011)

## 2583 **Fermentação Semi-Sólida e obtenção de extrato enzimático**

2584 Uma suspensão de esporos de *Streptomyces* sp. I7 ( $10^6$  aproximadamente) foi inoculada  
2585 em Erlenmeyers contendo 15 ml de meio mínimo ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   
2586  $\text{NaCl}$  -  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) previamente autoclavado e 5 g de substrato de farelo de  
2587 trigo. No final do período de incubação de 5 dias a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , foram adicionados 50 ml de água  
2588 e 50 ml de Tween-80 (0,1 g ~ 100 g-1). O material foi agitado por 10 minutos. Após decantação  
2589 o sobrenadante foi removido por sucção e posteriormente centrifugado a 7500G durante 15 min  
2590 a  $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ . O sobrenadante foi transferido para tubos falcon de 50 mL e armazenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$   
2591  $\pm 1$  até que os ensaios fossem realizados.

## 2592 **Ensaio enzimáticos**

2593 O sobrenadante obtido na etapa anterior, foi avaliado quanto à atividade enzimática de  
2594 xilanase e CMCCase (carboximetilcelulase). A dosagem da atividade endoglucanásica foi  
2595 realizada utilizando carboximetilcelulose em micro-ensaio foi realizada segundo RAMADA et  
2596 al. (2010). A atividade enzimática da xilanase foi determinada utilizando soluções de xilana  
2597 bechwood a 1% (p/v) (Sigma®) como substrato. A atividade foi determinada por micro-ensaio,  
2598 adicionando 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 90  $\mu\text{L}$  da solução de xilana a 1% (GHOSE, 1987) e ADNEY ,  
2599 BAKER (1996). A solução foi incubada a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, seguida da quantificação de  
2600 açúcares redutores pelo método ADNS (MILLER, 1959). A curva padrão de xilose foi  
2601 determinada com concentrações de 0,3 a 4,2 mg mL<sup>-1</sup>. Uma unidade de atividade (UI)  
2602 corresponde a 1  $\mu\text{M}$  de glicose (CMCase) ou xilana (xilanase) liberada por minuto.

### 2603 **Pré tratamento e ajustes da concentração do caldo de cana**

2604 O tubo falcon contendo 50 mL do extrato enzimático foi descongelado à temperatura  
2605 ambiente e posteriormente, 10 mL foi submetido à desnaturação enzimática por fervura em  
2606 água a 100 °C por 10 minutos. Foi inoculado no tempo 0, um mL do extrato enzimático  
2607 desnaturado diretamente em cada um de três Erlenmeyer contendo 1 litro caldo de cana  
2608 (Tratamento controle). Foi inoculado no tempo 0, um mL do extrato enzimático com atividade  
2609 de CMCase mensurada foi de  $35,47 \pm 1,22 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  e a atividade de xilanase de  $9,18 \pm 0,28$   
2610  $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  em cada um de três Erlenmeyer, cada um contendo 1 L de caldo de cana (Tratamento  
2611 enzimático). Uma unidade de atividade (UI) corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de glicose e xilose liberada  
2612 por minuto para CMCase e xilanase, respectivamente.

### 2613 **Condução das fermentações alcoólicas**

2614 As fermentações alcoólicas espontâneas foram conduzidas em Biorreator encamisado  
2615 SL-134 (SOLAB, Piracicaba, Brasil), com capacidade de trabalho de 6 L batelada, em  
2616 temperatura ambiente por 120 horas

2617 Acompanhamento do processo fermentativo

2618 Foram avaliadas o pH em potenciômetro (Tecnal, TEC-51, Piracicaba, Brasil), com  
2619 inserção do eletrodo diretamente na amostra, o Teor de sólidos solúveis (TSS) (° Brix) em  
2620 refratômetro digital (Nova Instruments, Nova WYA-2S, Brasil) conforme a AOAC (2012),  
2621 açúcares totais pelo método fenol sulfúrico conforme DUBOIS et al. (1956) e compostos  
2622 fenólicos FOLIN , CIOCALTEU (1927) e SOUSA et al. (2007) nos tempos de 0, 2, 8, 16, 24,  
2623 32, 40, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação.

### 2624 **Destilação**

2625 Após a fermentação, o processo de destilação foi realizado utilizando uma manta  
2626 aquecedora, um balão volumétrico de vidro com capacidade de 1 L acoplado a uma coluna de  
2627 Vigreux de 60 cm e um condensador de 50 cm. A temperatura foi mantida entre 90 e 92 °C. O

2628 destilado foi separado em três frações. A primeira fração (fração da cabeça) foi coletada  
2629 separadamente e padronizada para um volume correspondente a aproximadamente 10% do  
2630 volume total de bebida. A fração intermediária (fração do coração) foi então coletada até atingir  
2631 uma concentração de etanol de aproximadamente 400 g / L. A última fração (fração caudal),  
2632 correspondente a 10% do volume de bebida produzida, também foi coletada (ALONSO  
2633 GONZÁLEZ et al., 2010). A bebida final foi armazenada em garrafas de vidro, com tampa e  
2634 mantida em temperatura ambiente até a realização das análises físico-químicas.

#### 2635 Perfil químico por Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$

2636 Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III,  
2637 11,75 Tesla, equipado com sonda de detecção inversa de tripla ressonância (TBI). Foram  
2638 solubilizados 100  $\mu\text{L}$  de amostra de cachaça em 400  $\mu\text{L}$  solução de óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) +  
2639 trimetilsililpropionato de sódio (TMSP- $\text{d}_4$ ) 0,1%. Os espectros foram obtidos a 500,0 MHz para  
2640 o núcleo de  $^1\text{H}$ , sem giro da amostra e temperatura constante a 20 °C.

2641 Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados com sequência de pulsos zg (Bruker), ajuste  
2642 automático da homogeneidade do campo magnético (shimming), calibração automática de  
2643 pulsos, com 128 promediações com tempo de aquisição de 23,3 segundos, janela espectral de  
2644 20,0 ppm com número de pontos de aquisição e processamento iguais a 65.536 pontos e ganho  
2645 do receptor fixo em 203. A linha de base e a fase corrigida automaticamente.

2646 Para a etapa de caracterização dos perfis químicos foram adquiridos com sequência de pulsos  
2647 noesygppr1d (Bruker), usada para suprimir as intensidades preponderantes dos sinais dos  
2648 hidrogênios do etanol ( $\delta$  1,20; 3,65) e da água ( $\delta$  4,80), presentes em proporções elevadas em  
2649 relação aos demais componentes. Foram realizadas 256 promediações com tempo de aquisição  
2650 igual a 23,3 segundos, janela espectral de 20,0 ppm, tempo de mistura igual a 150 milissegundos  
2651 e número de pontos de aquisição e processamento iguais a 65.536 pontos ganho do receptor  
2652 fixo em 203. A linha de base e a fase foram corrigidas automaticamente.

2653 Para a calibração do método ERETIC, usado na quantificação dos analitos, foi usado amostra  
2654 padrão Bruker certificada e selada, em tubo contendo 2,0 mmol.L<sup>-1</sup> de sacarose + ácido 4,4-  
2655 dimetil-4-silapentano sulfônico (DSS) 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> + azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>+  
2656 D<sub>2</sub>O 10% + H<sub>2</sub>O 90 % (v/v) de. A calibração do dispositivo eletrônico foi feita pela integração  
2657 do sinal do hidrogênio em δ 5,40 da sacarose.

### 2658 **Análises estatísticas**

2659 Os dados são expressos como a média ± desvio padrão (DP) de três repetições.  
2660 Diferenças significativas entre as médias dos parâmetros foram calculadas com uma análise de  
2661 variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni com nível de significância p <0,05 usando o  
2662 software Graph pad prism 5 ®.

## 2663 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 2664 **Caracterização das colônias**

2665 Após 120 horas de incubação em estufa a 32 °C as placas foram retiradas e analisadas  
2666 quanto à morfologia. Observou-se a presença de 10 colônias, dispersas, de cor branca,  
2667 brilhantes, de formato circular, com superfície rugosa. As presença de colônias lisas e brilhantes  
2668 e células dispersas foram caracterizadas como *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com REIS  
2669 et al. (2013). Estas características são sugestivas de a levedura isolada pertence ao gênero  
2670 *Saccharomyces*. apesar da diferença entre o aspecto encontrado (rugoso) e o esperado (liso).  
2671 Segundo CASALONE et al. (2005) as morfologias celulares e das colônias de microrganismos  
2672 selvagens ou industriais de linhagens de *S. cerevisiae* variam em resposta a diferentes estímulos  
2673 ambientais. Cepas de *S. cerevisiae* exibindo colônias rugosas e morfologia pseudo-hifal têm  
2674 sido frequentemente associadas a distúrbios no processo de fermentação, dependendo do  
2675 sistema de fermentação e de outras condições operacionais. Conforme D'SILVA et al. (2019b)

2676 a identificação baseada somente na morfologia das colônias é falha e sugere a utilização de  
2677 métodos de biologia molecular.

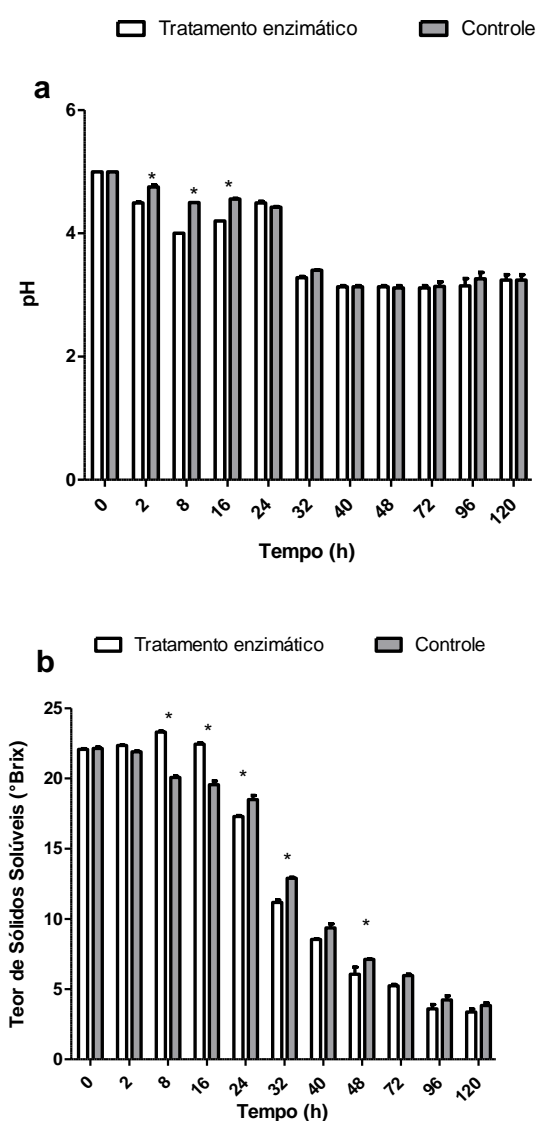
### 2678 **Acompanhamento do processo fermentativo**

2679 Segundo BORTOLETTO; SILVELLO , ALCARDE (2018) existem vários pontos  
2680 críticos na produção de cachaça de qualidade. Entre eles destaca-se o teor de sólidos solúveis,  
2681 o pH e o teor de açúcares totais. O processo de fermentação foi acompanhado através da medida  
2682 do pH e da medida de BRIX, teor de açúcar redutor e concentração de fenóis totais. Analisando  
2683 a variação do pH durante a fermentação, verificou-se a redução do pH em ambos os processos.  
2684 Tal redução é esperada e conforme OLIVA-NETO , YOKOYA (2001) é relacionada com o  
2685 aumento do metabolismo da levedura, sugerindo aumento na produção de etanol. Ao comparar  
2686 os tratamentos, observa-se uma pequena variação entre os tratamentos. Nos tempos 2, 8 e 16  
2687 horas de fermentação houve uma diferença significativa no pH (figura 2.a).

2688 Esta diferença pode estar relacionada à presença de ácidos orgânicos como ácido p-  
2689 cumárico, hidroxicinâmico e ferúlico (MASARIN et al., 2011). Outros ácidos fenólicos também  
2690 foram encontrados em caldo de cana fermentado como o caféico, clorogênico e gálico  
2691 (RESENDE OLIVEIRA et al., 2018).

2692 Em relação ao teor de sólidos solúveis não houve variação entre o tempo 0 e tempo 2  
2693 horas, provavelmente devido à fase de adaptação dos microrganismos ao meio (OLIVEIRA et  
2694 al., 2016). Verificou-se no tratamento enzimático o aumento no TSS nos tempos 2, 8 e 16 horas  
2695 sendo estatisticamente significativa a diferença nos tempos 8 e 16 horas. Esta diferença pode  
2696 estar relacionada à degradação dos polissacarídeos presentes no caldo de cana. SHARMA;  
2697 PATEL , SUGANDHA (2017) também relataram a redução do pH e o aumento do TSS após o  
2698 tratamento com celulases isolada ou em associação com outras enzimas, em diferentes  
2699 combinações e condições em sucos de frutas diversas.

2700 Após 24 horas de fermentação verificou-se a redução maior no TSS quando  
2701 comparados os tratamentos com diferenças estatisticamente significativas nos tempos 24, 32 e  
2702 48 horas. Provavelmente a variação observada está relacionada a atividade das enzimas  
2703 presentes no extrato. RESENDE OLIVEIRA et al. (2018) relataram a presença de açúcares não  
2704 fermentescíveis durante a fermentação do caldo de cana. A degradação destes açúcares pelo  
2705 tratamento enzimático pode estar relacionada ao aumento tanto no TSS quanto nos açúcares  
2706 totais observados neste trabalho.



2707

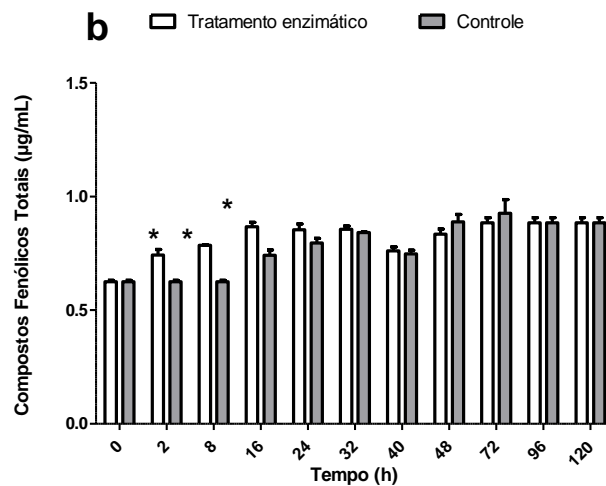
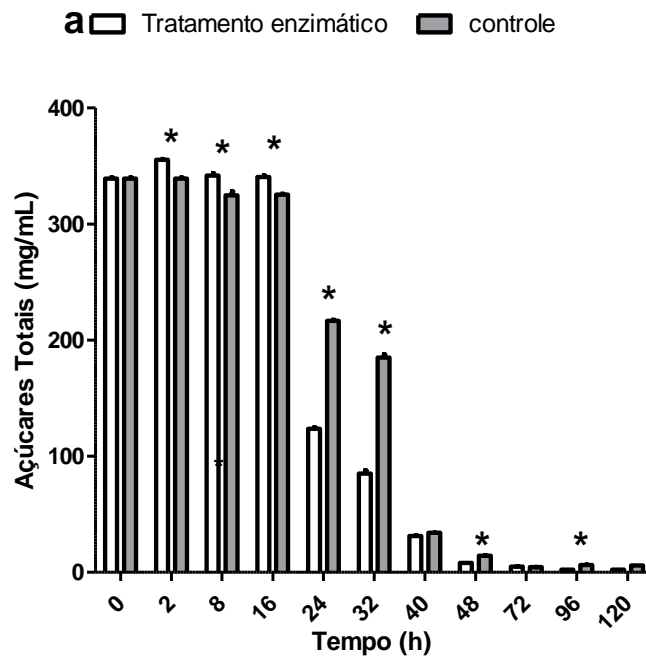
2708 Figura 2. Variação do pH (a) e a variação no Teor de sólidos solúveis (b) durante os tempos 0, 2, 8, 16,  
2709 24, 32, 40, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação espontânea do caldo de cana com tratamento enzimático do

2710 extrato bruto de *Streptomyces* sp. I7 e com o extrato bruto de *Streptomyces* sp. I7 desnaturado (controle) . O  
2711 asterisco (\*) representa diferença estatística significativa (p < 0,05).

2712 Foi observado um aumento no teor de açúcares totais nas primeiras 16 horas da  
2713 fermentação no tratamento enzimático e a redução no teor de açúcares totais no tratamento  
2714 controle. Após 24 horas de fermentação observa-se a redução em ambos. Comparando os  
2715 tratamentos houve diferença estatística nos tempos 2, 8, 16, 24, 32, 48 e 96 horas (Figura 3a).  
2716 Esta diferença pode estar associada às alterações físico-químicas promovidas pelo tratamento  
2717 enzimático. A diferença nas primeiras 16 horas pode estar relacionada a degradação de açúcares  
2718 residuais presentes no caldo de cana. Após 24 horas de fermentação a diferença observada pode  
2719 corroborar a maior concentração de etanol obtida.

2720 Em relação aos compostos fenólicos totais verificou -se um aumento nos tempos 2, 8 e  
2721 16 horas nos tratamentos contendo enzima ativa. Após 24 horas de fermentação a concentração  
2722 de fenóis ficou relativamente constante. Não houve diferenças significativas entre os  
2723 tratamentos após 24 horas (figura 3b). RAKARIYATHAM et al. (2019) também observou o  
2724 aumento do teor de compostos fenólicos ao utilizar celulasas no tratamento das cascas de  
2725 Longan (*Dimocarpus longan*) aumentou o teor de fenólicos insolúveis como por exemplo:  
2726 ácido o-cumárico, corilagina e quercetina, bem como a liberação de fenólicos esterificados, p.  
2727 ácido elágico e ácido gálico, enquanto a  $\beta$  glicosidase aumentou a liberação de fenólicos livres,  
2728 p. ácido elágico.

2729 A maioria dos compostos fenólicos insolúveis (20 a 60% ) presentes em vegetais, frutas  
2730 e verduras interagem por ligações covalentes com substâncias da parede celular, incluindo  
2731 pectina, celulose, arabinosilana e proteínas estruturais (NAYAK; LIU; TANG, 2015).



2732

2733            Figura 3. **Concentração de açúcares totais ( $\text{mg. mL}^{-1}$ ) (a) e Concentração de compostos fenólicos**  
 2734 **totais ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) (b)** durante os tempos 0, 2, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. espontânea  
 2735 do caldo de cana com tratamento enzimático do extrato bruto de *Streptomyces* sp. I7 e com o extrato bruto de  
 2736 *Streptomyces* sp. I7 desnaturado (controle) . O asterisco (\*) representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

2737

### 2738 **Perfis químicos das frações coração dos destilados**

2739

2740            A fração “coração” corresponde ao destilado destinado ao consumo apresentando  
 2741 requisitos químicos conforme o estabelecido pela legislação brasileira (PORTUGAL et al.,

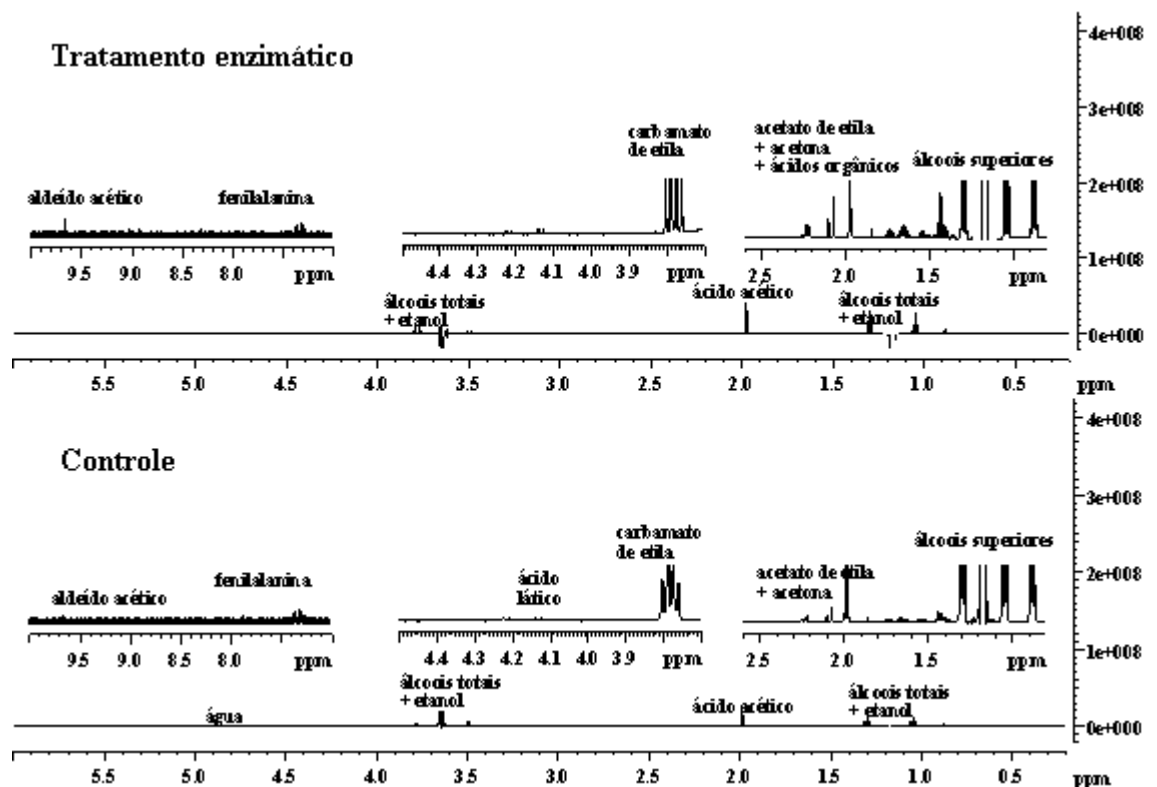
2741

2741            2017). Para avaliar o perfil químico da fração “coração” foi utilizada a ressonância magnética

2742 nuclear, método não invasivo e não destrutivo que permite a análise quantitativa e qualitativa  
2743 com ampla utilização na análise de alimentos (KIRTIL; OZTOP, 2016).

2744 A região espectral entre  $\delta$  2,0-0,8, foi caracterizada pela presença dos sinais dos  
2745 hidrogênios de álcoois alifáticos. Em  $\delta$  0,89, foi identificado um tripleto que foi atribuído aos  
2746 hidrogênios metílicos ( $-\text{CH}_3$ ) do 1-propanol. Seu isômero, 2-propanol (álcool isopropílico) foi  
2747 identificado pelo duplete em  $\delta$  1,15, sinal referente aos hidrogênios metílicos, quimicamente  
2748 equivalentes. Em  $\delta$  1,07, o tripleto intenso foi caracterizado como referente aos hidrogênios  
2749 metílicos do etanol. Os isômeros 1 e 2 butanóis foram caracterizados pelos complexos padrões  
2750 de sinais entre  $\delta$  1,70-1,20, decorrentes dos hidrogênios diastereotópicos e enantiotópicos. O 1-  
2751 pentanol (álcool amílico), foi caracterizado por três conjuntos de sinais em  $\delta$  1,56; 1,33; 0,90.  
2752 Os demais sinais dos álcoois foram atribuídos na faixa espectral entre  $\delta$  4,0-3,4, característica  
2753 de hidrogênios de carbonos ligados diretamente a átomos altamente eletronegativos (ex:  $\text{HC-}$   
2754  $\text{OH}$ ).

2755 Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , também foram identificados sinais de ácidos orgânicos,  
2756 como o acético e láctico, atribuídos em  $\delta$  1,92 e 4,4, respectivamente. A propanona (acetona) foi  
2757 caracterizada por um simpleto em  $\delta$  2,23, próximo ao simpleto do acetato de etila, em  $\delta$  2,04.  
2758 Outro éster identificado foi o carbamato de etila (uretano) por um tripleto próximo a  $\delta$  1,3 e um  
2759 quarteto em  $\delta$  3,9. O acetaldeído (etanal) foi caracterizado por um duplete em  $\delta$  2,20 e por um  
2760 quarteto em  $\delta$  9,70. A glicose foi atribuída por dois dupletos com baixas intensidade em  $\delta$  5,21  
2761 e 4,6. Na região de alta desblindagem, o sistema de spins dos hidrogênios aromáticos da  
2762 fenilalanina foi atribuído por um duplete em  $\delta$  7,3 e dois tripletos em 7,36 e  $\delta$  7,42. O  
2763 comparativo entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de cachaça, obtidas pelos  
2764 tratamentos é apresentado na figura 4.



2765

2766 Figura 4. Comparação entre as frações coração dos destilados obtidos por processos com e sem ação  
 2767 enzimática.

2768 Houve um aumento de 7% tanto no teor alcoólico de 39,7 para 42,8% e concentração  
 2769 de etanol de e 338,12±1,4 g.L-1 para 313,6±0,9 g.L-1 quando comparado o controle com o  
 2770 tratamento enzimático (tabela 1). O aumento da produtividade da fermentação também foi  
 2771 observado por LIU et al. (2017) através da introdução de plasmídeos produtores de celulasas  
 2772 em de *Saccharomyces cerevisiae*. XIAO et al. (2019) demonstraram que cepas modificadas  
 2773 geneticamente de *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade de produzir celulasas e xilanasas  
 2774 apresentam rendimento maior em relação à produção de etanol do que cepas que produzem  
 2775 exclusivamente celulasas.

2776 **Tabela 1.** Quantificação do teor alcoólico e da concentração de etanol na fração coração das  
 2777 cachaças submetidas ao tratamento com o extrato enzimático bruto de *Streptomyces sp.* I7  
 2778 (1:1000) e cachaça controle obtidos por ressonância magnética nuclear H<sup>1</sup>.

Componentes	Cachaça com tratamento enzimático	Cachaça controle
Teor alcoólico (%)	42,8	39,7

Etanol (g.L-1)	338,12±1,4	313,6±0,9
----------------	------------	-----------

2779 Em relação ao perfil de compostos secundários (Tabela 2) foi observada a redução de  
2780 91% na acidez volátil (expressa em ácido etanóico) no tratamento enzimático quando  
2781 comparado ao controle. Em pH baixo, o ácido acético está principalmente em sua forma  
2782 lipofílica não dissociada, que é capaz de se difundir através da membrana celular das leveduras.  
2783 Uma vez dentro da célula, no citosol quase neutro, o ácido fraco se dissocia, levando à liberação  
2784 de prótons (H<sup>+</sup>) e do ânion ácido (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Consequentemente, o pH intracelular diminui e  
2785 a atividade metabólica celular é inibida e ocorre o acúmulo de acetato no interior da célula  
2786 também aumenta a pressão do turgor e o estresse oxidativo (MIRA; TEIXEIRA; SÁ-  
2787 CORREIA, 2010). Altas concentrações de ácido acético e outros metabólitos tóxicos pode levar  
2788 à interrupção da fermentação ou à redução da produtividade do etanol (PALMA; GUERREIRO;  
2789 SÁ-CORREIA, 2018).

2790 Em relação à presença de ésteres, verificou-se o aumento de 36% nos teores de ésteres  
2791 com o tratamento enzimático. Alguns ésteres em concentrações muito altas podem fornecem  
2792 aromas e sabores indesejados, como por exemplo, o odor de solvente gerado pelo acetato de  
2793 etila. Além disso, a presença de diferentes ésteres pode ter um efeito sinérgico e influenciar a  
2794 percepção sensorial geral, mesmo em concentrações individuais baixas (LOVISO; LIBKIND,  
2795 2018). Segundo SAERENS et al. (2010) a síntese de éster depende de três fatores: a  
2796 concentração do componente acil-coenzima A (CoA), o etanol e a atividade das enzimas  
2797 envolvidas em sua síntese e hidrólise. Portanto, a maior concentração de etanol pode ter  
2798 influenciado a síntese de ésteres na cachaça tratada enzimaticamente.

2799 Quanto aos aldeídos verificou-se uma ligeira redução de 8,8±0,3 para 8,1±0,2 mg .100  
2800 ml de álcool anidro<sup>-1</sup>, quando comparados o controle e a cachaça tratada enzimaticamente, o  
2801 que corresponde a uma redução de 8%. Segundo XU et al. (2019) a fermentação alcoólica é um

2802 processo redox-neutro, onde a formação de etanol a partir do açúcar fermentado não pode  
2803 causar uma perturbação drástica da razão NADH/NAD<sup>+</sup>. BALASUBRAMANIAM et al. (2019)  
2804 mostraram que uma maior proporção intracelular de NADH/NAD<sup>+</sup> em *S. cerevisiae* ativou a  
2805 via de síntese do etanol, acelerando a redução do acetaldeído acumulado em etanol durante o  
2806 período de alta formação de espuma. O processo fermentativo utilizando enzimas ativas pode  
2807 ter alterado este balanço NADH/NAD<sup>+</sup> justificando não só a redução dos teores de aldeídos  
2808 como também justificando o aumento da concentração de etanol.

2809 Não foram detectados sinais correspondentes aos compostos furfural,  
2810 hidroximetilfurfural (5-HMF) e acroleína nas cachaças analisadas neste trabalho. Tal fato  
2811 sugere a produção de bebidas com maior qualidade, pois na indústria de alimentos, o teor de  
2812 furfurais e 5-HMF é considerado um indicador de qualidade, pois fornecem evidências de  
2813 superaquecimento durante o processamento ou condições inadequadas de armazenamento  
2814 (ROS-POLSKI; POPOVIĆ; KOUTCHMA, 2016). A acroleína é gerada como produto de  
2815 degradação térmica de vários precursores, como glicerol, aminoácidos, carboidratos e  
2816 triglicerídeos ou pela atividade metabólica de microrganismos (HERNANDES et al., 2020).

2817 Observou-se ainda a redução dos teores de metanol de 0,60±0,1 para 0,2±0,1 mg .100  
2818 ml de álcool anidro<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma redução de 200% quando comparados os teores  
2819 presentes na cachaça controle e na cachaça com tratamento enzimático. O metanol é um  
2820 composto tóxico produzido através da desmetoxilação da pectina durante as diferentes etapas  
2821 da produção de bebidas e está relacionado a tratamentos térmicos ou enzimáticos (HANG;  
2822 WOODAMS, 2010). CHAIYASUT et al. (2013) relataram como fatores que afetam a produção  
2823 de metanol foram o tamanho e idade da matéria-prima, temperatura de esterilização, conteúdo  
2824 de pectina e atividade de pectina metilesterase (PME). A PME tem atividade máxima em faixas  
2825 de temperatura entre 50 e 60 °C, temperatura utilizada para a o tratamento enzimático. Diversos

2826 autores demonstraram a capacidade de produção de pectinases por bactérias do gênero  
 2827 *Streptomyces*, e a ação destas poderia justificar a redução da produção de metanol na cachaça  
 2828 produzida com tratamento enzimático (AMIN; BHATTI; BILAL, 2019; RUIZ et al., 2017;  
 2829 SPASIC et al., 2018).

2830 O carbamato de etila (CE) ou uretano foi detectado em muitos produtos alimentícios  
 2831 fermentados e bebidas alcoólicas, como queijo, pão, iogurte, vinho, uísque, molho de soja etc.  
 2832 (GOWD et al., 2018; LI et al., 2017). A síntese de CE está relacionada à presença de alguns  
 2833 precursores como glicosídeos cianogênicos, ureia, arginina e citrulina e a fatores como  
 2834 temperatura, acidez e propriedades dos microrganismos utilizados na fermentação (WEBER;  
 2835 SHARYPOV, 2009; ZHAO et al., 2013). LIU et al. (2012) demonstraram que o tratamento  
 2836 enzimático com urease reduziu os níveis de ureia e consequentemente a redução nos teores de  
 2837 CE. Neste trabalho pode se verificar a redução em 15% quando comparado o controle com o  
 2838 tratamento enzimático (de  $3,8 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  para  $3,3 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ )'

2839 **Tabela 2.** Quantificação de congêneres e contaminantes nas cachaças produzidas com e sem o  
 2840 tratamento enzimático a partir do método ERETIC.

	Cachaça com tratamento enzimático	Cachaça controle	Valor máximo
<b>Acidez total</b>	70,2±0,3	134,5±0,8	150
<b>Ésteres totais</b>	9,7±0,2	6,2±0,3	200
<b>Aldeídos totais</b>	8,1±0,2	8,8±0,3	30
<b>Furfural</b>	traços (não quantificável)	traços (não	5
<b>Hidroximetilfurfural</b>		quantificável)	
<b>Metanol</b>	0,2±0,1	0,60±0,1	20
<b>Carbamato de Etila</b>	3,3±0,2	3,8±0,1	150
<b>Acroleína</b>	traços (não quantificável)	traços (não	360
		quantificável)	

2841 Acidez volátil, expressa em ácido etanóico em mg/100 ml de álcool anidro. Ésteres totais, expressos em  
 2842 acetato de etila, em mg/100 ml de álcool anidro. Aldeídos totais, em acetaldeído em mg/100 ml de álcool anidro.  
 2843 Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100 ml de álcool anidro. Álcoois superiores soma dos álcoois  
 2844 isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil -1-360- butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1-  
 2845 propanol), em mg /100 ml de álcool anidro. Álcool metílico em mg/100 ml de álcool anidro. Carbamato de etila  
 2846 em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Acroleína (2-propenal) em mg/100ml de álcool anidro. Valores máximos determinados pela  
 2847 INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005.

2848

## 2849 CONCLUSÃO

2850 Foi constatado o isolamento de uma cepa de levedura selvagem com características  
2851 morfológicas sugestivas de *Saccharomyces cerevisiae* necessitando a realização de testes  
2852 moleculares para confirmação. O tratamento enzimático da cachaça alterou o processo  
2853 fermentativo e aumentou a produtividade em relação à concentração de etanol. A sacarificação  
2854 e fermentação simultâneas promoveram ainda a melhoria nos atributos de qualidade da cachaça  
2855 através da redução da acidez, metanol e carbamato de etila e aumentou o teor de ésteres. Este  
2856 processo poderia ser ainda utilizado na produção de bioetanol combustível

## 2857 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2858 ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Laboratory analytical**  
2859 **procedure**, v.6, n.465, p.1996. 1996. Disponível em: em. doi,

2860

2861 ALONSO GONZÁLEZ, E.; TORRADO AGRASAR, A.; PASTRANA CASTRO, L. M.;  
2862 ORRIOLS FERNÁNDEZ, I.; PÉREZ GUERRA, N. Production and Characterization of  
2863 Distilled Alcoholic Beverages Obtained by Solid-State Fermentation of Black Mulberry  
2864 (*Morus nigra* L.) and Black Currant (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food**  
2865 **Chemistry**, v.58, n.4, p.2529. 2010. Disponível em:

2866 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20102198>>. Acesso em. doi: 10.1021/jf9037562

2867

2868 ALVES, T. M.; FARIAS, F. C.; ALCARDE, A. R.; OLIVEIRA FILHO, J. H. D. Influência  
2869 do tratamento térmico do caldo de cana no desenvolvimento do processo fermentativo e na  
2870 composição química da cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21. 2018.

2871 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100462&nrm=iso)

2872 [67232018000100462&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100462&nrm=iso)>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.12617>

2873

2874 AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of  
2875 microbial pectinases—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**,  
2876 v.122, p.1017. 2019. Disponível em:

2877 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018329180>>. Acesso em. doi:

2878 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>

2879

2880 AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.

2881 **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 2012.

2882 Disponível em: em. doi:

2883

2884 BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology.

2885 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.21, p.8711. 2019. Disponível em:

2886 <<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-019-10146-  
2887 0  
2888  
2889 BALASUBRAMANIAM, V. G.; AYYAPPAN, P.; SATHVIKA, S.; ANTONY, U. Effect of  
2890 enzyme pretreatment in the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols. **J**  
2891 **Food Sci Technol**, v.56, n.3, p.1583. 2019. Disponível em:  
2892 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30956339>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13197-019-  
2893 03672-2  
2894  
2895 BARBOSA, R.; PONTES, A.; SANTOS, R. O.; MONTANDON, G. G.; DE PONZZES-  
2896 GOMES, C. M.; MORAIS, P. B.; GONÇALVES, P.; ROSA, C. A.; SAMPAIO, J. P.  
2897 Multiple Rounds of Artificial Selection Promote Microbe Secondary Domestication—The  
2898 Case of Cachaça Yeasts. **Genome Biology and Evolution**, v.10, n.8, p.1939. 2018.  
2899 Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gbe/evy132>>. Acesso em: 12/30/2019. doi:  
2900 10.1093/gbe/evy132  
2901  
2902 BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good Manufacturing  
2903 Practices, Hazard Analysis and Critical Control Point plan proposal for distilleries of cachaça.  
2904 **Scientia Agricola**, v.75, p.432. 2018. Disponível em:  
2905 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-  
2906 90162018000500432&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162018000500432&nrm=iso)>. Acesso em. doi: doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0040  
2907  
2908 BRASIL. **Decreto no. 4.851**. Diário Oficial da União,  
2909 [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2003/D4851.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/D4851.htm) 2003.  
2910  
2911 \_\_\_\_\_. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005**. Aprovar o  
2912 Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente  
2913 de Cana e para Cachaça, em observância ao Anexo à presente Instrução Normativa. MAPA.  
2914 Brasília: Diário Oficial da União: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: 3 p.  
2915 2005.  
2916  
2917 \_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014**. UNIÃO, D. O. D. Brasília,  
2918 DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.  
2919  
2920 BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; DE CAMPOS, I. T. N.; DE FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M.  
2921 Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes.  
2922 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.3, p.598. 2013. Disponível em:  
2923 <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0193-3>  
2924 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12010-013-0193-3.pdf>>. Acesso em. doi:  
2925 10.1007/s12010-013-0193-3  
2926  
2927 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
2928 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
2929 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **Journal of Agriculture and**  
2930 **Environmental Sciences**, v.4, n.1, p.90. 2015. Disponível em: em. doi:  
2931 10.15640/jaes.v4n1a12  
2932  
2933 CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F.  
2934 A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA  
2935 SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about

2936 composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic  
2937 saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v.2012,  
2938 p.989572. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251086>>. Acesso  
2939 em. doi: 10.1155/2012/989572

2940

2941 CARVALHO, F. P.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F.  
2942 Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and  
2943 quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.37, n.1, p.51. 2015. Disponível  
2944 em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212015000100051&nrm=iso)  
2945 [86212015000100051&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212015000100051&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.4025/actasciagron.v37i1.18397

2946

2947 CASALONE, E.; BARBERIO, C.; CAPPELLINI, L.; POLSINELLI, M. Characterization of  
2948 *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony  
2949 morphology. **Research in Microbiology**, v.156, n.2, p.191. 2005. Disponível em:  
2950 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250804002578>>. Acesso em. doi:  
2951 <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.008>

2952

2953 CHAIYASUT, C.; JANTAVONG, S.; KRUTAMA, C.; PEERAJAN, S.; SIRILUN, S.;  
2954 SHANK, L. Factors affecting methanol content of fermented plant beverage containing  
2955 *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.27, p.4356. 2013. Disponível  
2956 em: em. doi: 10.5897/AJB10.1377

2957

2958 D'SILVA, A. F.; BADOTTI, F.; PINHEIRO, C. S. R.; GONÇALVES, C. M.; HUGHES, F.  
2959 M.; ROSA, C. A.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T. Comparative study of stability  
2960 parameters in two types of bracing systems adopted in reinforced concrete buildings/Estudo  
2961 comparativo dos parâmetros de estabilidade em dois tipos de sistemas de contraventamento  
2962 adotados em edifícios de concreto armado. **Brazilian Journal of Development**, v.5, n.11,  
2963 p.27448. 2019a. Disponível em: em. doi: 10.34117/bjdv5n11-348

2964

2965 \_\_\_\_\_. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated of the spontaneous  
2966 fermentation of cachaça from northeastern Brazil/Diversidade de linhagens de *Saccharomyces*  
2967 *cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaça do nordeste Brasileiro. **Brazilian**  
2968 **Journal of Development**, v.5, n.11, p.27448. 2019b. Disponível em: em. doi,  
2969

2970 DE QUEIROZ BRITO CUNHA, C. C.; GAMA, A. R.; CINTRA, L. C.; BATAUS, L. A. M.;  
2971 ULHOA, C. J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant  
2972 xylanase produced by *Pichia pastoris*. **PloS One**, v.13, n.2, p.e0192996. 2018. Disponível  
2973 em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29481569>  
2974 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5826528/pdf/pone.0192996.pdf>>. Acesso  
2975 em. doi: 10.1371/journal.pone.0192996

2976

2977 DE SOUZA, A. P.; VICENTE MDE, A.; KLEIN, R. C.; FIETTO, L. G.; COUTRIM, M. X.;  
2978 DE CASSIA FRANCO AFONSO, R. J.; ARAUJO, L. D.; DA SILVA, P. H.; BOUILLET, L.  
2979 E.; CASTRO, I. M.; BRANDAO, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for  
2980 production of flavor compounds in cachaca fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**,  
2981 v.101, n.2, p.379. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932076>>.  
2982 Acesso em. doi: 10.1007/s10482-011-9643-5

2983

2984 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric  
2985 Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v.28,  
2986 n.3, p.350. 1956. Disponível em: em. doi: 10.1021/ac60111a017  
2987

2988 FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J.**  
2989 **biol. Chem**, v.73, n.2, p.627. 1927. Disponível em: em. doi,  
2990

2991 GAMA, A. R.; BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; DE SOUZA, G. R. L.;  
2992 CARNEIRO, L. C.; BATAUS, L. A. M. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel  
2993 bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**,  
2994 v.n/a, n.n/a, p.e2934. 2019. Disponível em:  
2995 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
2996 10.1002/btpr.2934  
2997

2998 GOWD, V.; SU, H.; KARLOVSKY, P.; CHEN, W. Ethyl carbamate: An emerging food and  
2999 environmental toxicant. **Food Chemistry**, v.248, p.312. 2018. Disponível em:  
3000 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461732037X>>. Acesso em. doi:  
3001 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.072>  
3002

3003 HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard  
3004 cider and eau-de-vie methanol content. **Bioresource Technology**, v.101, n.4, p.1396. 2010.  
3005 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409013194>>.  
3006 Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.069>  
3007

3008 HERNANDES, K. C.; SOUZA-SILVA, É. A.; ASSUMPÇÃO, C. F.; ZINI, C. A.; WELKE,  
3009 J. E. Carbonyl compounds and furan derivatives with toxic potential evaluated in the brewing  
3010 stages of craft beer. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.37, n.1, p.61. 2020.  
3011 Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675911>>. Acesso em. doi:  
3012 10.1080/19440049.2019.1675911  
3013

3014 IBRAC. Instituto Brasileiro da Cachaça. <http://www.ibrac.net/>, 2019. Disponível em: <  
3015 <http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo> >. Acesso em:  
3016 30/12/2019.  
3017

3018 KIRTIL, E.; OZTOP, M. H. 1H Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic  
3019 Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing. **Food Engineering**  
3020 **Reviews**, v.8, n.1, p.1. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12393-015-9118-y>>.  
3021 Acesso em. doi: 10.1007/s12393-015-9118-y  
3022

3023 KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier,  
3024 2011. ISBN 0080931278.  
3025

3026 LI, G.; ZHONG, Q.; WANG, D.; GAO, H. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese  
3027 market. **Food Control**, v.79, p.254. 2017. Disponível em:  
3028 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-  
3029 85017286849&doi=10.1016%2fj.foodcont.2017.03.039&partnerID=40&md5=6b39d465a148  
3030 6ccbea5cddac4fae0a2e](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85017286849&doi=10.1016%2fj.foodcont.2017.03.039&partnerID=40&md5=6b39d465a1486ccbea5cddac4fae0a2e)>. Acesso em. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.039  
3031

3032 LIU, J.; XU, Y.; NIE, Y.; ZHAO, G.-A. Optimization production of acid urease by  
3033 *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine. **Bioprocess and**

3034 **Biosystems Engineering**, v.35, n.4, p.651. 2012. Disponível em:  
3035 <<https://doi.org/10.1007/s00449-011-0643-7>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00449-011-0643-7  
3036  
3037 LIU, Z.; INOKUMA, K.; HO, S.-H.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H.; HASUNUMA, T.;  
3038 KONDO, A. Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing  
3039 cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and**  
3040 **Bioengineering**, v.114, n.6, p.1201. 2017. Disponível em:  
3041 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.26252>>. Acesso em. doi:  
3042 10.1002/bit.26252  
3043  
3044 LORENZ, M. C.; CUTLER, N. S.; HEITMAN, J. Characterization of Alcohol-induced  
3045 Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, n.1,  
3046 p.183. 2000. Disponível em: <<https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.11.1.183>>.  
3047 Acesso em. doi: 10.1091/mbc.11.1.183  
3048  
3049 LOVISO, C. L.; LIBKIND, D. Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor  
3050 derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. **Revista Argentina de Microbiología**, v.50,  
3051 n.4, p.436. 2018. Disponível em:  
3052 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117301864>>. Acesso em. doi:  
3053 <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>  
3054  
3055 LUIZA ASTOLFI, A.; REMPEL, A.; CAVANHI, V. A. F.; ALVES, M.; DEAMICI, K. M.;  
3056 COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Simultaneous saccharification and fermentation of  
3057 *Spirulina* sp. and corn starch for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with  
3058 high antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v.301, p.122698. 2020. Disponível em:  
3059 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419319273>>. Acesso em. doi:  
3060 <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122698>  
3061  
3062 MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A.  
3063 R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and  
3064 xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic  
3065 substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops**  
3066 **and Products**, v.122, p.66. 2018. Disponível em:  
3067 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018304333>>. Acesso em. doi:  
3068 10.1016/j.indcrop.2018.05.022  
3069  
3070 MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.;  
3071 CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and  
3072 enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology**  
3073 **for Biofuels**, v.4, n.1, p.55. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-55>>.  
3074 Acesso em. doi: 10.1186/1754-6834-4-55  
3075  
3076 MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.  
3077 **Analytical chemistry**, v.31, n.3, p.426. 1959. Disponível em:  
3078 <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em. doi: 10.1021/ac60147a030  
3079  
3080 MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive response and tolerance to weak  
3081 acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. **OMICS: A Journal of Integrative**  
3082 **Biology**, v.14, n.5, p.525. 2010. Disponível em:  
3083 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955006>>. Acesso em. doi: 10.1089/omi.2010.0072

3084  
3085 NAYAK, B.; LIU, R. H.; TANG, J. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits,  
3086 vegetables, and grains—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55,  
3087 n.7, p.887. 2015. Disponível em: em. doi: 10.1080/10408398.2011.654142  
3088  
3089 NEUTZLING, D. M.; SANTOS, M. S. D.; BARCELLOS, M. D. D.; LAND, A. L. Value  
3090 Creation from Internationalization of Sugar Cane by-products: a multi-stakeholder view of  
3091 artisanal cachaça production. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, v.17, n.55, p.890.  
3092 2015. Disponível em: em. doi: 0.7819/rbgn.v17i55.2134  
3093  
3094 OBENG, E. M.; ADAM, S. N. N.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M.; MAAS, R.; JOSE,  
3095 J. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices.  
3096 **Bioresources and Bioprocessing**, v.4, n.1, p.16. 2017. Disponível em: <<Go to  
3097 ISI>://WOS:000461105300016>. Acesso em. doi: 10.1186/s40643-017-0146-8  
3098  
3099 OLIVA-NETO, P. D.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic  
3100 acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian**  
3101 **Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.10. 2001. Disponível em:  
3102 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000100003&nrm=iso)  
3103 [83822001000100003&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000100003&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/S1517-83822001000100003  
3104  
3105 OLIVEIRA, É. R.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S.; VILAS BOAS, E. V. D. B.  
3106 Bioactive composition and sensory evaluation of blended jambolan (*Syzygium cumini*) and  
3107 sugarcane alcoholic fermented beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v.122, n.4,  
3108 p.719. 2016. Disponível em: em. doi: doi.org/10.1002/jib.370  
3109  
3110 PAIVA, A. L. D.; SOUZA, R. B. D.; BARRETO, I. D. D. C.; BRITO, M. J. D. Fluxo das  
3111 Exportações Brasileiras de Cachaça: traços da influência do Estado no setor. **Revista de**  
3112 **Economia e Sociologia Rural**, v.55, p.733. 2017. Disponível em:  
3113 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso)  
3114 [20032017000400733&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400733&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/1234-56781806-94790550407  
3115  
3116 PALMA, M.; GUERREIRO, J. F.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive Response and Tolerance to  
3117 Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological  
3118 Genomics Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.274, p.274. 2018. Disponível em:  
3119 <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00274>>. Acesso em. doi:  
3120 10.3389/fmicb.2018.00274  
3121  
3122 PORTUGAL, C. B.; ALCARDE, A. R.; BORTOLETTO, A. M.; DE SILVA, A. P. The role  
3123 of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food**  
3124 **Research and Technology**, v.242, n.9, p.1587. 2016. Disponível em:  
3125 <<https://doi.org/10.1007/s00217-016-2659-3>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00217-016-2659-3  
3126  
3127 PORTUGAL, C. B.; DE SILVA, A. P.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. How  
3128 native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? **Food**  
3129 **Research International**, v.91, p.18. 2017. Disponível em:  
3130 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916305555>>. Acesso em. doi:  
3131 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.022>  
3132

3133 PRIDHAM, T.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.; HESSELTINE, C.;  
3134 BENEDICT, R. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes.  
3135 **A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes.**,  
3136 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19591101858>. 1957. Disponível em:  
3137 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19591101858>>. Acesso em. doi:  
3138

3139 RAKARIYATHAM, K.; LIU, X.; LIU, Z.; WU, S.; SHAHIDI, F.; ZHOU, D.; ZHU, B.  
3140 Improvement of Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Longan (*Dimocarpus*  
3141 *longan*) Peel Extracts by Enzymatic Treatment. **Waste and Biomass Valorization**.  
3142 10.1007/s12649-019-00723-9. 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/s12649-019-](https://doi.org/10.1007/s12649-019-00723-9)  
3143 [00723-9](https://doi.org/10.1007/s12649-019-00723-9)>. Acesso em. doi: 10.1007/s12649-019-00723-9  
3144

3145 RAMADA, M. H.; LOPES, F. A.; ULHOA, C. J.; SILVA RDO, N. Optimized microplate  
3146 beta-1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. **Journal of Microbiological**  
3147 **Methods**, v.81, n.1, p.6. 2010. Disponível em:  
3148 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096308>>. Acesso em. doi:  
3149 10.1016/j.mimet.2010.01.010  
3150

3151 REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R.  
3152 Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and  
3153 pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of**  
3154 **Microbiology**, v.44, p.1121. 2013. Disponível em:  
3155 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000400014&nrm=iso)  
3156 [83822013000400014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000400014&nrm=iso)>. Acesso em. doi: [https://doi.org/10.1590/S1517-](https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020)  
3157 [83822014005000020](https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020)  
3158

3159 RESENDE OLIVEIRA, É.; CALIARI, M.; SOARES SOARES JÚNIOR, M.; RIBEIRO  
3160 OLIVEIRA, A.; CRISTINA MARQUES DUARTE, R.; VALÉRIO DE BARROS VILAS  
3161 BOAS, E. Assessment of chemical and sensory quality of sugarcane alcoholic fermented  
3162 beverage. **Journal of food science and technology**, v.55, n.1, p.72. 2018. Disponível em:  
3163 <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2792-4>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13197-017-2792-4  
3164

3165 RIBEIRO, M. L. D.; FERREIRA, O. E.; TEIXEIRA, V.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J.  
3166 R. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência**  
3167 **Agronômica**, v.48, p.458. 2017. Disponível em:  
3168 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902017000300458&nrm=iso)  
3169 [66902017000300458&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902017000300458&nrm=iso)>. Acesso em. doi: [doi.org/10.5935/1806-6690.20170053](https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170053)  
3170

3171 ROS-POLSKI, V.; POPOVIĆ, V.; KOUTCHMA, T. Effect of ultraviolet-C light treatment on  
3172 Hydroxymethylfurfural (5-HMF) content in high fructose corn syrup (HFCS) and model  
3173 syrups. **Journal of Food Engineering**, v.179, p.78. 2016. Disponível em:  
3174 [https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84958818923&doi=10.1016%2Fj.jfoodeng.2016.01.027&partnerID=40&md5=f5f57193b8fe565ff66ec8884aa538cc)  
3175 [84958818923&doi=10.1016%2Fj.jfoodeng.2016.01.027&partnerID=40&md5=f5f57193b8fe5](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84958818923&doi=10.1016%2Fj.jfoodeng.2016.01.027&partnerID=40&md5=f5f57193b8fe565ff66ec8884aa538cc)  
3176 [65ff66ec8884aa538cc](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84958818923&doi=10.1016%2Fj.jfoodeng.2016.01.027&partnerID=40&md5=f5f57193b8fe565ff66ec8884aa538cc)>. Acesso em. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.01.027  
3177

3178 RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; HERNANDEZ-ALMANZA, A.; CONTRERAS-  
3179 ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. 3 - Pectinolytic Enzymes. In: PANDEY, A.; NEGI, S. e  
3180 SOCCOL, C. R. (Ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**:  
3181 Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00003-8>, 2017. p.47. ISBN 978-0-  
3182 444-63662-1.

3183  
3184 SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M.  
3185 Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial**  
3186 **Biotechnology**, v.3, n.2, p.165. 2010. Disponível em:  
3187 <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>>.  
3188 Acesso em. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x  
3189  
3190 SHARMA, H. P.; PATEL, H.; SUGANDHA. Enzymatic added extraction and clarification of  
3191 fruit juices—A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.6, p.1215.  
3192 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>>. Acesso em. doi:  
3193 10.1080/10408398.2014.977434  
3194  
3195 SIRIWONG, T.; LAIMEHERIWA, B.; AINI, U. N.; CAHYANTO, M. N.; REUNGSANG,  
3196 A.; SALAKKAM, A. Cold hydrolysis of cassava pulp and its use in simultaneous  
3197 saccharification and fermentation (SSF) process for ethanol fermentation. **Journal of**  
3198 **Biotechnology**, v.292, p.57. 2019. Disponível em:  
3199 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165619300070>>. Acesso em. doi:  
3200 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.003>  
3201  
3202 SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.;  
3203 ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.;  
3204 BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.  
3205 **Química Nova**, v.30, n.2, p.351. 2007. Disponível em: em. doi:  
3206 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>  
3207  
3208 SPASIC, J.; MANDIC, M.; DJOKIC, L.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. *Streptomyces* spp. in  
3209 the biocatalysis toolbox. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.8, p.3513.  
3210 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8884-x>>. Acesso em. doi:  
3211 10.1007/s00253-018-8884-x  
3212  
3213 WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review.  
3214 **Environmental Chemistry Letters**, v.7, n.3, p.233. 2009. Disponível em:  
3215 <<https://doi.org/10.1007/s10311-008-0168-8>>. Acesso em. doi: 10.1007/s10311-008-0168-8  
3216  
3217 XIAO, W.; LI, H.; XIA, W.; YANG, Y.; HU, P.; ZHOU, S.; HU, Y.; LIU, X.; DAI, Y.;  
3218 JIANG, Z. Co-expression of cellulase and xylanase genes in *Sacchromyces cerevisiae* toward  
3219 enhanced bioethanol production from corn stover. **Bioengineered**, v.10, n.1, p.513. 2019.  
3220 Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1682213>>. Acesso em. doi:  
3221 10.1080/21655979.2019.1682213  
3222  
3223 XU, X.; WANG, J.; BAO, M.; NIU, C.; LIU, C.; ZHENG, F.; LI, Y.; LI, Q. Reverse  
3224 metabolic engineering in lager yeast: impact of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio on acetaldehyde  
3225 production during the brewing process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103,  
3226 n.2, p.869. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9517-0>>. Acesso em.  
3227 doi: 10.1007/s00253-018-9517-0  
3228  
3229 ZHAO, X.; DU, G.; ZOU, H.; FU, J.; ZHOU, J.; CHEN, J. Progress in preventing the  
3230 accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Trends in Food Science and**  
3231 **Technology**, v.32, n.2, p.97. 2013. Disponível em:  
3232 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

3233 [84881556529&doi=10.1016%2fj.tifs.2013.05.009&partnerID=40&md5=e74660ca91866db06](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.009&partnerID=40&md5=e74660ca91866db069fde5531eaf9a86)  
3234 [9fde5531eaf9a86](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.009)>. Acesso em. doi: 10.1016/j.tifs.2013.05.009  
3235  
  
3236

3237

## CAPÍTULO 6

3238

3239 **APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO DO *STREPTOMYCES SP I7 E***  
3240 **ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *ZENGIBER***  
3241 ***OFFICINALE ROSCOE***

3242 Menandes Alves de Souza Neto <sup>1\*</sup>, Juliana Aparecida Correia Bento <sup>1</sup>, Ana Lázara Mattos de  
3243 Oliveira <sup>3</sup>, Eduardo Valério de Barros Villas Boas<sup>3</sup>, Márcio Caliari<sup>1</sup>, e Luiz Artur Mendes  
3244 Bataus<sup>2</sup>

3245 <sup>1</sup>Food Engineering Department, Federal University of Goiás – UFG, CEP 74690-900, Goiânia,  
3246 Goiás, Brazil.

3247 <sup>2</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás – UFG, CEP 74690-900, Goiânia,  
3248 Goiás, Brazil.

3249 <sup>3</sup> Food Science Department; Federal University of Lavras, CEP 37200900, Lavras, Minas  
3250 Gerais, Brazil.

3251 \*Corresponding author: Phone: +55 (62) +556235211493; E-mail: [menandesneto@gmail.com](mailto:menandesneto@gmail.com)

3252

3253 **Resumo:** O gengibre é uma especiaria muito utilizada na medicina popular devido ao seu alto  
3254 teor de compostos fenólicos e conseqüentemente atividade antioxidante. Este trabalho teve por  
3255 objetivo avaliar o uso de extrato enzimático bruto obtido de *Streptomyces sp. I7* em associação  
3256 ao ultrassom na promoção de incorporação de compostos fenólicos em cachaças. Todos os  
3257 modelos de regressão múltipla ajustados para pH, luminosidade, açúcares redutores, fenólicos  
3258 totais, ácido gálico e vanilina foram significativos ( $p < 0,05$ ), explicando de 75 a 96% das  
3259 respostas. Verificou-se através das análises de superfície de resposta que o pH, compostos  
3260 fenólicos totais, ácido gálico e vanilina foram influenciadas pelo número de unidades

3261 enzimáticas utilizadas do extrato e pela concentração de gengibre. Além disso, a Luminosidade  
3262 e a vanilina foram influenciados pelas variáveis número de unidades enzimáticas e intensidade  
3263 do ultrassom. No mais os modelos ajustados foram preditivos para: pH; açúcares redutores;  
3264 fenólicos totais e vanilina e apresentaram 99,67%, 96,55%, 98,85% e 96,67% de  
3265 compatibilidade, respectivamente. Ao utilizar como parâmetros a concentração de gengibre  
3266 maior que  $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , número de unidades enzimáticas entre 10 e  $13 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$  e intensidade do  
3267 ultrassom entre 50 e 70% foi produzida uma cachaça com cor mais amarelada, com açúcares  
3268 redutores próximo a  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , concentração de fenólicos totais aproximada de  $28 \text{ mgEq} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  
3269 ácido gálico próximo a  $0,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , ácido caféico próximo a  $0,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  e vanilina próxima a  
3270  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . A incorporação de compostos fenólicos em cachaças através do método de extração  
3271 proposto foi capaz de gerar cachaças com alto teor de compostos fenólicos e possivelmente  
3272 características sensoriais distintas.

3273 **Palavras chave:** Ácido gálico, vanilina, ácido caféico, açúcares redutores e cachaça

## 3274 **Introdução**

3275  
3276 O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), uma planta medicinal perene, nativa da região  
3277 da floresta tropical da família *Zingiberaceae* (OYEDOH; EKHORUGUE; AYODELE, 2020).  
3278 Seu cultivo e amplamente utilizado há mais de 2000 anos na China como tempero e como  
3279 substância importante na medicina tradicional chinesa. Muitos estudos relatam efeitos  
3280 terapêuticos do gengibre e seu extrato, como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anti-  
3281 inflamatório, neuro protetor, antiemético e demonstrou efeitos benéficos na síndrome  
3282 metabólica (OSAE et al., 2019; SEMWAL et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

3283 Esses efeitos terapêuticos são associados a abundância de compostos bioativos no  
3284 gengibre, como compostos fenólicos e terpenos. Os principais compostos fenólicos no gengibre  
3285 são gingeróis, shogaols e paradóis. No gengibre fresco, os gingerol são os principais polifenóis,

3286 como 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol. Existem também muitos outros compostos fenólicos  
3287 no gengibre, como quercetina, zingerona, vanilina, gengenona-A, 6-desidrogingerdiona, ácido  
3288 gálico e ácido caféico. Outros compostos bioquímicos como polissacarídeos, lipídios, ácidos  
3289 orgânicos e fibras brutas também estão presentes no gengibre (GHAFOOR et al., 2020; MAO  
3290 et al., 2019).

3291 Os métodos convencionais de extração, como a destilação a vapor ou a extração com  
3292 solvente orgânico, apresentam algumas desvantagens, como o uso de condições de alta  
3293 temperatura que podem levar à degradação de compostos termolábeis, produção de resíduos  
3294 tóxicos e baixa seletividade do processo de extração de compostos fenólicos (SALEA;  
3295 VERIANSYAH; TJANDRAWINATA, 2017). Para contornar esses problemas métodos de  
3296 extração físicos e químico/enzimáticos têm sido utilizados. Uma vez que promovem o aumento  
3297 do rompimento da parede celular, permitindo a liberação de compostos bioativos. Dentre os  
3298 métodos físicos destacam-se: a sonicação, maceração, congelamento e descongelamento.  
3299 Métodos físicos e enzimáticos, como utilização de ultrassom e enzimas tem sido bastante  
3300 empregados por aumentar o rendimento da extração e evitar a degradação de produtos  
3301 termolábeis (TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2020; ZHOU et al., 2019).

3302 A parede celular vegetal é composta por um rígido complexo de carboidratos (celulose,  
3303 hemicelulose, xilana, pectina e lignina). A degradação da parede celular requer a ação conjunta  
3304 de diferentes enzimas. Muitos autores utilizam para a extração de compostos bioativos enzimas  
3305 isoladas e purificadas porém a utilização de extratos brutos contendo um conjunto de enzimas  
3306 pode ser mais eficaz em degradar a parede celular (BROXTERMAN; SCHOLS, 2018; REIS et  
3307 al., 2018).

3308 O extrato bruto de *Streptomyces* sp. isolados do solo do Cerrado e por este motivo,  
3309 sujeito a altas temperaturas é capaz de produzir extratos enzimáticos com atividades de  
3310 celulases, xilanases, avicelase e FPase com alta produtividade, termo estabilidade e capacidade

3311 de atuar em ampla faixa de pH (BRITO-CUNHA et al., 2013; BRITO-CUNHA et al., 2015;  
3312 GAMA et al., 2019).

3313 As celulasas promovem a hidrólise da celulose para gerar monômeros de glicose  
3314 (MARQUES et al., 2017). As endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EG) clivam as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas  
3315 intramoleculares nas regiões amorfas da fibra de celulose, provocam rupturas na estrutura da  
3316 celulose. As xilanases despolimerizam a xilana presente na fração de hemicelulose da parede  
3317 celular da planta (MAULANA HIDAYATULLAH et al., 2020). A ação xilanolítica consiste  
3318 na sinergia entre as endoxilanases (1,4- $\beta$ -d-xilano xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) e as  $\beta$ -  
3319 xilosidases ( $\beta$ -d-xilosídeo xilo-hidrolase, EC 3.2.1.37) (DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ  
3320 et al., 2018).

3321 O tratamento com ultrassom de baixa frequência tem sido utilizado para melhorar os  
3322 processos biotecnológicos através dos efeitos da cavitação acústica na estrutura da enzima e a  
3323 transferência de massa devido à turbulência local. As enzimas proteolíticas, como a pepsina,  
3324 tiveram a atividade catalítica melhorada após a exposição ao ultrassom promovida por  
3325 alterações conformacionais no dobramento, na ligação e na estrutura, com efeito mais  
3326 pronunciado em estruturas secundárias e terciárias (COSTA-JUNIOR et al., 2020).

3327 O processo de maceração de frutas é em soluções hidroalcolólicas compreende uma das  
3328 etapas de produção de licores. No Brasil, esta prática utiliza raízes, flores, frutos e madeiras  
3329 com o intuito não somente de a agregação de aromas e sabores melhorando a palatabilidade de  
3330 bebidas mas também para a extração de compostos bioativos na medicina popular (DA SILVA  
3331 MIGUÉIS et al., 2018; QIAN; HUGHES; CADWALLADER, 2019).

3332 Este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da extração assistida por método  
3333 combinado utilizando de ultrassom de baixa frequência e extrato enzimático obtido pelo  
3334 *Streptomyces* sp. I7 na extração e incorporação de compostos fenólicos de gengibre em cachaça  
3335 comercial não envelhecida.

3336 **Material e Métodos**

3337

3338 **Material**

3339 As raízes de *Zengiber officinale* foram adquiridas no comércio local em Goiânia-GO.

3340 Foram armazenadas em sacos plásticos, mantidas em temperatura ambiente e transportadas até

3341 o Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás. As

3342 cachaças comerciais 51 (Pirassununga, SP-Brasil) foram adquiridas no comércio local. Foram

3343 utilizados os reagentes: ácido acético, ácido 3,5 dinitrosalicílico, metanol e Tween 80 Sigma

3344 Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os padrões xilana bechoowd (Sigma®),

3345 carboximetilcelulose, ácido gálico, ácido caféico e vanilina da Merck (Darmstadt-Germany).

3346 Processamento das raízes

3347 As raízes foram lavadas e sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm

3348 por 15 min, descascadas e cortadas manualmente em pedaços menores e por fim trituradas em

3349 liquidificador. O material processado foi então colocado em potes de plástico, e adicionado do

3350 extrato enzimático conforme o delineamento experimental, em seguida, as soluções foram

3351 incubadas em shaker 80 rpm, 30 °C por 2 horas. Por fim, adicionou-se 150 ml de cachaça em

3352 todas as amostras, e estas foram sonicadas conforme o delineamento.

3353 **Microrganismos, Fermentação Semi-Sólida e obtenção de extrato enzimático**

3354 O *Streptomyces* sp. foi isolado conforme BRITO-CUNHA et al. (2013). Uma cepa de

3355 *Streptomyces* sp. denominada cepa isolada número sete (I7) foi usada para produzir os extratos

3356 enzimáticos. Os esporos de *Streptomyces* sp. I7 foram cultivados na placa de cultura bacteriana

3357 e distribuídos em cinco colônias em meio Pridham (PRIDHAM et al., 1957) (4 gL<sup>-1</sup>; extrato

3358 de malte 10 gL<sup>-1</sup>; sacarose 4gL<sup>-1</sup> e ágar 20 gL<sup>-1</sup>), durante 3 dias em estufa a 37 ± 1 °C. Uma

3359 placa foi removida e foram adicionados 10 ml de água em autoclave e os esporos foram obtidos

3360 utilizando uma alça de vidro. Esporos de *Streptomyces* sp. I7 foram inoculados em Erlenmeyer

3361 contendo 15 ml de meio mínimo ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  -  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  
3362  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) previamente autoclavado e 5 g de substrato de farelo de trigo. No final do  
3363 período de incubação de 5 dias a  $37^\circ\text{C}$ , foram adicionados 50 ml de água e 50 ml de Tween-  
3364 80 ( $0,1 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), centrifugados a  $7500 \text{ g}$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$  e em seguida, o sobrenadante  
3365 (extrato enzimático) foi armazenado sob congelamento ( $-20^\circ\text{C} \pm 1$ ) até que os ensaios fossem  
3366 realizados. A atividade da carboximetilcelulase (CMCase-endoglucanase) foi avaliada através  
3367 da incubação de  $50 \mu\text{l}$  do extrato bruto com  $50 \mu\text{l}$  de carboximetilcelulose (CMC) diluída em  
3368 tampão de citrato de sódio a 1% (pH 4,8) por 60 minutos a  $50^\circ\text{C}$  em um termociclador (Bio -  
3369 Rad, Berkeley, Califórnia, EUA, termociclador T100) (Hansen et al., 2015). A atividade da  
3370 xilanase foi avaliada incubando  $10 \mu\text{l}$  do extrato bruto com  $90 \mu\text{l}$  de xilano de madeira de faia  
3371 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluído em tampão de citrato de sódio a 1% (pH 4,8) a  
3372  $50^\circ\text{C}$  por um período de 5 min. As amostras foram incubadas a  $100^\circ\text{C}$ , com  $100 \mu\text{l}$  de ácido  
3373 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para medir a quantidade de açúcares redutores liberados  
3374 (RAMADA., 2010). Uma curva padrão para xilose foi preparada em concentrações de 0,3 a 4,2  
3375  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade (UI) correspondia a  $1 \mu\text{M}$  de glicose (CMCase) ou xilana  
3376 (xilanase) liberada por minuto.

### 3377 **Delineamento rotacional central composto para modificação física**

3378 Delineamento rotacional central composto foi utilizado, com três variáveis ( $X_1$ =  
3379 intensidade do ultrassom, que variou de 25 a 99% onde % é referente a variação de potência  
3380 total do equipamento em  $\text{w}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $X_2$ = UI/mL, unidades enzimáticas de CMCase por mL do  
3381 extrato enzimático bruto; e  $X_3$ = percentual de massa utilizado da raiz) (Tabela 1). Foi utilizado  
3382 um ultrassom de baixa frequência (Eco-sonics, QR500, Indaiatuba, Brasil), com 20 KHz, 500W  
3383 de potência, ponteira de titânio macro (13 mm de diâmetro). Assim, 150 mL das soluções de  
3384 cachaça (hidro alcoólicas) contendo os extratos enzimáticos e as raízes maceradas a  $25^\circ\text{C}$  foram

3385 submetidas a sonicação por 5 minutos conforme o delineamento, aferindo-se a temperatura ao  
 3386 final do tratamento.

3387 **Tabela 1.** Delineamento rotacional central composto utilizado:  $X_1$  = intensidade do ultrassom,  
 3388 que variou de 25 a 99%;  $X_2$  = UI/mL, unidades enzimáticas de CMCase e xilanase; e  $X_3$  =  
 3389 percentual de massa de gengibre.

Tratamento	Variáveis codificadas			Variável real		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	-1	40	7,028	0,82
2	1	-1	-1	84	7,028	0,82
3	-1	1	-1	40	12,97	0,82
4	1	1	-1	84	12,97	0,82
5	-1	-1	1	40	7,028	3,18
6	1	-1	1	84	7,028	3,18
7	-1	1	1	40	12,97	3,18
8	1	1	1	84	12,97	3,18
9	-1,682	0	0	25	10	2
10	1,682	0	0	99	10	2
11	0	-1,682	0	62	5	2
12	0	1,682	0	62	15	2
13	0	0	-1,682	62	10	0,25
14	0	0	1,682	62	10	4,25
15	0	0	0	62	10	2
16	0	0	0	62	10	2
17	0	0	0	62	10	2
18	0	0	0	62	10	2
19	0	0	0	62	10	2

3390

3391 **Atividade enzimática em cachaça**

3392 A avaliação de possível alteração nas atividades enzimáticas em presença de cachaça  
 3393 comercial 51 (Pirassununga, SP-Brasil) foi realizada conforme descrito no item acima com a  
 3394 adição de 100  $\mu$ L de cachaça. No controle foram adicionados 100  $\mu$ L de água. Posteriormente  
 3395 as atividades de celulasas e xilanasas foram realizadas conforme (controle). Posteriormente as  
 3396 atividades de celulasas e xilanasas foram realizadas conforme GHOSE (1987); RAMADA et  
 3397 al. (2010) e ADNEY , BAKER (1996), posteriormente o valor da atividade detectada foi  
 3398 multiplicado pelo fator de diluição promovido ao acrescentar o volume de cachaça e água.

3399

## 3400 **Análise do pH**

3401 O pH foi mensurado utilizando um potenciômetro (Tecnal, TEC-51, Piracicaba, Brasil)  
3402 com inserção direta do eletrodo na solução conforme descrito por AOAC (2012).

## 3403 **Cor instrumental**

3404 Os parâmetros instrumentais de cor foram analisados através de colorímetro (Bankinh  
3405 Meter Minolta, BC-10, Ramsey, USA). O aparelho foi ajustado em refletância, com especular  
3406 incluída, utilizando-se padrão branco nº C6299 de 03/96 e amostra em cubeta de vidro limpo  
3407 de 10 mm de caminho ótico, com campo de análise de 1 polegada. Também foram calculados  
3408 a croma (saturação da cor) e o ângulo Hue (tonalidade ou matriz) (Equações 1 e 2,  
3409 respectivamente).

$$3410 \quad C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$3411 \quad H^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

## 3412 **Açúcares redutores**

3413 Os teores de açúcares totais redutores foram determinados segundo metodologia de  
3414 (MILLER, 1959), que se baseia na redução do ácido 3,5 – di-nitro salicílico a ácido 3-amino–  
3415 5–nitro salicílico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Ultrospec, 2.000 UV/Visível,  
3416 Cambridge, Inglaterra), usando solução de glicose como padrão.

## 3417 **Compostos fenólicos totais**

3418 O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o reagente Folin-  
3419 Ciocalteau. Este é uma solução de íons poliméricos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico  
3420 e fosfotungstico, que oxidam os fenolatos, reduzindo-os a ácidos, formando um complexo de  
3421 cor azul (Mo-W), que pode ser lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 740  
3422 nm em espectrofotômetro (Ultrospec, 2.000 UV/Visível, Cambridge, Inglaterra). Os dados  
3423 foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico.mL<sup>-1</sup> (SINGLETON; ORTHOFER;  
3424 LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

## 3425 **Perfil de compostos fenólicos por HPLC**

3426 A quantificação e identificação dos compostos fenólicos foi realizada em cromatógrafo  
3427 líquido de alta eficiência (HPLC-DAD/UV-Vis) modelo Shimadzu (Shimadzu Corporation,  
3428 Kyoto, Japão) equipado com quatro bombas de alta pressão (modelo LC-20AT), com um  
3429 detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), degaseificador (modelo DGU20A5),  
3430 interface de CBM-20A, forno CTO-20AC e amostrador automático (modelo SIL20A). As  
3431 separações foram realizadas usando uma coluna Shimadzu Shim-pack ODS GVPC18 (4,6 x  
3432 250 mm, 5 mm) ligada a uma pré-coluna (Shimadzu-pack ODS GVP-C18, 4,6 x 10 mm, 5 $\mu$ m).  
3433 A fase móvel constituiu-se de 2% (v/v) de ácido acético em água deionizada (Fase móvel A) e  
3434 70:28:2 (v/v) de metanol/água/ácido acético (Fase móvel B), a uma taxa de fluxo de 1,0  
3435 mL.min<sup>-1</sup> com um programa de eluição de gradiente e tempo de execução de 65 minutos. O  
3436 volume de injeção foi de 20  $\mu$ L. Os compostos fenólicos foram detectados a 280 nm. As  
3437 soluções padrão foram diluídas em metanol e as curvas de calibração obtidas a partir de injeções  
3438 de dez concentrações diferentes, em duplicata. Os compostos fenólicos foram identificados por  
3439 comparação dos tempos de retenção dos picos amostrais com os de padrões disponíveis. Os  
3440 resultados foram expressos em mg do composto fenólico.L<sup>-1</sup> da amostra.

## 3441 **Análises estatísticas**

3442 Os dados foram avaliados por análise de variância múltipla, e os modelos ajustados e  
3443 visualizados por meio de gráficos de superfície de resposta através do software Statistic 10®.  
3444 Os modelos foram validados em ensaio com três repetições, usando os pontos centrais.

## 3445 **Resultados e Discussão**

3446 Todos os modelos de regressão múltipla ajustados para pH, luminosidade, açúcares  
3447 redutores, fenólicos totais, ácido gálico e vanilina foram significativos (p<0,05), explicando de  
3448 75 a 96% das respostas, e com falta de ajuste significativa, exceto para o pH (Tabela 2).

3449 Entretanto, quando o quadrado médio do erro experimental é muito maior que o quadrado  
 3450 médio do resíduo (<5%), a falta de ajuste pode ser considerada irrelevante (TASSI et al., 2019),  
 3451 e a princípio os modelos considerados preditivos.

3452 Para as variáveis de cor instrumental cromaticidade a e ângulo hue não foi possível  
 3453 ajustar os modelos ( $p > 0,05$  para todos os componentes). Em relação a cromaticidade b, C e  
 3454 ácido caféico foi possível ajustar os modelos no entanto apresentaram valores de  $R^2$  de 0,597,  
 3455 0,60 e 0,58 respectivamente. Portanto, considerados não significativos.

3456 **Tabela 2.** Modelos significativos ajustados ( $p < 0,05$ ) validação dos modelos para as variáveis  
 3457 pH, luminosidade (L), açúcares redutores, Fenólicos Totais, Ácido Gálico e Vanilina para  
 3458 avaliação dos impactos da utilização do extrato enzimático bruto obtido a partir do  
 3459 *Streptomyces* sp. I7 e ultrassom por 5 minutos em solução hidroalcoólica (40%) de gengibre,  
 3460 onde  $X_1$ = intensidade do ultrassom (%);  $X_2$ = unidade enzimática UI/mL;  $X_3$ = concentração  
 3461 de gengibre ( $g \cdot 100g^{-1}$ )

Característica	Modelo	$R^2$	p	Lack of fit	Valor mensurado	Valor predito	% de erro
<b>pH</b>	$Y = 5,99 + 0,05X_2 + 0,20X_3 - 0,08X_3^2$	0,94	0,005	0,000 <sup>ns</sup>	5,99	6,010	0,33%
<b>L*</b>	$Y = 93,41 - 0,96X_1^2 - 1,39X_2 - 1,0X_2^2 - 0,68X_3^* + 1,22X_1X_3 + 1,01 X_2X_3^*$	0,75	0,05	0,000 <sup>s</sup>	7,703	6,59	14,44%
<b>Açúcares redutores (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	$Y = 1,07 - 0,072X_1^* + 0,079X_1^{2*} + 0,66X_3$	0,96	0,05	0,000 <sup>s</sup>	1,129	1,09	3,45%
<b>Fenólicos totais (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	$Y = 31,78 - 0,99X_1^2 + 1,37X_2 - 0,99X_2^2 + 3,94X_3 - 4,61X_3^2$	0,95	0,02	0,009 <sup>s</sup>	32,152	31,78	1,15%
<b>Ácido gálico (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	$Y = 0,44 - 0,07X_2^2 + 0,15X_3 - 0,06X_1X_3$	0,78	0,005	0,000 <sup>s</sup>	0,475	0,44	7,36%
<b>Vanilina (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	$Y = 0,29 + 0,10X_3 + 0,03X_3^2 + 0,03X_1X_2^*$	0,79	0,05	0,000 <sup>s</sup>	0,300	0,29	3,33%

3462 \*  $p < 0,10$ , mantidos na equação ajustada por melhorar o valor de  $r^2$ .  
 3463 Validação de modelos

3464 No ensaio de validação dos modelos, verificou-se que aqueles para pH, açúcares  
 3465 redutores, Fenólicos totais, e vanilina apresentaram 99,67%, 96,55%, 98,85% e 96,67% de  
 3466 compatibilidade, respectivamente (Tabela 2). Portanto, com excessão aos modelos para

3467 luminosidade ( $L^*$ ) e ácido gálico, os modelos foram considerados preditivos, pois apresentaram  
3468 erro menor que 5%.

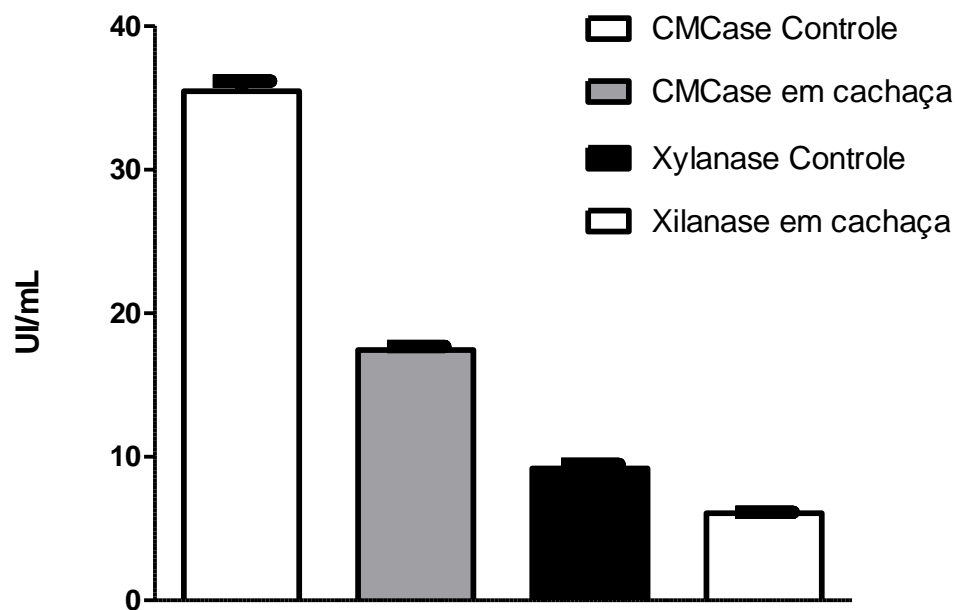
#### 3469 *Atividade enzimática em cachaça*

3470 Inibidores enzimáticos são substâncias capazes de interferir, de maneira específica, na  
3471 taxa de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica  
3472 da reação (MARQUES; YAMANAKA, 2008). Em relação a atividade enzimática em cachaça  
3473 pode ser observada a redução de 50% na atividade da celulase em cachaça ( $35,47 \pm 1,22$  para  
3474  $17,44 \pm 0,40$ ) enquanto para a xilanase a redução foi em torno de 33% ( $9,18 \pm 0,28$  para  $6,06 \pm$   
3475  $0,13$ ) conforme figura 1.

3476 Celulases e xilanases têm sido amplamente utilizadas no tratamento enzimático de  
3477 material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração. Apesar disto a  
3478 degradação deste material pode liberar compostos que irão inibir a atividade desta enzima ou  
3479 ainda a fermentação (BAJAJ; MAHAJAN, 2019).

3480 JING; ZHANG , BAO (2009) relataram que a inibição da atividade enzimática por  
3481 etanol é um problema comum na utilização de processos que envolvam a sacarificação e  
3482 fermentação simultâneas (SSF). Altas concentrações de etanol foram sugeridas por MARIÑO;  
3483 FREITAS , MIRANDA (2015) e COSTA; FARINAS , MIRANDA (2018) como estratégia  
3484 para recuperação de xilanases pois em altas concentrações a estrutura enzimática sofreria  
3485 modificações devido as interações com o etanol, induzindo a redução da atividade e sua  
3486 precipitação.

3487



3488  
3489  
3490  
3491

**Figura 1** Atividades enzimáticas para celulases e xilanases obtidas através da fermentação de farelo de trigo por *Streptomyces* sp. 17 a 37 °C por 5 dias (controle) e atividades enzimáticas do estrato bruto em cachaça.

3492

3493

3494

3495

3496

3497

3498

3499

3500

3501

3502

O trabalho de TAKAGI (1984) apresentou o butanol, etanol e a glicose como fortes inibidores de celulases em fermentação com *Trichoderma reesei* QM9414. Já GHOSH; PAMMENT, MARTIN (1982) relataram que não houve efeito inibitório na celulase de *T. reesei* QM9414 quando a concentração de etanol estava abaixo de 7,5 g.L<sup>-1</sup>, valores próximos ao encontrado em caldo de cana fermentando. Considerando o teor alcoólico da cachaça (38 a 48%) bem maior do que no fermentado do caldo de cana (7,5 a 10%) pode se inferir que durante a sacarificação e fermentação simultânea a redução da atividade enzimática foi menor. No entanto, o trabalho de (QI et al., 2014) relatou o aumento da atividade da celulase e a inalteração da atividade de FPase e Xilanase. Essas discrepâncias se devem a diferentes condições experimentais, enzimas obtidas de microrganismos diferentes e diferentes concentrações de etanol utilizadas.

3503

pH

3504

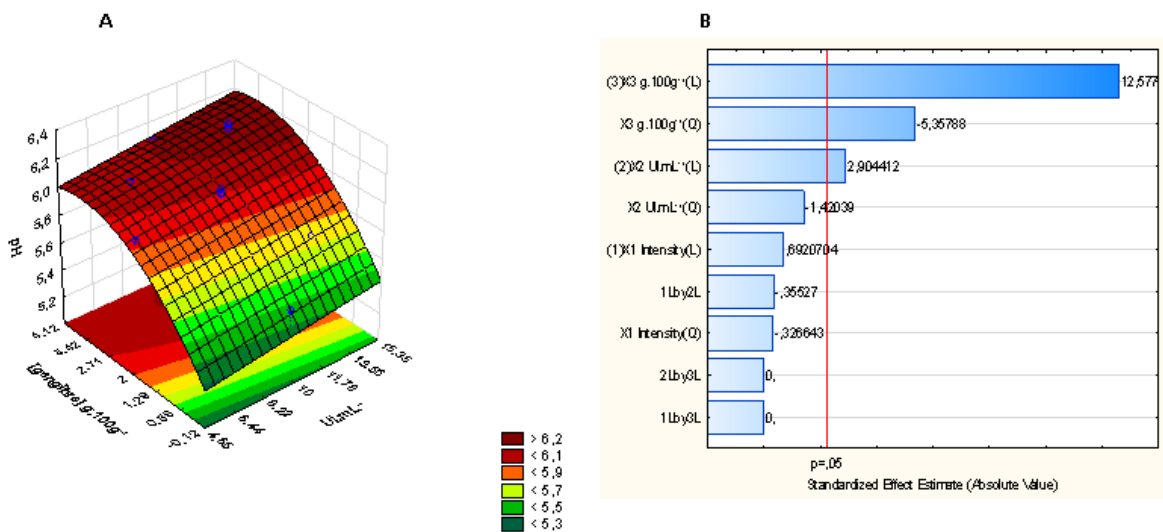
3505

Verificou-se que a atividade enzimática e a concentração de gengibre, contribuíram conjuntamente para mudança do pH da mistura (Figura 2A, Tabela 2). Verificou-se também o

3506 aumento do pH em todos os experimentos promovidos. Houve variação de 0,57 unidades de  
 3507 pH da mistura (5,62- 6,19). A figura sugere ainda que incrementos nessas variáveis resultariam  
 3508 em maior variação do pH. O acréscimo de gengibre resultou no aumento do valor do pH  
 3509 aproximando-se do valor do pH do rizoma de gengibre fresco (6,0). Maiores percentuais de  
 3510 bebida de gengibre também levaram ao aumento do pH em néctar misto de gengibre e uva  
 3511 (SANTOS et al., 2017; THOMPSON; WOLF; ALLEN, 1973).

3512

vari



3513  
 3514  
 3515  
 3516  
 3517

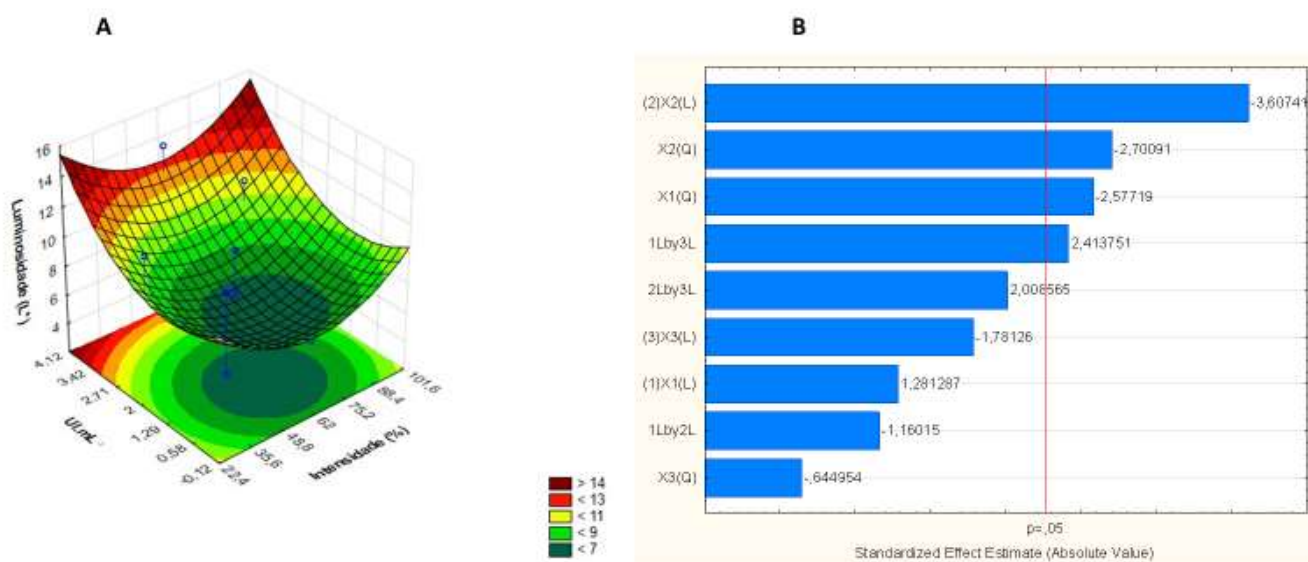
**Figura 2.** (A)Superfície de resposta do pH em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 (ULmL<sup>-1</sup>) e concentração de gengibre (g 100 g<sup>-1</sup>). (B) Diagrama de Pareto apresentando os fatores não ajustados e seu nível de significância (p<0,05).

3518 De acordo com a figura 2B observa-se que somente as variáveis concentração de gengibre e  
 3519 numero de unidades enzimáticas

3520 Cor instrumental

3521 A cor é um dos parâmetros utilizados como indicador da qualidade de bebidas. Em  
 3522 cachaças não envelhecidas é incolor, mas em cachaças flavorizadas ou envelhecidas tendem a  
 3523 cores com tons amarelados (BOLINI-CARDELLO; FARIA, 1999). Em relação à análise  
 3524 instrumental de cor observou-se que somente a luminosidade apresentou modelo ajustado com  
 3525 R<sup>2</sup> significativo (> 0,70). Pode se verificar que todas as variáveis observadas no modelo  
 3526 contribuíram para a redução do valor de luminosidade (L\*) (Tabela 2; Figura 3A). Ou seja, o

3527 aumento da intensidade do ultrassom, da quantidade de unidades enzimáticas utilizadas e da  
 3528 concentração de gengibre aumentaram a quantidade de pigmentos liberados na cachaça,  
 3529 deixando-a menos translúcida. Em relação à cromaticidade  $b^*$  e  $C^*$  pode-se observar que o  
 3530 aumento tanto do número de unidades enzimáticas quanto da concentração de gengibre  
 3531 contribuiu para o aumento da saturação da cor e o aumento da tonalidade amarela  
 3532 respectivamente. Dentre os diversos componentes presentes nos rizomas do gengibre, a  
 3533 Curcumina, desmetoxicurcumina e 6-desidrogingerdiona foram identificados como os  
 3534 principais compostos comuns que contribuem para a cor amarela e são sintetizados durante a  
 3535 maturação do rizoma (APENDICE B) (IIJIMA; JOH, 2014)



3537 **Figura 3.** (A) Superfície de resposta da luminosidade em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase  
 3538 em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 ( $UI \cdot mL^{-1}$ ) e a intensidade do ultrassom por 5  
 3539 minutos. (B) Diagrama de Pareto apresentando os fatores não ajustados e seus níveis de significância ( $p < 0,05$ ).

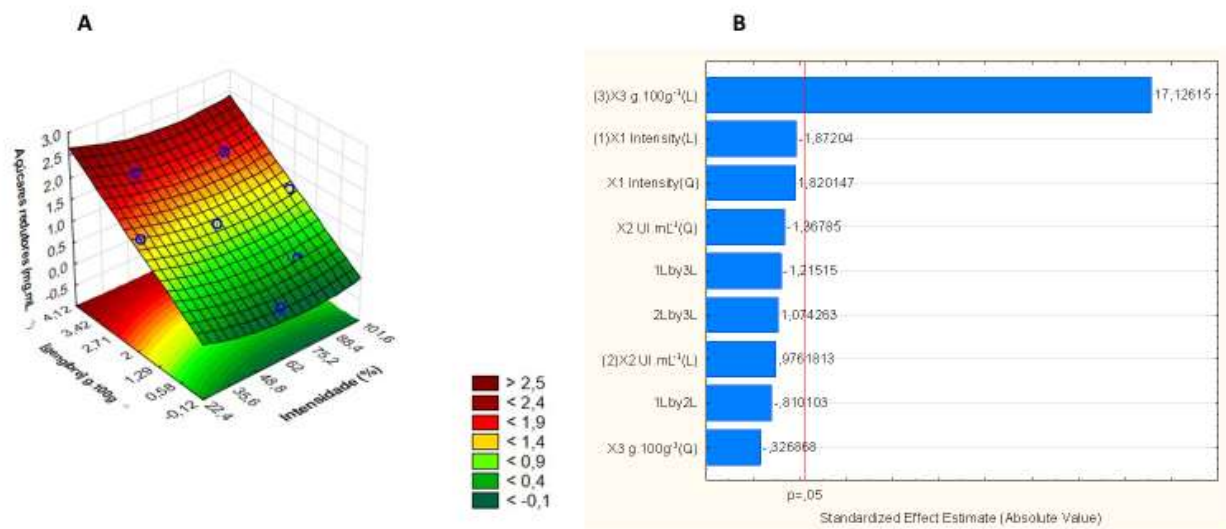
3540

3541 Açúcares redutores

3542

3543 O modelo ajustado para açúcares redutores demonstrou que a intensidade do ultrassom  
 3544 afetou (efeito quadrático) a concentração de açúcares, de tal forma que as maiores  
 3545 concentrações foram observadas nos pontos mínimos e máximos do delineamento. Por outro

3546 lado, a concentração de gengibre foi diretamente proporcional a concentração de açúcares  
3547 redutores, sendo que o aumento desta variável aumentou a concentração de açúcares na bebida  
3548 final. Os valores variaram de 0,161 a 2,176 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 4). A parede celular é composta  
3549 pelos polissacarídeos: celulose (9 a 25%); hemicelulose (25 a 50%) e pectina (10 a 35%)  
3550 (SCHWEIGGERT et al., 2008). O ultrassom através da cavitação, ondas de choque e  
3551 fenômenos de mistura induzem a fragmentação de partículas biológicas e danos à estrutura  
3552 celular levando à quebra das ligações glicosídicas e o aumento de açúcares redutores (WANG  
3553 et al., 2019). O aumento de açúcares redutores com a utilização combinada de enzima  
3554 lignolíticas e ultrassom foi verificado por PATIL; JOSHI , GOGATE (2019) e DE  
3555 CARVALHO SILVELLO; MARTÍNEZ , GOLDBECK (2019) ao avaliar serragem e bagaço  
3556 de cana, respectivamente. Outro possível fator que pode ter contribuído é o possível sinergismo  
3557 entre a combinação de métodos não térmicos de extração como ultrassom e enzimas. O  
3558 ultrassom e a cavitação aumentam o número de colisões no processo enzimático através de  
3559 convecção intensa no meio gerado pela cavitação transitória e aumentam a eficiência da  
3560 degradação aumentando a interação entre a enzima e as moléculas orgânicas (CHAKMA et al.,  
3561 2020). Além disso, o rizoma de gengibre contém aproximadamente 11,4% de amido, o que  
3562 certamente contribuiu para o aumento dos açúcares (OLIVEIRA et al., 2019).



3564

3565 **Figura 4.** (A) Superfície de resposta de açúcares redutores em relação a concentração de gengibre e a intensidade  
 3566 aplicada do ultrassom por 5 minutos. (B) Diagrama de Pareto apresentando os fatores não ajustados e seus níveis  
 3567 de significância ( $p < 0,05$ ).

3568

3569

3570

Fenólicos totais

3571

3572

O modelo para o conteúdo de fenólicos no produto tratado foi influenciado

3573

significativamente por todos os parâmetros avaliados: efeito quadrático negativo para a

3574

intensidade de aplicação do ultrassom, ou seja maiores valores nas extremidades do

3575

delineamento; efeito lineares positivos para a concentração de gengibre e de enzimas

3576

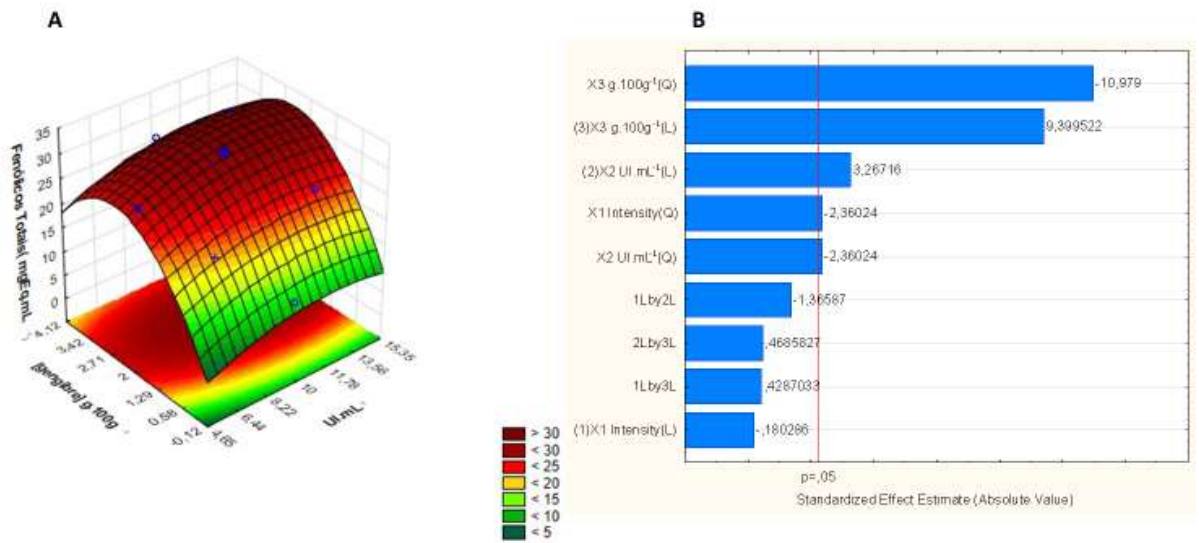
adicionados, refletindo um aumento no conteúdo de fenólicos com o aumento destes; efeitos

3577

quadráticos negativos e para a concentração de gengibre e de enzimas adicionados, resultando

3578

em uma região ótima, para maior extração (Tabela 2, Figura 5).



3580

3581 **Figura 5.** (A) Superfície de resposta do fenólicos totais em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase  
 3582 em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 (UI.mL<sup>-1</sup>) e concentração de gengibre (g.100g<sup>-1</sup>). (B) Diagrama de Pareto apresentando os fatores não ajustados e seus níveis de significância (p<0,05)

3584

3585

3586

3587

Os valores encontrados estão entre 10,849 e 32,152 mg.mL<sup>-1</sup>. Ao avaliar o uso de ultrassom na recuperação de compostos fenólicos em gengibre, SASIKALA et al. (2017) atingiram valores médios de 5 mg.mL<sup>-1</sup> índices menores que os encontrados neste trabalho. Verificou-se ainda que as maiores concentrações de compostos fenólicos são obtidas quando o número de unidades enzimáticas está entre 10 e 13 UI.mL<sup>-1</sup> e concentração de gengibre maior que 2 gramas (Figura 5).

3593

3594

3595

3596

3597

O aumento da extração de compostos fenólicos está associado à ruptura da parede celular pela ação combinada da atividade enzimática e o ultrassom. Uma vez que estes compostos ocorrem tanto na forma solúvel quando conjugados com glicosídeos (flavonóides) quanto na forma insolúvel (ácidos fenólicos), sendo os insolúveis os mais abundantes. Os fenóis insolúveis estão ligados covalentemente aos componentes das paredes celulares - celulose,

3598 hemicelulose, lignina e pectina. Os ácidos fenólicos são ligados à lignina através dos grupos  
3599 hidroxila de seus anéis aromáticos, e a vários polissacarídeos e outras proteínas através de  
3600 ligações éster (ACOSTA-ESTRADA; GUTIERREZ-URIBE; SERNA-SALDIVAR, 2014).

3601 O aumento do rendimento da extração de compostos fenólicos também foi observado  
3602 por CHEN et al. (2011) ao utilizar celulase obtida de *Penicillium decumbens* ao avaliar a  
3603 degradação da parede celular das folhas de *Ginkgo biloba* L aumentando em 31% a extração de  
3604 compostos fenólicos, ainda promoveu maior transglicosilação de flavonoides aumentando a  
3605 polaridade destes compostos. Efeitos semelhantes foram obtidos por NAGENDRA CHARI et  
3606 al. (2013) ao comparar a extração de óleo resina e 6-gingerol assistida por celulase em gengibre  
3607 (*Zingiber officianlis* Roscoe), quando comparada à aplicação de  $\alpha$ -amilase, pectinase ou  
3608 protease. SWER et al. (2016) também observaram aumento da produção de antocianina após  
3609 amostras de frutos de Sohiong (*Prunus nepalensis* L.) serem submetidas à extração com  
3610 celulase.

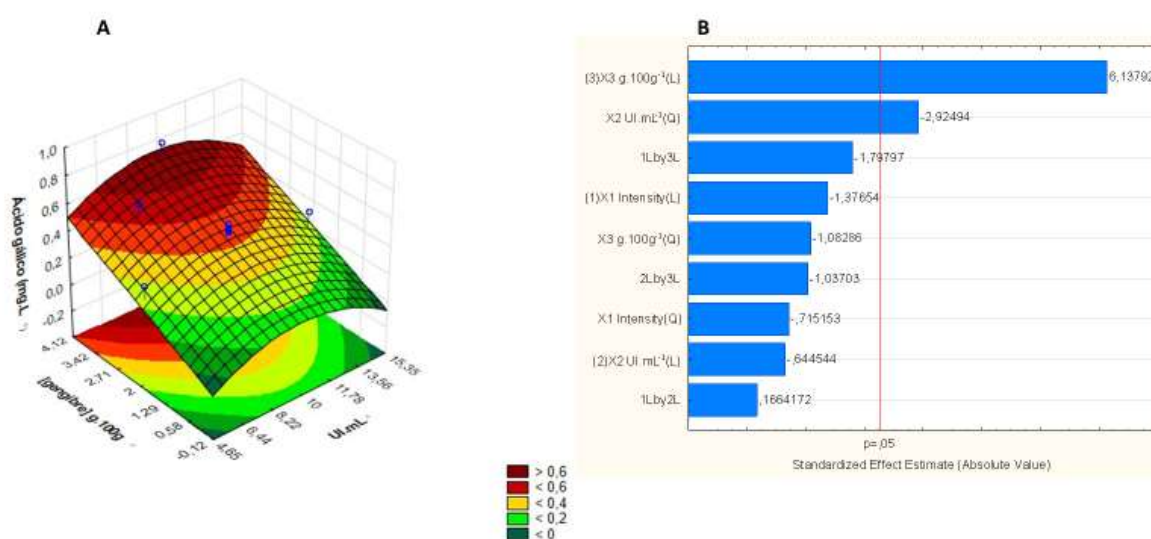
3611 A utilização do extrato enzimático bruto contendo enzimas com atividade de celulase e  
3612 xilanase, conforme utilizado neste trabalho, pode ter favorecido ainda mais a degradação e  
3613 liberação dos compostos fenólicos visto que a adição de xilanases favorece a hidrólise de  
3614 compostos lignocelulósicos através da celulase. aumentando a acessibilidade externa à celulose,  
3615 mas também a acessibilidade interna através do aumento da porosidade (SONG et al., 2016).

3616

3617 Perfil de compostos fenólicos por HPLC

3618 As análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência permitiram a  
3619 identificação e quantificação dos seguintes fenólicos: ácido gálico, caféico e vanilina. Estes  
3620 compostos também foram identificados por (TOHMA et al., 2016) ao avaliar rizomas de  
3621 gengibre por HPLC.

3622 Em relação ao ácido gálico o modelo ajustado demonstrou significância estatística para  
 3623 os parâmetros número de unidades enzimáticas e concentração de gengibre, sendo que a  
 3624 concentração de enzimas apresentou efeitos quadráticos negativos e a concentração de gengibre  
 3625 efeito linear positivo, resultando em uma região de maior concentração quando foi empregada  
 3626 alta concentração de gengibre (maior que 3 g·100 g<sup>-1</sup>) e unidades enzimáticas entre 7 e 13  
 3627 UI.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2, Figura 5).

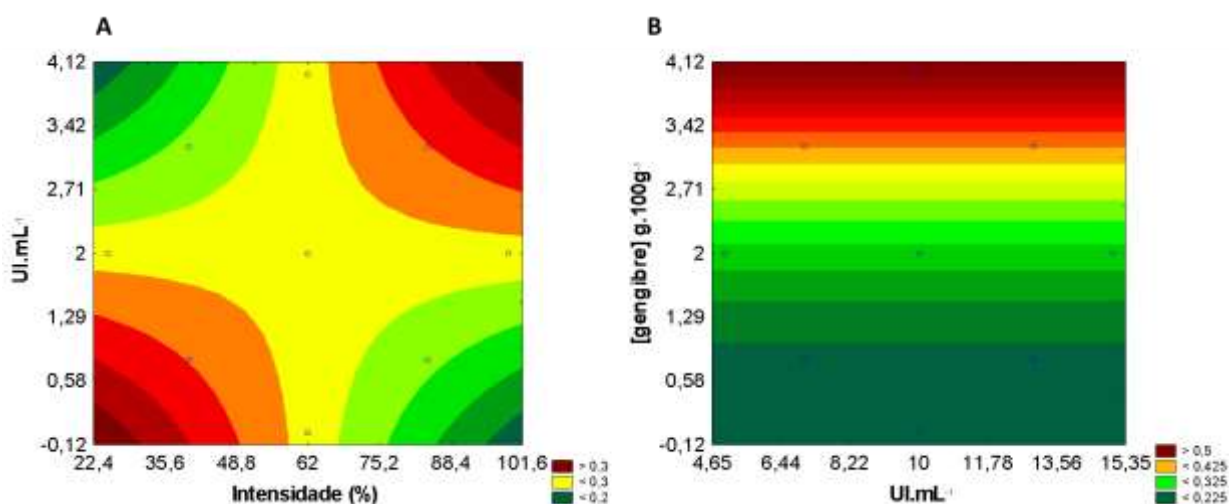


3628 **Figura 6.** (A) Superfície de resposta para o ácido gálico em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase  
 3629 em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 (UI.mL<sup>-1</sup>) e concentração de gengibre (g·100 g<sup>-1</sup>). (B) Diagrama de Pareto apresentando os fatores não ajustados e seus níveis de significância (p<0,05)

3632  
 3633  
 3634  
 3635 O ácido gálico ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico é um composto fenólico, produzido  
 3636 pela rota do ácido chiquímico, sendo um dos componentes dos taninos hidrolisáveis das plantas.  
 3637 É um composto cristalino, incolor ou ligeiramente amarelo, sendo um dos ácidos fenólicos mais  
 3638 abundantes no reino vegetal e possui ampla aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica  
 3639 por possuir atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. O ácido  
 3640 gálico foi o composto mais abundante entre os ácidos fenólicos identificados nos extratos de  
 3641 *Zingiber zerumbet* (FERNANDES; SALGADO, 2016; KAHKESHANI et al., 2019; LIMA et  
 3642 al., 2016; TOHMA et al., 2016). Ao avaliar o uso de enzimas purificadas ou complexos

3643 enzimáticos na extração de ácido gálico de resíduos de uva Syrah (*Vitis vinifera* 'Syrah') MEINI  
3644 et al. (2019) observou que não houve efeito quando utilizado extrato enzimático isolado, mas  
3645 quando utilizada um mistura de celulase e tanase houve aumento no rendimento da extração.

3646 Em relação ao ácido caféico o modelo ajustado não apresentou significância estatística  
3647 ( $r^2 < 0,70$ ). A concentração de ácido caféico variou de 0,00 a 0,74 mg·L<sup>-1</sup>, sendo que o maior  
3648 valor foi observado no tratamento que foi adicionado a maior concentração de gengibre  
3649 (Apêndice A). O ácido caféico é um composto polifenólico natural presente no café, algumas  
3650 frutas e medicamentos tradicionais chineses. O ácido caféico e seus análogos demonstraram  
3651 uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo ação anti-inflamatória, antitumoral e  
3652 antiviral (SARWAR et al., 2017).



3653 **Figura 7.** Superfície de resposta da vanilina em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase em extrato  
3654 enzimático bruto obtido a partir da intensidade do ultrassom (%) e número de unidades enzimáticas de celulase  
3655 em extrato enzimático bruto obtido a partir *Streptomyces* sp. I7 (UI.mL<sup>-1</sup>) (A) e em relação ao número de unidades  
3656 enzimáticas de celulase em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 (UI.mL<sup>-1</sup>) e  
3657 concentração de gengibre (g 100 g<sup>-1</sup>) (B).  
3658  
3659

3660 Em relação à vanilina, os modelos ajustados demonstraram que o ultrassom e o número  
3661 de unidades enzimáticas atuam nos extremos. Desta forma, quantidades menores de unidade  
3662 enzimáticas e intensidade do ultrassom ou em maiores valores para ambos são as melhores  
3663 condições para extração da vanilina (Figura 7A). Em relação a concentração de gengibre  
3664 observou que tanto os efeitos lineares e quadráticos da concentração de gengibre adicionada  
3665 foram positivos, ou seja, quanto maior a concentração de gengibre utilizada, maior foi a

3666 concentração de vanilina (Tabela 2, Figura 7B). A vanilina é um dos derivados fenólicos  
3667 formados a partir da ruptura da lignina e exibe propriedades antioxidantes e antimicrobianas e,  
3668 portanto, tem potencial para uso como conservante de alimentos (CYBULSKA; LEI; JULSON,  
3669 2010; WALTON; MAYER; NARBAD, 2003). O aumento da extração da vanilina em vagens  
3670 de baunilha utilizando o ultrassom quando comparado com a extração convencional de soxhlet,  
3671 também foi descrito por JADHAV et al. (2009), eles ainda observaram que o principal  
3672 mecanismo de liberação de vanilina é o rompimento das paredes celulares. Podemos inferir  
3673 ainda que os parâmetros mais influentes foram o número de unidades enzimáticas do extrato de  
3674 *Streptomyces* sp. utilizado e a concentração de gengibre (Figura 7B). A atividade de  $\beta$ -  
3675 glicosidase é a atividade mais necessária para a extração da vanilina em extratos de vagem de  
3676 baunilha independente se estas seriam curadas ou verdes. Contudo, a adição de outras enzimas  
3677 pode aumentar o rendimento da extração por hidrólise dos componentes da parede celular, como  
3678 já demonstrado em outros produtos agrícolas, como a azeitona e óleo de coco (RUIZ-TERAN;  
3679 PEREZ-AMADOR; LOPEZ-MUNGUÍA, 2001).

3680 Os compostos fenólicos identificados neste trabalho são reconhecidos como marcadores  
3681 de envelhecimento de bebidas, como a cachaça e whisky em madeiras. A utilização desta  
3682 metodologia e o aumento destes compostos sugere a sua utilização como estratégia para acelerar  
3683 o envelhecimento de bebidas.

## 3684 **Conclusão**

3685 Verificou -se que as melhores condições de extração assistida por método combinado  
3686 de ultrassom e extrato enzimático para produção de uma cachaça com a incorporação dos  
3687 fenólicos do gengibre seriam: concentração de gengibre maior que  $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ; número de  
3688 unidades enzimáticas entre 10 e 13 UI.mL<sup>-1</sup> e a intensidade do ultrassom entre 50 e 70%. Nessas  
3689 condições a cachaça obtida possuirá cor amarelada, concentração de açúcares redutores

3690 próximo a 2 mg.mL<sup>-1</sup>, concentração de compostos fenólicos totais aproximada de 28 mgEq.mL<sup>-1</sup>, ácido gálico próximo a 0,8 mg.L<sup>-1</sup>, ácido caféico próximo a 0,7 mg.L<sup>-1</sup> e vanilina próxima a 3691 0,6 mg.L<sup>-1</sup>. Esses resultados sugerem a metodologia aplicada como alternativa para 3692 incorporação de compostos fenólicos à cachaça não envelhecida. 3693

#### 3694 Referências Bibliográficas

3695

3696 ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIERREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDIVAR, S. O.  
3697 Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p.46. 2014. Disponível em:  
3698 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444905>>. Acesso em. doi:  
3699 10.1016/j.foodchem.2013.11.093

3700  
3701 ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Laboratory analytical**  
3702 **procedure**, v.6, n.465, p.1996. 1996. Disponível em: em. doi,  
3703

3704 AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.  
3705 **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 2012.  
3706 Disponível em: em. doi:  
3707

3708 BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology.  
3709 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.21, p.8711. 2019. Disponível em:  
3710 <<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>>. Acesso em. doi: 10.1007/s00253-019-10146-  
3711 0

3712  
3713 BOLINI-CARDELLO, H.; FARIA, J. Análise tempo-intensidade de características sensoriais  
3714 de aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus* sp). **Boletim**  
3715 **da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, n.1, p.27. 1999.  
3716 Disponível em: em. doi,  
3717

3718 BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; DE CAMPOS, I. T. N.; DE FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M.  
3719 Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes.  
3720 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.3, p.598. 2013. Disponível em:  
3721 <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0193-3>  
3722 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12010-013-0193-3.pdf>>. Acesso em. doi:  
3723 10.1007/s12010-013-0193-3  
3724

3725 BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; M. BATAUS,  
3726 L. A. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis*  
3727 I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **J Agri Environ Sci**, v.4, n.1, p.90. 2015.  
3728 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.15640/jaes.v4n1a12>>. Acesso em. doi:  
3729 10.15640/jaes.v4n1a12  
3730

- 3731 BROXTERMAN, S. E.; SCHOLS, H. A. Interactions between pectin and cellulose in primary  
3732 plant cell walls. **Carbohydrate Polymers**, v.192, p.263. 2018. Disponível em:  
3733 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691020>>. Acesso em. doi:  
3734 10.1016/j.carbpol.2018.03.070  
3735
- 3736 CHAKMA, S.; DIKSHIT, P. K.; GALODIYA, M. N.; GIRI, A. S.; MOHOLKAR, V. S. The  
3737 role of ultrasound in enzymatic degradation mechanism. **Journal of the Taiwan Institute of**  
3738 **Chemical Engineers**, v.107, p.54. 2020. Disponível em:  
3739 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107019304432>>. Acesso em. doi:  
3740 10.1016/j.jtice.2019.11.009  
3741
- 3742 CHEN, S.; XING, X. H.; HUANG, J. J.; XU, M. S. Enzyme-assisted extraction of flavonoids  
3743 from Ginkgo biloba leaves: improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by  
3744 *Penicillium decumbens* cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, n.1, p.100.  
3745 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112777>>. Acesso em. doi:  
3746 10.1016/j.enzmictec.2010.09.017  
3747
- 3748 COSTA-JUNIOR, R. B.; BRANDAO-COSTA, R. M. P.; ALBUQUERQUE, W. W. C.;  
3749 BATISTA, J. M. S.; PEDROSA, R. B.; PORTO, A. L. F. Ultrasound-Assisted Enzyme-  
3750 Catalyzed Hydrolysis of Collagen to Produce Peptides With Biomedical Potential:  
3751 Collagenase From *Aspergillus terreus* UCP1276. **Bioelectromagnetics**, v.41, n.2, p.113.  
3752 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31872912>>. Acesso em. doi:  
3753 10.1002/bem.22239  
3754
- 3755 COSTA, M. A. L.; FARINAS, C. S.; MIRANDA, E. A. ETHANOL PRECIPITATION AS A  
3756 DOWNSTREAM PROCESSING STEP FOR CONCENTRATION OF XYLANASES  
3757 PRODUCED BY SUBMERGED AND SOLID-STATE FERMENTATION. **Brazilian**  
3758 **Journal of Chemical Engineering**, v.35, p.477. 2018. Disponível em:  
3759 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322018000200477&nrm=iso)  
3760 [66322018000200477&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322018000200477&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/0104-6632.20180352s20160502  
3761
- 3762 CYBULSKA, I.; LEI, H.; JULSON, J. Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis  
3763 of Prairie Cord Grass. **Energy & Fuels**, v.24, n.1, p.718. 2010. Disponível em:  
3764 <<https://doi.org/10.1021/ef9009179>>. Acesso em. doi: 10.1021/ef9009179  
3765
- 3766 DA SILVA MIGUÉIS, G.; DA SILVA, R. H.; GUARIM-NETO, G.; JUNIOR, G. A. D.  
3767 Medicine bottled (garrafada): Rescue of the popular knowledge. **Journal of Medicinal Plants**  
3768 **Research**, v.12, n.22, p.325. 2018. Disponível em: em. doi: 10.5897/JMPR2018.6606  
3769
- 3770 DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ, J. L.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO,  
3771 J. P.; DE OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Enzymatic  
3772 saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by  
3773 *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit.  
3774 **Bioresource Technology**, v.248, n.Pt A, p.214. 2018. Disponível em:  
3775 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669572>>. Acesso em. doi:  
3776 10.1016/j.biortech.2017.06.048  
3777
- 3778 DE CARVALHO SILVELLO, M. A.; MARTÍNEZ, J.; GOLDBECK, R. Increase of reducing  
3779 sugars release by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse intensified by ultrasonic  
3780 treatment. **Biomass and Bioenergy**, v.122, p.481. 2019. Disponível em:

3781 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953419300418>>. Acesso em. doi:  
3782 10.1016/j.biombioe.2019.01.032  
3783  
3784 FERNANDES, F. H.; SALGADO, H. R. Gallic Acid: Review of the Methods of  
3785 Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.46, n.3,  
3786 p.257. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26440222>>. Acesso em.  
3787 doi: 10.1080/10408347.2015.1095064  
3788  
3789 GAMA, A. R.; BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; DE SOUZA, G. R. L.;  
3790 CARNEIRO, L. C.; BATAUS, L. A. M. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel  
3791 bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**,  
3792 v.n/a, n.n/a, p.e2934. 2019. Disponível em:  
3793 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2934>>. Acesso em. doi:  
3794 10.1002/btpr.2934  
3795  
3796 GHAFOR, K.; AL JUHAIMI, F.; ÖZCAN, M. M.; USLU, N.; BABIKER, E. E.;  
3797 MOHAMED AHMED, I. A. Total phenolics, total carotenoids, individual phenolics and  
3798 antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome as affected by drying methods.  
3799 **LWT**, v.126, p.109354. 2020. Disponível em:  
3800 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820303431>>. Acesso em. doi:  
3801 10.1016/j.lwt.2020.109354  
3802  
3803 GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, n.2,  
3804 p.257. 1987. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987F757200011>. Acesso em. doi:  
3805 10.1351/pac198759020257  
3806  
3807 GHOSH, P.; PAMMENT, N. B.; MARTIN, W. R. B. Simultaneous saccharification and  
3808 fermentation of cellulose: effect of  $\beta$ -d-glucosidase activity and ethanol inhibition of  
3809 cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.4, n.6, p.425. 1982. Disponível em:  
3810 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022982900758>>. Acesso em. doi:  
3811 [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90075-8)  
3812  
3813 IJIMA, Y.; JOH, A. Pigment Composition Responsible for the Pale Yellow Color of Ginger  
3814 (*Zingiber officinale*) Rhizomes. **Food Science and Technology Research**, v.20, n.5, p.971.  
3815 2014. Disponível em: em. doi: 10.3136/fstr.20.971  
3816  
3817 JADHAV, D.; B.N, R.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla  
3818 pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal**  
3819 **of Food Engineering**, v.93, n.4, p.421. 2009. Disponível em:  
3820 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877409000703>>. Acesso em. doi:  
3821 10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007  
3822  
3823 JING, X.; ZHANG, X.; BAO, J. Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation  
3824 Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. **Applied**  
3825 **Biochemistry and Biotechnology**, v.159, n.3, p.696. 2009. Disponível em:  
3826 <<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8525-z>>. Acesso em. doi: 10.1007/s12010-009-8525-z  
3827  
3828 KAHKESHANI, N.; FARZAEI, F.; FOTOUHI, M.; ALAVI, S. S.; BAHRAMSOLTANI, R.;  
3829 NASERI, R.; MOMTAZ, S.; ABBASABADI, Z.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H.;  
3830 BISHAYEE, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic

3831 review. **Iran J Basic Med Sci**, v.22, n.3, p.225. 2019. Disponível em:  
3832 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31156781>>. Acesso em. doi:  
3833 10.22038/ijbms.2019.32806.7897  
3834  
3835 LIMA, V. N.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D.; SANTOS, E. S.; MORAIS, L. P.; TINTINO, S.  
3836 R.; FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R.;  
3837 COUTINHO, H. D. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic  
3838 compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p.56.  
3839 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497894>>. Acesso em. doi:  
3840 10.1016/j.micpath.2016.08.004  
3841  
3842 MAO, Q. Q.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; GAN, R. Y.; CORKE, H.; BETA, T.; LI, H. B.  
3843 Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods**, v.8,  
3844 n.6, p.185. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31151279>>. Acesso  
3845 em. doi: 10.3390/foods8060185  
3846  
3847 MARIÑO, M. A.; FREITAS, S.; MIRANDA, E. A. ETHANOL PRECIPITATION OF  
3848 GLYCOSYL HYDROLASES PRODUCED BY *Trichoderma harzianum* P49P11. **Brazilian**  
3849 **Journal of Chemical Engineering**, v.32, p.325. 2015. Disponível em:  
3850 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322015000200325&nrm=iso)  
3851 [66322015000200325&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322015000200325&nrm=iso)>. Acesso em. doi: 10.1590/0104-6632.20150322s00003268  
3852  
3853 MARQUES, G. L.; DOS SANTOS REIS, N.; SILVA, T. P.; FERREIRA, M. L. O.;  
3854 AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production and  
3855 Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC  
3856 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass**  
3857 **Valorization**, v.9, n.11, p.2061. 2017. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/s12649-017-](https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x)  
3858 [9994-x](https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x)>. Acesso em. doi: 10.1007/s12649-017-9994-x  
3859  
3860 MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de  
3861 inibição enzimática. **Quimica Nova**, v.31, p.1791. 2008. Disponível em:  
3862 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700034&nrm=iso)  
3863 [40422008000700034&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700034&nrm=iso)>. Acesso em. doi,  
3864 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700034&nrm=iso)  
3865 [40422008000700034&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700034&nrm=iso)  
3866  
3867 MAULANA HIDAYATULLAH, I.; SETIADI, T.; TRI ARI PENIA KRESNOWATI, M.;  
3868 BOOPATHY, R. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material.  
3869 **Bioresource Technology**, v.300, p.122740. 2020. Disponível em:  
3870 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420300092>>. Acesso em. doi:  
3871 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122740>  
3872  
3873 MEINI, M. R.; CABEZUDO, I.; BOSCHETTI, C. E.; ROMANINI, D. Recovery of phenolic  
3874 antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction  
3875 process. **Food Chemistry**, v.283, p.257. 2019. Disponível em:  
3876 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30722869>>. Acesso em. doi:  
3877 10.1016/j.foodchem.2019.01.037  
3878

3879 MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.  
3880 **Analytical chemistry**, v.31, n.3, p.426. 1959. Disponível em:  
3881 <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em. doi: 10.1021/ac60147a030  
3882  
3883 NAGENDRA CHARI, K. L.; MANASA, D.; SRINIVAS, P.; SOWBHAGYA, H. B.  
3884 Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe).  
3885 **Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p.509. 2013. Disponível em:  
3886 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561138>>. Acesso em. doi:  
3887 10.1016/j.foodchem.2013.01.099  
3888  
3889 OLIVEIRA, C. S. D.; BISINELLA, R. Z. B.; BET, C. D.; BENINCA, C.; DEMIATE, I. M.;  
3890 SCHNITZLER, E. Physicochemical, Thermal, Structural and Pasting Properties of  
3891 Unconventional Starches from Ginger (*Zingiber officinale*) and White Yam (*Dioscorea* sp.).  
3892 **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.62. 2019. Disponível em:  
3893 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132019000100516&nrm=iso)  
3894 [89132019000100516&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132019000100516&nrm=iso)>. Acesso em. doi: [https://doi.org/10.1590/1678-4324-](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180579)  
3895 [2019180579](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180579).  
3896  
3897 OSAE, R.; ZHOU, C.; TCHABO, W.; XU, B.; BONAHA, E.; ALENYOREGE, E. A.; MA, H.  
3898 Optimization of osmosonication pretreatment of ginger (  
3899 *Zingiber officinale*  
3900 Roscoe) using response surface methodology: Effect on antioxidant activity, enzyme  
3901 inactivation, phenolic compounds, and physical properties. **Journal of Food Process**  
3902 **Engineering**, v.42, n.6, p.e13218. 2019. Disponível em:  
3903 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpe.13218>>. Acesso em. doi:  
3904 10.1111/jfpe.13218  
3905  
3906 OYEDOH, E. A.; EKHORUGUE, U. E.; AYODELE, B. V. Screening the Effect of Process  
3907 Parameters on the Yields of Bioactive Compounds Extraction from *Zingiber officinale* Using  
3908 Full Factorial Design. **extraction**, v.2, n.1, p.121. 2020. Disponível em: em. doi,  
3909  
3910 PATIL, R. S.; JOSHI, S. M.; GOGATE, P. R. Intensification of delignification of sawdust  
3911 and subsequent enzymatic hydrolysis using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.58,  
3912 p.104656. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31450369>>. Acesso  
3913 em. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.104656  
3914  
3915 PRIDHAM, T.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.; HESSELTINE, C.;  
3916 BENEDICT, R. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes.  
3917 **A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes.**,  
3918 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19591101858>. 1957. Disponível em:  
3919 <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19591101858>>. Acesso em. doi:  
3920  
3921 QI, B.; CHEN, X.; YI, S.; WAN, Y. Inhibition of cellulase,  $\beta$ -glucosidase, and xylanase  
3922 activities and enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by acetone-butanol-  
3923 ethanol fermentation products. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.33, n.2,  
3924 p.497. 2014. Disponível em:  
3925 <<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ep.11789>>. Acesso em. doi:  
3926 10.1002/ep.11789  
3927

3928 QIAN, M. C.; HUGHES, P.; CADWALLADER, K. Overview of Distilled Spirits. In: (Ed.).  
3929 **Sex, Smoke, and Spirits: The Role of Chemistry**: American Chemical Society, v.1321,  
3930 2019. cap. 11, p.125. (ACS Symposium Series). ISBN 9780841234673.  
3931  
3932 RAMADA, M. H.; LOPES, F. A.; ULHOA, C. J.; SILVA RDO, N. Optimized microplate  
3933 beta-1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. **Journal of Microbiological**  
3934 **Methods**, v.81, n.1, p.6. 2010. Disponível em:  
3935 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096308>>. Acesso em. doi:  
3936 10.1016/j.mimet.2010.01.010  
3937  
3938 REIS, N. S.; BRITO, A. R.; PACHECO, C. S. V.; COSTA, L. C. B.; GROSS, E.; SANTOS,  
3939 T. P.; COSTA, A. R.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, R. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.;  
3940 OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Improvement in menthol extraction of fresh leaves of  
3941 *Mentha arvensis* by the application of multi-enzymatic extract of *Aspergillus niger*. **Chemical**  
3942 **Engineering Communications**, v.206, n.3, p.387. 2018. Disponível em:  
3943 <<https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1494580>>. Acesso em. doi:  
3944 10.1080/00986445.2018.1494580  
3945  
3946 RUIZ-TERAN, F.; PEREZ-AMADOR, I.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic extraction and  
3947 transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. **Journal of Agricultural**  
3948 **and Food Chemistry**, v.49, n.11, p.5207. 2001. Disponível em:  
3949 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714304>>. Acesso em. doi: 10.1021/jf010723h  
3950  
3951 SALEA, R.; VERIANSYAH, B.; TJANDRAWINATA, R. R. Optimization and scale-up  
3952 process for supercritical fluids extraction of ginger oil from *Zingiber officinale* var. *Amarum*.  
3953 **The Journal of Supercritical Fluids**, v.120, p.285. 2017. Disponível em:  
3954 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844616301504>>. Acesso em. doi:  
3955 10.1016/j.supflu.2016.05.035  
3956  
3957 SANTOS, M. V. G.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. D. O.; SILVA, D. S.; PEREIRA, A. L.  
3958 F. Elaboração de néctar misto de uva e gengibre. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8,  
3959 p.14. 2017. Disponível em:  
3960 <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/download/4464/pdf>>. Acesso em. doi,  
3961 <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/download/4464/pdf>  
3962  
3963 SARWAR, T.; ISHQI, H. M.; REHMAN, S. U.; HUSAIN, M. A.; RAHMAN, Y.; TABISH,  
3964 M. Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA: A multi-spectroscopic,  
3965 thermodynamics and molecular modelling study. **International Journal of Biological**  
3966 **Macromolecules**, v.98, p.319. 2017. Disponível em:  
3967 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016328410>>. Acesso em. doi:  
3968 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.014>  
3969  
3970 SASIKALA, P.; CHANDRALEKHA, A.; CHAURASIYA, R. S.; CHANDRASEKHAR, J.;  
3971 RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound-assisted extraction and adsorption of polyphenols  
3972 from Ginger Rhizome (*Zingiber officinale*). **Separation Science and Technology**, v.53, n.3,  
3973 p.439. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1391290>>. Acesso em.  
3974 doi: 10.1080/01496395.2017.1391290  
3975  
3976 SCHWEIGGERT, U.; HOFMANN, S.; REICHEL, M.; SCHIEBER, A.; CARLE, R.  
3977 Enzyme-assisted liquefaction of ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc.) for the

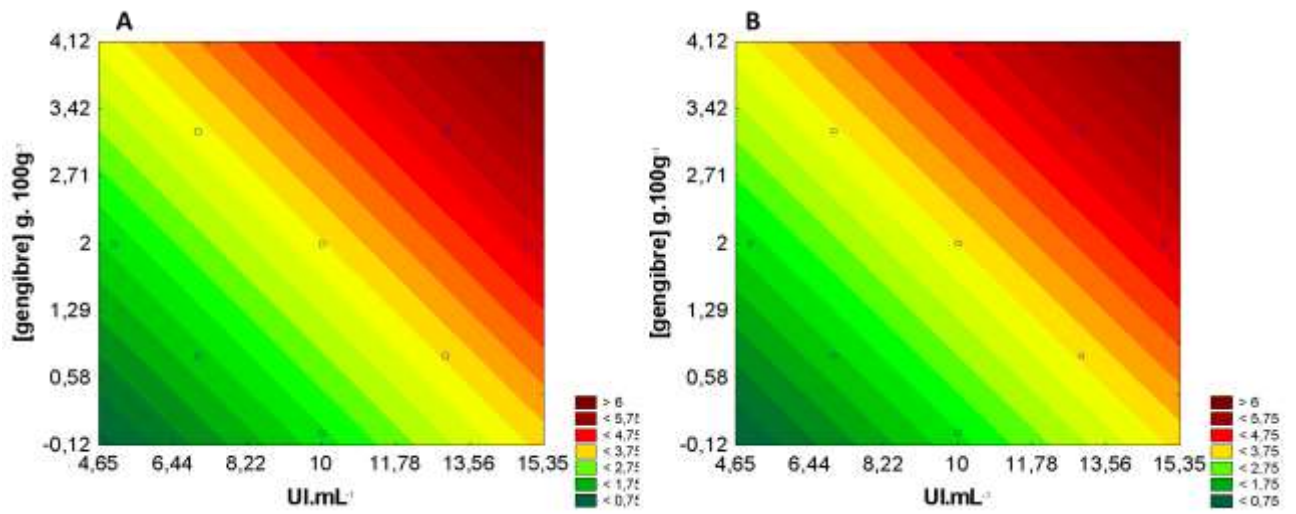
3978 production of spray-dried and paste-like ginger condiments. **Journal of Food Engineering**,  
3979 v.84, n.1, p.28. 2008. Disponível em:  
3980 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877407002555>>. Acesso em. doi:  
3981 10.1016/j.jfoodeng.2007.04.013  
3982  
3983 SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. M. Gingerols and  
3984 shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, v.117, p.554.  
3985 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26228533>>. Acesso em. doi:  
3986 10.1016/j.phytochem.2015.07.012  
3987  
3988 SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of  
3989 total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu  
3990 reagent. In: (Ed.). **Oxidants and Antioxidants Part A**: Elsevier, v.299, 1999. p.152.  
3991 (Methods in Enzymology). ISBN 9780121822002.  
3992  
3993 SONG, H.-T.; GAO, Y.; YANG, Y.-M.; XIAO, W.-J.; LIU, S.-H.; XIA, W.-C.; LIU, Z.-L.;  
3994 YI, L.; JIANG, Z.-B. Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural  
3995 lignocellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v.219, p.710. 2016. Disponível em:  
3996 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416311634>>. Acesso em. doi:  
3997 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.035>  
3998  
3999 SWER, T. L.; CHAUHAN, K.; PAUL, P. K.; MUKHIM, C. Evaluation of enzyme treatment  
4000 conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. **International Journal of**  
4001 **Biological Macromolecules**, v.92, p.867. 2016. Disponível em:  
4002 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492561>>. Acesso em. doi:  
4003 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.105  
4004  
4005 TAKAGI, M. Inhibition of cellulase by fermentation products. **Biotechnology and**  
4006 **Bioengineering**, v.26, n.12, p.1506. 1984. Disponível em:  
4007 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260261216>>. Acesso em. doi:  
4008 10.1002/bit.260261216  
4009  
4010 TASSI, A. L. W.; BENTO, J. A. C.; CALIARI, M.; SILVA, V. S. N. D.; PACHECO, M. T.  
4011 B.; SOARES JÚNIOR, M. S. Physical and chemical characteristics of soybean preserve as a  
4012 function of maceration time and acetic acid. **Food Science and Technology**, v.39, p.552.  
4013 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000300552&nrm=iso)  
4014 [20612019000300552&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000300552&nrm=iso)>. Acesso em. doi,  
4015 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000300552&nrm=iso)  
4016 [20612019000300552&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000300552&nrm=iso)  
4017  
4018 TAVANANDI, H. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound-assisted enzymatic  
4019 extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*.  
4020 **LWT**, v.118, p.108802. 2020. Disponível em:  
4021 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819311442>>. Acesso em. doi:  
4022 10.1016/j.lwt.2019.108802  
4023  
4024 THOMPSON, E. H.; WOLF, I. D.; ALLEN, C. E. GINGER RHIZOME: A NEW SOURCE  
4025 OF PROTEOLYTIC ENZYME. **Journal of Food Science**, v.38, n.4, p.652. 1973. Disponível  
4026 em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02836.x>>. Acesso  
4027 em. doi: 10.1111/j.1365-2621.1973.tb02836.x

4028  
4029 TOHMA, H.; GÜLÇİN, İ.; BURSAL, E.; GÖREN, A. C.; ALWASEL, S. H.; KÖKSAL, E.  
4030 Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)  
4031 determined by HPLC-MS/MS. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.11,  
4032 n.2, p.556. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11694-016-9423-z>>. Acesso em.  
4033 doi: 10.1007/s11694-016-9423-z  
4034  
4035 WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. **Phytochemistry**, v.63, n.5, p.505.  
4036 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809710>>. Acesso em. doi:  
4037 10.1016/s0031-9422(03)00149-3  
4038  
4039 WANG, L.; BOUSSETTA, N.; LEBOVKA, N.; LEFEBVRE, C.; VOROBIEV, E.  
4040 Correlations between disintegration degree of fruit skin cells induced by ultrasound and  
4041 efficiency of bio-compounds extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.52, p.280. 2019.  
4042 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30555040>>. Acesso em. doi:  
4043 10.1016/j.ultsonch.2018.11.026  
4044  
4045 ZHANG, F.; THAKUR, K.; HU, F.; ZHANG, J. G.; WEI, Z. J. Cross-talk between 10-  
4046 gingerol and its anti-cancerous potential: a recent update. **Food Funct**, v.8, n.8, p.2635. 2017.  
4047 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28745358>>. Acesso em. doi:  
4048 10.1039/c7fo00844a  
4049  
4050 ZHOU, L.; JIANG, B.; ZHANG, T.; LI, S. Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction  
4051 of resveratrol from the enzymatic hydrolysates of *Polygonum cuspidatum*. **Food Bioscience**,  
4052 v.31, p.100442. 2019. Disponível em:  
4053 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429218307521>>. Acesso em. doi:  
4054 10.1016/j.fbio.2019.100442  
4055  
4056

**Apêndice A** - Dados das variáveis utilizadas para a avaliação dos impactos da utilização do extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 e ultrassom por 5 minutos em solução hidroalcolica (40%) de gengibre, onde X1= intensidade do ultrassom (%); X2= volume do extrato enzimático (min); X3= concentração de gengibre (g 100 g<sup>-1</sup>)

Tratamento	pH	L*	Croma a*	Croma b*	C*	H°	Açúcares redutores (mg. mL <sup>-1</sup> )	Fenólicos totais (mg. mL <sup>-1</sup> )	Ácido gálico (mg. L <sup>-1</sup> )	Ácido caféico (mg. L <sup>-1</sup> )	Vanilina (mg. L <sup>-1</sup> )
1	5,550	4,857	-0,300	2,673	2,691	96,381	0,308	19,466	0,152	0,442	0,350
2	5,620	6,100	-0,603	2,290	2,372	104,758	0,361	20,516	0,174	0,000	0,218
3	5,700	7,760	-0,213	4,347	4,353	92,810	0,443	25,634	0,171	0,523	0,238
4	5,740	11,043	-0,187	6,133	6,137	91,629	0,426	21,435	0,175	0,534	0,210
5	6,000	10,440	-0,060	6,210	6,210	90,554	1,730	26,422	0,627	0,531	0,503
6	6,070	6,520	0,307	5,217	5,226	86,638	1,630	26,159	0,366	0,459	0,330
7	6,150	8,997	0,087	6,617	6,617	89,252	2,176	31,365	0,465	0,000	0,379
8	6,190	7,713	0,133	5,333	5,336	88,550	1,819	30,359	0,267	0,000	0,372
9	6,050	11,987	-0,303	6,193	6,201	92,797	1,537	27,996	0,514	0,594	0,259
10	6,010	8,377	-0,867	2,593	2,735	108,527	1,197	30,009	0,483	0,605	0,291
11	5,950	6,927	-0,533	1,107	1,229	115,812	1,111	28,259	0,332	0,562	0,285
12	6,010	13,707	-0,290	4,183	4,194	93,956	0,922	29,746	0,341	0,494	0,266
13	5,510	6,447	-0,460	2,433	2,478	100,601	0,161	10,849	0,141	0,240	0,120
14	6,090	9,700	-0,877	3,807	3,907	102,948	2,101	26,684	0,801	0,739	0,628
15	6,010	6,690	-0,267	3,113	3,125	94,891	1,126	31,977	0,476	0,536	0,363
16	6,010	5,957	-0,253	3,307	3,319	94,380	1,133	31,933	0,463	0,533	0,301
17	6,020	6,280	-0,203	3,157	3,163	93,699	1,129	31,021	0,447	0,547	0,303
18	6,010	7,703	-0,773	2,460	2,580	107,393	1,129	32,152	0,475	0,527	0,300
19	6,010	5,433	-0,133	2,723	2,728	92,758	1,129	31,802	0,474	0,521	0,290

## Apêndice B



**Figura 7.** Superfície das cromaticidades b (A) e cromaticidade c (B) em relação ao número de unidades enzimáticas de celulase em extrato enzimático bruto obtido a partir do *Streptomyces* sp. I7 (UI. mL<sup>-1</sup>) e concentração de gengibre (g 100 g<sup>-1</sup>).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O farelo de trigo mostrou-se o melhor substrato para produzir celulasas e xilanases usando a bactéria *Streptomyces thermocerradoensis* I3, uma vez que os outros substratos (*Jatropha eliptica* e *Cochlospermum regium*) não forneceram extratos enzimáticos com atividade satisfatória, nem apresentaram atividade para as duas enzimas estudadas (celulasas e xilanases).

O pH ótimo para produzir celulasas e xilanases em fermentação semissólida do farelo de trigo com *Streptomyces thermocerradoensis* I3, foi de 7,5 e 7,0, para CMCase e xilanase, respectivamente.

O tratamento enzimático é promissor na produção de farinha enriquecida com polifenóis, contribuindo para a produção de um produto com alto teor de compostos bioativos (polifenóis) e alta atividade antioxidante.

*Streptomyces* sp. I7 mostrou-se eficaz na produção de xilanases e celulasas usando o farelo de trigo como meio de cultura.

O pré-tratamento do caldo de cana com o extrato enzimático bruto promoveu alterações na fermentação, aumentou o teor alcoólico e reduziu a acidez e o teor de éster e carbamato etila em cachaças produzidas utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

O pré-tratamento enzimático teve impacto positivo na qualidade e no rendimento da produção de etanol em cachaças produzidas utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

A fermentação alcoólica do caldo de cana, previamente tratado com extrato enzimático, utilizando a levedura M27 possibilitou a obtenção de uma cachaça com perfil químico de congêneres e contaminantes bem abaixo do preconizado pela legislação brasileira.

Os tratamentos enzimáticos com extrato bruto de *Streptomyces* sp. promoveram a redução da acidez total; ésteres totais e metanol, sendo observada uma maior redução no

tratamento T2 (tratamento com a maior concentração de enzimas). Também foi verificado o aumento dos teores de etanol e aldeídos totais, com aumento mais pronunciado no tratamento T2.

O pré-tratamento enzimático e a utilização de levedura não convencional para a produção de cachaça tiveram impacto positivo na qualidade e rendimento da produção de etanol, apresentando potencial para sua aplicação industrial, seja na indústria de bebidas ou bioetanol.

Foi constatado o isolamento de uma cepa de levedura selvagem com características morfológicas sugestivas de *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana em fermentação espontânea

O pré-tratamento enzimático da cachaça alterou o processo fermentativo e aumentou a produtividade em relação à concentração de etanol.

A sacarificação e fermentação simultâneas promoveram ainda a melhoria nos atributos de qualidade da cachaça através da redução da acidez, metanol e carbamato de etila e aumentou o teor de ésteres. Este processo poderia ser ainda utilizado na produção de bioetanol combustível

Verificou -se as condições ideais para produção de uma cachaça com a incorporação dos fenólicos do gengibre seriam: concentração de gengibre maior que  $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ; número de unidades enzimáticas entre 10 e 13 UI.  $\text{mL}^{-1}$  e a intensidade do ultrassom entre 50 e 70%. Resultando em cachaça com cor mais amarelada, com açúcares redutores próximo a  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , concentração de fenólicos totais aproximada de  $28 \text{ mgEq} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ácido gálico próximo a  $0,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , ácido caféico próximo a  $0,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  e vanilina próxima a  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . O consumo de bebidas alcólicas com maior teor de compostos fenólicos quando comparada ao consumo de bebidas sem estes componentes poderia trazer menos malefícios à saúde dos consumidores.

O pré-tratamento com extrato bruto de *Streptomyces* sp I7. deve ser testado em escala industrial, podendo ter aplicabilidade na indústria de bioetanol.