

Willian Alexandre Suguino

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS  
AUTÓCTONES COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE  
SIDRA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis  
2018



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Suguino, Willian Alexandre  
Seleção e caracterização de leveduras autóctones  
com potencial para produção de sidra / Willian  
Alexandre Suguino ; orientador, Jorge Luiz Ninow,  
coorientador, Márcio José Rossi, 2018.  
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. I. Ninow, Jorge  
Luiz. II. Rossi, Márcio José. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos. IV. Título.



Willian Alexandre Suguino

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS  
AUTÓCTONES COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE  
SIDRA**

Esta Tese de Doutorado foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 20 de março de 2018.

---

Prof., Dr. Bruno Carciofi  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
Orientador  
PGEAL/UFSC

---

Prof. Dr. Acácio Antônio Ferreira  
Zielinski  
PGEAL/UFSC

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi  
Co-orientador  
PG Biotecnologia e  
Biociências

---

Prof. Dr. Alessandro Nogueira  
PG-CTA/UEPG-PR

---

Prof<sup>a</sup>. dra. Débora de Oliveira  
PGEAL/UFSC

---

Prof. Dr. José Miguel Müller  
(Suplente)  
PGEAL/UFSC



Dedico este trabalho à  
Shantau, companheira de  
todas as horas, aos meus  
pais e todos os amigos



## AGRADECIMENTOS

À minha companheira Shantau por toda dedicação, paciência e carinho durante esta longa jornada.

Aos meus pais, Edson e Hiloko, pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos Prof. Jorge Ninow e Márcio Rossi por aceitarem minha orientação, por sua disponibilidade, assessoria e parceria.

Ao Prof. Alessandro Nogueira, por sempre ser solícito a ajudar com orientações e sugestões.

Prof. Admir Giachini e Cláudio Soares pelos auxílios e orientações no dia a dia do laboratório

Ao Prof. Rafael Armas pela inestimável parceria e em especial pelo auxílio e orientação na extração e amplificação do DNA das cepas e sequenciamento dos isolados.

Ao grande amigo Douglas Cortez pelo companheirismo e por todos os auxílios nas horas mais difíceis e porque, sem ele, não teria conhecido a Shantau.

Às minhas estagiárias Ana Martins e Júlia Martinelli e colegas de laboratório.

Aos amigos

À prof<sup>a</sup> Débora de Oliveira, Gabriela Muller e ao Dr. Josamaique Gilson Veneral por contribuírem com esse trabalho.

À CAPES e PGEAL pelo apoio financeiro e oportunidade de realização do trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) por disponibilizar equipamentos para realização de análises.

À todos aqueles que em maior ou menor extensão foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas artesanais ou *gourmet* vem aumentando e conquistando um consumidor cada vez mais exigente na qualidade dos produtos. A sidra é uma bebida produzida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã e no Brasil, seu consumo se dá principalmente nas épocas festivas do Natal e Ano Novo, como substituto barato do espumante. A baixa qualidade e má fama desse produto no mercado nacional poderiam ser superadas com a elaboração de sua versão artesanal. O objetivo do trabalho foi selecionar leveduras autóctones não-*Saccharomyces* da região produtora de maçãs no estado de Santa Catarina com potencial para produção de sidra, visando estimular a produção dessa bebida como produto de alto valor e qualidade. Para tal, 120 isolados de levedura foram triados a partir de ensaios para verificar a produção de H<sub>2</sub>S, tolerância ao etanol exógeno em temperaturas de 8 e 20 °C, e análise olfativa. Os isolados selecionados foram caracterizados quanto à sua cinética de crescimento celular e consumo de açúcares em cultivos estático e agitado, produção e sensibilidade à toxina *killer* e foram identificados a partir do sequenciamento de seu rDNA. Os resultados demonstram o potencial de 3 leveduras para a produção de sidra, o isolado 199 (*Hanseniaspora valbyensis*) apresentou capacidade de fermentar totalmente os açúcares presentes no mosto, produção de 4 % de álcool e atividade *killer* contra outras 8 leveduras testadas sem apresentar sensibilidade à toxina. Os isolados 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) e Villa 3-2 (*Candida zeylanoides*) apresentaram atividade *killer* contra 5 e 6 das leveduras testadas, respectivamente, sem apresentar sensibilidade à toxina, e produziram aromas frutado e floral em maior intensidade dentre os isolados, porém não demonstraram capacidade de fermentar totalmente os açúcares presentes, sendo necessária sua utilização em fermentações mistas.

Palavras-chave: Levedura autóctone, seleção, sidra



## ABSTRACT

The consumption of homebrewed alcoholic beverages or *gourmet* is increasing and gaining a consumer that is increasingly demanding products with greater quality. Cider is a beverage produced by the alcoholic fermentation of apple must and, in Brazil, its consumption is done mainly in Christmas and New Year as a cheaper substitute for the sparkling wine. The low quality and bad reputation of the product in the national market could be overcome producing a homebrewed version of the cider. The aim of this study was to select native non-*Saccharomyces* yeasts from the apple production region in the state of Santa Catarina with potential for producing cider, to stimulate the production of this drink as a high quality and value. For this, 120 yeast strains were trialed with assays to verify the production of H<sub>2</sub>S, tolerance to exogenous ethanol and temperatures of 8 °C and 20 °C and olfactory analysis. The selected strains had their growth and sugar consumption kinetic characterized in static and stirred assays, production and sensibility of killer toxin were also detected and they were identified by sequencing their rDNA. Results show the potential of 3 yeasts for the production of hard cider, strain 199 (*Hanseniaspora valbyensis*) showed to be capable to use ferment all the sugars present in the must, yielding 4 % (v/v) of ethanol and also showed killer activity against 8 other yeasts strains and no sensibility to the toxin. Isolates 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) and Villa 3-2 (*Candida zeylanoides*) showed killer activity against 5 and 6 other yeasts tested, respectively, without sensibility to the toxin, and produced fruity and floral aroma in higher intensity among the strains tested but they could not ferment all the sugars present, thus being necessary to use these strains in mixed fermentations.

Keywords: indigenous yeast, selection, cider



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MAÇÃS NA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	26
FIGURA 2. PRINCIPAIS MUNICÍPIOS PRODUTORES DE MAÇÃ EM SANTA CATARINA. ....	28
FIGURA 3. POSSÍVEIS SÍTIOS DE AÇÃO DO ETANOL NA CÉLULA DE LEVEDURA .....	33
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS SULFURADOS.....	36
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS DO MOSTO EM COMPOSTOS DO VINHO PELA FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS.....	39
FIGURA 6. RESULTADOS PARA A PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S PELOS ISOLADOS: A) NEGATIVO, B) BAIXO, C) MÉDIO E D) ALTO .....	48
FIGURA 7. FICHA DE ANÁLISE OLFATIVA COM ESCALA HEDÔNICA DE NOVE PONTOS ....	49
FIGURA 8. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA SEGUNDO SUA PRODUÇÃO MÁXIMA DE GÁS AO FINAL DE 14 DIAS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE DIFERENCIAÇÃO DE MÉDIAS DE SKOTT-KNOTT (p<0,05) .....	52
FIGURA 9. PERFIL CINÉTICO DOS GRUPOS DE LEVEDURAS FORMADOS PELO AGRUPAMENTO DE ACORDO COM SUA PERDA DE MASSA TOTAL AO FINAL DE 14 DIAS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE DIFERENCIAÇÃO DE MÉDIAS E AGRUPAMENTO DE SKOTT-KNOTT (p<0,05).....	53
FIGURA 10. GRÁFICO DE PERFIL AROMÁTICO DOS ISOLADOS QUE APRESENTARAM ATRIBUTOS DESEJADOS EM INTENSIDADE SUPERIOR À MÉDIA DAS LEVEDURAS COMERCIAIS .....	61
FIGURA 11. EFEITO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL EXÓGENO NA CONCENTRAÇÃO CELULAR E VIABILIDADE CELULAR NO TEMPO 0, 7 E 14 DIAS .....	65
FIGURA 12. IMAGEM DO GEL DE AGAROSE COM OS FRAGMENTOS PRODUTO DE PCR DA REGIÃO ITS DO rDNA .....	70
FIGURA 13. ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA PROXIMIDADE.....	71
FIGURA 14. PLACA DE PETRI COM AGAR MOSTO DE MAÇÃ COM RESULTADO PARA EXPRESSÃO DA ATIVIDADE <i>KILLER</i> .....	75
FIGURA 15. IMAGEM EM MICROSCÓPIO ÓTICO DAS CÉLULAS DO ISOLADO 173-2 ( <i>DIPODASCUS GEOTRICHUM</i> ) .....	77
FIGURA 16. IMAGENS DE MICROSCOPIA, AUMENTO DE 400X, DOS ISOLADOS <i>DIPODASCUS GEOTRICHUM</i> , <i>CANDIDA ZEYLANOIDES</i> E <i>SACCHAROMYCES BAYANUS</i> EM CULTURAS MISTAS E PURAS .....	82
FIGURA 17. GRÁFICOS DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE CARBOIDRATOS PELOS DIFERENTES ISOLADOS EM CULTIVO AGITADO E SOB CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO. A LETRA A APÓS A IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO INDICA CULTIVO AGITADO. A LETRA F INDICA CULTIVO FERMENTATIVO. COFERMENTAÇÃO (C) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DE AMBAS AS LEVEDURAS FOI REALIZADA SIMULTANEAMENTE. FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL (S) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DA CEPA COMERCIAL DE <i>S. BAYANUS</i> FOI REALIZADA 3 DIAS APÓS O INÍCIO DO CULTIVO. ....	109



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VELOCIDADE MÉDIA DE PRODUÇÃO DE GÁS, VIGOR FERMENTATIVO E VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO POR GRUPO DE ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DO AGRUPAMENTO GERADO PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E SEPARAÇÃO DE MÉDIAS E AGRUPAMENTO DE SKOTT-KNOTT ( $P < 0,05$ ) .....	55
TABELA 2. RESULTADO PARA PRODUÇÃO DE $H_2S$ DOS ISOLADOS EM MEIO LÍQUIDO. ...	57
TABELA 3. PERÍODO DE PRODUÇÃO DE $H_2S$ PELOS ISOLADOS DE LEVEDURA CLASSIFICADOS COMO POUCO PRODUTORES DO COMPOSTO.....	58
TABELA 4. AGRUPAMENTO CINÉTICO POR PERDA DE MASSA DOS DEMAIS ISOLADOS POR POSSUIR NULA OU BAIXA PRODUÇÃO DE $H_2S$ E/OU QUALIDADES AROMÁTICAS.....	63
TABELA 5. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA SELECIONADOS .....	72
TABELA 6. RESULTADO DO ENSAIO DE ATIVIDADE <i>KILLER</i> DOS ISOLADOS DE LEVEDURA.....	75
TABELA 7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FERMENTADOS DE MAÇÃ NO 14º DIA E AO FINAL DO ESTUDO (60 DIAS).....	79
TABELA 8. FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS DOS ISOLADOS DE LEVEDURA. A LETRA A APÓS A IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO INDICA CULTIVO AGITADO. A LETRA F INDICA CULTIVO FERMENTATIVO. COFERMENTAÇÃO (C) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DE AMBAS AS LEVEDURAS FOI REALIZADA SIMULTANEAMENTE. FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL (S) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DA CEPA COMERCIAL DE <i>S. BAYANUS</i> FOI REALIZADA 3 DIAS APÓS O INÍCIO DO CULTIVO .....	80
TABELA 9. EQUAÇÕES OBTIDAS PELA REGRESSÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS DE PRODUÇÃO DE GÁS. ....	106
TABELA 10. EQUAÇÕES OBTIDAS PELO AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO CELULAR. A LETRA A APÓS A IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO INDICA CULTIVO AGITADO. A LETRA F INDICA CULTIVO FERMENTATIVO. COFERMENTAÇÃO (C) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DE AMBAS AS LEVEDURAS FOI REALIZADA SIMULTANEAMENTE. FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL (S) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DA CEPA COMERCIAL DE <i>S. BAYANUS</i> FOI REALIZADA 3 DIAS APÓS O INÍCIO DO CULTIVO.....	121
TABELA 11. EQUAÇÕES OBTIDAS PELO AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS. A LETRA A APÓS A IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO INDICA CULTIVO AGITADO. A LETRA F INDICA CULTIVO FERMENTATIVO. COFERMENTAÇÃO (C) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DE AMBAS AS LEVEDURAS FOI REALIZADA SIMULTANEAMENTE. FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL (S) INDICA QUE A INOCULAÇÃO DA CEPA COMERCIAL DE <i>S. BAYANUS</i> FOI REALIZADA 3 DIAS APÓS O INÍCIO DO CULTIVO.....	122



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA DE ACORDO COM A CAPACIDADE FERMENTATIVA SEGUNDO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE DIFERENCIAÇÃO DE MÉDIAS (SKOTT-KNOTT) ( $p < 0,05$ ).....	105
---	-----



## **LISTA DE EQUAÇÕES**

EQUAÇÃO 1. REAÇÃO QUÍMICA PARA A FORMAÇÃO DE SULFETO DE CHUMBO.....38



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>26</b>
3.1	CULTURA DA MAÇÃ .....	26
3.1.1	<i>Distribuição da produção em Santa Catarina .....</i>	<i>26</i>
3.2	MAÇÃ COMO MATÉRIA-PRIMA .....	28
3.3	SIDRA .....	29
3.3.1	<i>Legislação brasileira .....</i>	<i>29</i>
3.3.2	<i>Mercado da sidra no Brasil .....</i>	<i>30</i>
3.4	SELEÇÃO DE LEVEDURAS .....	31
3.4.1	<i>Cinética de fermentação .....</i>	<i>32</i>
3.4.2	<i>Tolerância ao etanol.....</i>	<i>32</i>
3.4.3	<i>Temperatura de fermentação.....</i>	<i>34</i>
3.4.4	<i>Expressão de fenótipo killer.....</i>	<i>34</i>
3.4.5	<i>Sulfeto de hidrogênio .....</i>	<i>35</i>
3.5	EFEITO DAS LEVEDURAS NAS CARACTERÍSTICAS DE BEBIDAS FERMENTADAS .....	38
3.5.1	<i>Leveduras autóctones.....</i>	<i>40</i>
3.5.1.1	<i>Leveduras autóctones de maçãs.....</i>	<i>41</i>
3.5.2	<i>Fermentações mistas.....</i>	<i>42</i>
3.6	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS .....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS .....	45
4.2	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES .....	45
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS .....	46
4.4	TRIAGEM E SELEÇÃO DOS ISOLADOS .....	48
4.4.1	<i>Produção de sulfeto de hidrogênio .....</i>	<i>48</i>
4.4.2	<i>Análise olfativa .....</i>	<i>48</i>
4.4.3	<i>Capacidade fermentativa .....</i>	<i>49</i>
4.4.4	<i>Tolerância ao etanol e viabilidade celular em fermentações a 8 °C e 25 °C ...</i>	<i>50</i>
4.4.5	<i>Toxina killer.....</i>	<i>50</i>
4.4.6	<i>Cinética fermentativa.....</i>	<i>51</i>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1	CAPACIDADE FERMENTATIVA .....	52
5.2	PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO.....	56
5.3	ANÁLISE OLFATIVA.....	60
5.4	PERFIL CINÉTICO DOS ISOLADOS COM NULA OU BAIXA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S .....	62

5.5	TOLERÂNCIA AO ETANOL E VIABILIDADE CELULAR EM FERMENTAÇÕES A 8 °C E 25 °C .....	64
5.6	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS .....	70
5.7	PRODUÇÃO E SENSIBILIDADE À TOXINA KILLER .....	74
5.8	CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE SIDRA .....	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado de produtos industrializados, no Brasil, tem se demonstrado competitivo, principalmente no setor de bebidas alcoólicas com o surgimento de diversas novas marcas e produtos. Dentre esses novos nichos de consumo, encontram-se as bebidas alcoólicas artesanais ou *gourmet*, que nos anos recentes passaram a ocupar cada vez mais as prateleiras dos estabelecimentos comerciais e conquistando cada vez mais um consumidor exigente quanto à qualidade dos produtos. Porém, chegará um momento que o consumidor partirá em busca de novos produtos e sabores e, a indústria brasileira deverá estar preparada para tal desafio.

A sidra é um produto que está no mercado nacional, porém não durante o ano todo, além de ser um produto comparável à cerveja produzida em larga escala em relação à cerveja artesanal no que tange a qualidade, sendo consumida como um substituto mais barato do espumante para as festividades de fim de ano e, uma versão *gourmet* da sidra, poderia conquistar novos mercados e um consumidor ávido por novos produtos.

Antes de pensar no lançamento de um novo produto, é necessário saber quais as variáveis mais importantes a serem modificadas para que um produto existente de baixa qualidade possa se tornar um produto de alto valor agregado. A fermentação alcoólica é uma combinação de interações complexas envolvendo a variedade de mosto, micro-organismos e tecnologia de fermentação. Dentre as variáveis, a matéria-prima existente e disponível é a mesma e dificilmente será modificada, visto que nosso mercado é totalmente voltado para variedades de mesa. A tecnologia de fermentação pode ser modificada a fim de contemplar maior controle do processo, porém exige investimento em equipamentos e infraestrutura. Os micro-organismos utilizados são a variável mais simples, fácil e barata de ser modificada e também a mais importante. As leveduras são os micro-organismos responsáveis pelo processo de fermentação e que interferem nas propriedades sensoriais do produto.

No mercado estão disponíveis uma variedade de leveduras do gênero *Saccharomyces* capazes de sozinhas fermentar mostos, porém a obtenção de leveduras autóctones não-*Saccharomyces* oriundas da maleicultura com características desejadas ao processo fermentativo pode colaborar para a elaboração de uma sidra com características sensoriais diferenciadas e únicas ao Estado de Santa Catarina. A produção de sidra de qualidade superior, com leveduras nativas, pode agregar valor à uma matéria prima barata e abundante, proporcionando não somente ganho

direto com a comercialização do produto, como também ganhos indiretos pela geração de empregos e desenvolvimento do setor agroindustrial, além de contribuir como atrativo cultural típico destas regiões catarinenses, potencializando o turismo rural.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos e trata da prospecção de leveduras autóctones não-*Saccharomyces* com o objetivo de encontrar leveduras com potencial de produzir sidra com qualidade e perfil diferenciado dos existentes no mercado nacional. Para tal, isolados pertencentes à um conjunto de leveduras oriundas da maleicultura catarinense foram triados por meio de ensaios em escala laboratorial para diferentes atributos que possam influenciar na produção de sidra.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Selecionar, caracterizar e aplicar leveduras autóctones não-*Saccharomyces* da região produtora de maçãs no estado de Santa Catarina com potencial para produção de sidra, visando estimular a produção dessa bebida.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

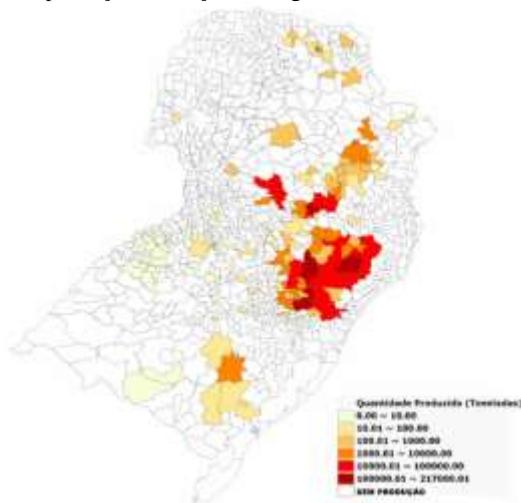
- a) Selecionar leveduras com potencial para produção de sidra a partir de testes bioquímicos e análise sensorial;
- b) Identificar os isolados selecionados para produção de sidra por meio de sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal (rDNA);
- c) Caracterizar cineticamente e físico-quimicamente os isolados selecionados;
- d) Aplicar os isolados na produção de sidra utilizando suco de maçã em fermentações simples e mistas;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CULTURA DA MAÇÃ

No Brasil, a maçã passou a ser cultivada em escala comercial a partir dos anos 1960 e ao longo das décadas de 70 e 80 houve grande aumento do consumo interno, e conseqüentemente, da produção, mas foi somente no final da década de 80 que o país tornou-se exportador (MAIA; ROITMAN, 2010; BRDE, 2011). Apesar de ser uma atividade relativamente recente no país, ela apresenta-se, porém, como importante componente da renda agrícola nos estados do Sul (BRAGA et al., 2001), principalmente nas regiões serranas de Santa Catarina e Rio Grande do Sul como pode ser visualizada na figura 1.

Figura 1. Distribuição da produção de maçãs na Região Sul do Brasil.



Fonte: BRDE, 2011.

##### 3.1.1 Distribuição da produção em Santa Catarina

Na safra de 2017, a produção de maçãs no Brasil atingiu, segundo dados do IBGE, aproximadamente 1,1 milhões de toneladas, com área colhida de 35 mil hectares e rendimento médio de 33 toneladas por hectare. Nessa safra o estado de Santa Catarina teve uma queda de 3,3 % em sua produção, fazendo com que perdesse a liderança da produção nacional. Santa Catarina foi responsável por 53 % da produção, com 612

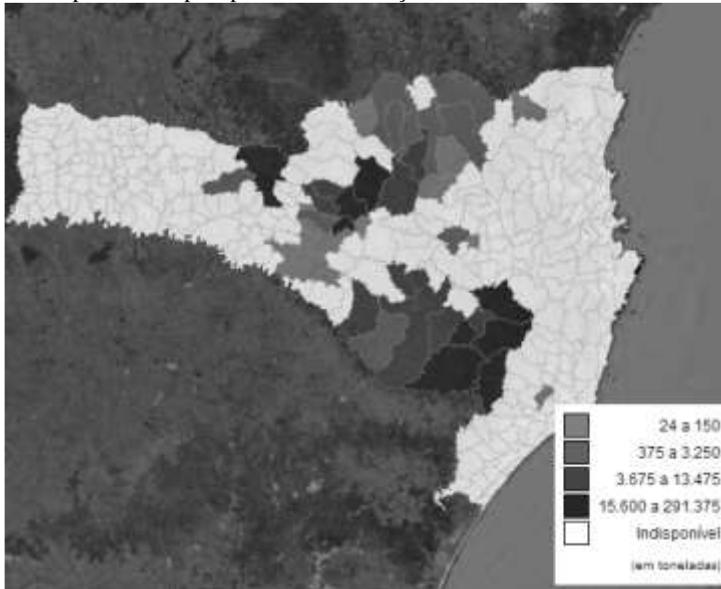
mil toneladas, enquanto o Rio Grande do Sul responsável por 42 % da produção, com 481 mil toneladas.

Nas regiões produtoras em Santa Catarina são aproximadamente 2.300 pomicultores gerando cerca de 100 mil empregos diretos e indiretos ao longo da cadeia produtiva em 35 municípios, dentre eles destacam-se os municípios de Fraiburgo, no Meio Oeste, e São Joaquim, no Planalto Serrano (Figura 2). A região Meio Oeste catarinense é caracterizada pelo clima frio, terrenos planos que favorecem a mecanização e a presença de grandes empresas que possuem estruturas de processamento e armazenagem modernas. A região Serrana, por sua vez, tem como principais características a produção realizada por pequenos produtores, geralmente unidos em cooperativas de modo a viabilizar as estruturas de processamento e armazenagem da fruta. O clima é mais frio que na região Meio Oeste e os terrenos são em declive e pedregosos, constituindo-se empecilhos à mecanização da produção (BRDE, 2011; EPAGRI, 2010; RECH et al., 2014).

A distribuição da produção de acordo com os principais municípios produtores de maçã em Santa Catarina aponta o município de Fraiburgo como responsável por cerca de 39 % da produção de maçãs em Santa Catarina, o que caracteriza a região (apenas três municípios) como a maior produtora, com 53 % da produção do estado. Na região de São Joaquim, encontra-se o segundo polo produtor, representando cerca de 34 % da produção estadual. Na primeira região, a produção de maçãs está geograficamente mais concentrada no município de Fraiburgo, na segunda, a produção é mais dispersa, envolvendo um número maior de municípios (RECH et al., 2014).

Quanto às variedades utilizadas nos sistemas produtivos, na região de Fraiburgo a mais cultivada é a Gala, enquanto que em São Joaquim, predomina a Fuji (PEREIRA et al., 2010). Juntas, as variedades Fuji e Gala compõem mais de 90 % da produção brasileira (KVITSCHAL; DENARDI, 2014). Woziacki et al. (2008) descrevem maçãs Fuji como frutos de aroma e sabor doce, textura crocante, polpa suculenta, além de suportar longos períodos de estocagem, e a cultivar Gala com aroma e sabor doce também, mas de coloração de casca uniforme e atrativa. Quanto às características físico-químicas a variedade Fuji apresenta maior teor de sólidos solúveis, açúcar redutor total e de glicose que a variedade Gala. Em contrapartida, maçãs Gala possuem maior acidez titulável, o que leva a uma menor relação açúcar/acidez e consequente maior sensação de sabor ácido.

Figura 2. Principais municípios produtores de maçã em Santa Catarina.



Fonte: RECH et al., 2014.

### 3.2 MAÇÃ COMO MATÉRIA-PRIMA

Ao contrário de países como França, Inglaterra e Espanha, onde existem variedades de maçãs específicas para a produção de sidra, no Brasil, 100 % das maçãs são produzidas com objetivo de atingir o mercado *in natura* (ABPM, 2017; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Assim, não há produção específica para a indústria de processamento. O que destinado ao processamento é a fração da produção que não pode ser aproveitada para consumo *in natura*, ou seja, aquilo que por padrão de classificação (coloração, tamanho e formato adequados e boa aparência) não é possível ser aproveitada para o mercado de fruta fresca. Essa fração pode atingir até 35 % da produção brasileira, dependendo do ano, especialmente em função da extensão e época em que ocorrem eventos naturais como as chuvas de granizo (ABPM, 2017), sendo que boa parte dos frutos rejeitados para consumo *in natura* ainda são adequados para o processamento pois a composição físico-química das frutas descartadas nas etapas de seleção e classificação que apresentam deformidades, tamanhos impróprios, cicatrizes ou manchas, é praticamente a mesma das maçãs comercializadas (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012), e são comercializadas a preços meramente simbólicos (R\$ 0,08 a 0,15 por

quilo). A maior parte dessas frutas vai para a produção de suco concentrado, uma parte menor vai para sidra e desidratados. No entanto, não há um levantamento em relação ao destino da fruta (ABPM, 2017). Além das frutas descartadas durante o processo de classificação, outro fator que favorece o processamento se deve à incapacidade de estocar a totalidade da safra em câmaras frigoríficas, resultando em maior sazonalidade e menor preço de venda do produto *in natura* para empresas de beneficiamento em outros estados, uma vez que somente 2/3 da safra pode ser estocada em câmaras frigoríficas (BITTENCOURT et al., 2011).

### 3.3 SIDRA

Sidra, *cider*, *cidre*, *apfelwein*, *cidra*, são termos utilizados em alguns idiomas para definir a bebida alcoólica fermentada de maçãs. É uma bebida produzida em diversos países, incluindo França, Espanha, Brasil, Irlanda, Alemanha, Suíça, África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido. Esse último destaca-se como o maior produtor mundial da bebida, com cerca de 500 milhões de litros por ano. A produção na França, aproximadamente 115 milhões de litros, está concentrada nas regiões da Normandia e Bretanha enquanto na Espanha está concentrada nas Astúrias, com cerca de 70 milhões de litros (LEA; DRILLEAU, 2003).

As sidras produzidas em cada um desses países são bastante diferentes entre si, assim como também são diferentes as leis e os métodos de produção. A sidra francesa é caracterizada por ser uma bebida carbonatada de cor viva, baixo teor alcoólico, residual de açúcares não fermentados, paladar tânico e aromas que lembram maçã. A sidra alemã apresenta teor alcoólico mais elevado, paladar seco pela fermentação total dos açúcares se comparado com o produto francês ou espanhol. A sidra espanhola é caracterizada pela alta acidez volátil, aroma e sabor acético e pela formação de espuma quando servida. A sidra inglesa é um produto límpido e carbonatado que apresenta aromas suaves, teores alcoólicos entre 1,2 e 8,5 % e dulçor provenientes da adição de açúcares (LEA, 2011; LEA; DRILLEAU, 2003, NOGUEIRA; WOZIACKI, 2012).

#### 3.3.1 Legislação brasileira

De acordo com a legislação brasileira vigente, decreto 6871-09, sidra é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 8 % em volume, a 20 °C, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água. A

sidra poderá ser gaseificada, desalcoolizada ou adicionada de açúcares, somente para adoçamento, e de outros aditivos. A acidez total, expressa em ácido málico, deverá possuir um valor mínimo de três gramas por litro e um valor máximo de oito gramas por litro. A acidez volátil, expressa em ácido acético, deverá possuir um valor máximo de um grama e meio por litro. O extrato seco reduzido deverá possuir um valor mínimo de quinze gramas por litro. O teor de cinzas não deverá ser inferior a um grama e meio por litro (BRASIL, 2008).

### 3.3.2 Mercado da sidra no Brasil

No Brasil, o produto apareceu na primeira metade do século XX, sendo com sabor suave, pouco aromático, com baixa acidez e teor alcoólico e tem sido elaborada da mesma forma desde a década de 70, momento em que foi estilizada para ser semelhante ao vinho branco frisante ou espumante (NOGUEIRA et al., 2003). Normalmente, a indústria nacional elabora esse produto adicionando açúcar e gás carbônico, o que faz com que o mesmo apresente características bem diferentes das bebidas europeias, as quais são produzidas com cultivares de maçãs exclusivas para indústria, com características específicas de acidez e adstringência, atributos que contribuem com o “corpo” da bebida e garantem sua qualidade final (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

O volume de sidra produzido é pequeno e seu consumo se dá majoritariamente nas épocas festivas do Natal e Ano Novo, não existindo a cultura de um consumo ao longo do ano em nenhuma região do país. O mercado da sidra brasileira gira em torno dos 12 milhões de litros anuais, quantidade pequena se comparada com os mais de 13 bilhões de litro anuais da cerveja. O mercado de vinhos e espumantes está em constante crescimento desde o início do novo milênio, com mercado de aproximadamente 300 milhões de litros e 4,5 milhões de litros, respectivamente. A sidra possui uma participação de 3,5 % do mercado de bebidas, excluindo-se a cerveja e a cachaça, enquanto vinhos e espumantes participam com 23,1 % desse mercado (ABRABE, 2017).

Nogueira et al. (2003), em estudo sobre a sidra brasileira concluiu que o produto apresenta características de bebidas leves, com baixo teor alcoólico, ausência de aromas frutados e notas de produto fermentado. Ainda segundo o mesmo estudo, o consumidor brasileiro tende a preferir uma sidra de tonalidade mais escura e doce, além de alta carbonatação.

Para promoção do consumo de sidra, uma estratégia efetiva foi implementada em Somerset, Inglaterra, onde a produção de sidra é feita por pequenos produtores artesanais e ela baseia-se no turismo rural de

experiência, onde o visitante pode caminhar pelos pomares, ter contato com a planta e o fruto, vivenciar a colheita e os procedimentos para o preparo da bebida, estreitando assim a relação entre a matéria-prima e o produto final. Ela se mantém como uma atividade turística mesmo em épocas fora da temporada de colheita e produção de sidra. Essa cultura se estabeleceu pela iniciativa do governo inglês de associar gastronomia, turismo e o campo, promovendo a indústria local (SHARPIES, 2003). Estratégia semelhante já está implementada nos estados do Sul do Brasil para a cerveja artesanal (Santa Catarina) e o vinho (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (SANTUR, 2015; SETEL, 2015) e pode vir a ser aplicada também à maleicultura. Paralelamente à promoção do consumo através de estratégias de *marketing* e turismo, existe a possibilidade de divulgação da sidra, em uma versão *gourmet*, seguindo o caminho aberto pela produção de cerveja artesanal domiciliar por microprodutores caseiros que desenvolvem essa atividade como *hobby*.

### 3.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Para a seleção de leveduras torna-se essencial estabelecer as propriedades de interesse. A seleção de cepas para produção de bebidas fermentadas ocorre em função de seu efeito nas características organolépticas do produto final e em sua habilidade de conduzir a fermentação. Se o objetivo da seleção são culturas iniciadoras, as cepas selecionadas deverão apresentar propriedades fermentativas, tecnológicas e metabólicas adequadas e desejáveis, como por exemplo: rápida iniciação do processo fermentativo, alta tolerância a etanol, osmotolerância, baixa produção de biomassa, alta estabilidade genética, baixa formação de espuma, pouca produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), produção de aromas, entre outros, mas também permitir um maior controle do processo através de produção uniforme com alta qualidade mesmo em processos sucessivos e diferentes safras (DURIEUX et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2011, PRETORIUS, 2000).

A seleção de novas cepas de leveduras inicia-se com o isolamento das mesmas a partir do ambiente natural (frutas, tanques de fermentação, solo, mosto), o que normalmente gera um grande número de isolados. Do ponto de vista econômico e organizacional é recomendado a utilização de métodos rápidos e de fácil interpretação para reduzir o número de cepas de interesse nas etapas seguintes (GONZÁLEZ et al., 2011).

Um dos critérios que podem ser utilizados para a seleção de leveduras é baseado no seu poder fermentativo, ou seja, sua capacidade de rapidamente iniciar a fermentação combinada com alta velocidade

fermentativa e completo consumo dos açúcares, uma vez que o intuito inicial ao se inocular leveduras selecionadas é acelerar e também prevenir paradas durante o processo. A adição de leveduras permite a obtenção de produtos padronizados e de qualidade apropriada ano a ano, sem contaminação por microrganismos indesejados.

O baixo pH do suco de maçã (entre 3,4 e 3,8) tem efeito significativo nas fermentações devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto sobre o crescimento das leveduras, nas velocidades de fermentação, produção de etanol, formação de subprodutos (DORTA, 2006).

Além das propriedades citadas, muitos critérios de seleção baseiam-se no efeito positivo ou negativo da cepa nas qualidades sensoriais do produto, uma vez que o metabolismo das leveduras tem grande contribuição para o aroma final do produto.

#### 3.4.1 Cinética de fermentação

A capacidade da levedura de fermentar, sua velocidade de fermentação, consumo dos açúcares e produção de etanol podem ser determinados ao se fazer o acompanhamento e evolução dos valores de concentração dos componentes (microrganismo, substrato, produto) do sistema de cultivo em função do tempo de processo (HISS, 2001). Esse acompanhamento permite que sejam verificadas as características de uma cepa de levedura quanto ao seu comportamento durante o processo.

#### 3.4.2 Tolerância ao etanol

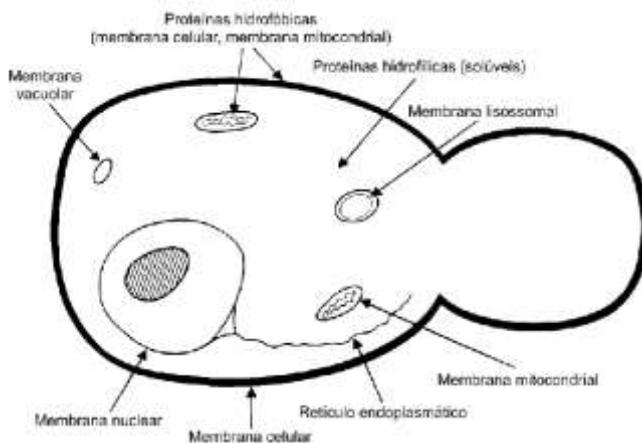
O etanol é o principal produto resultante do processo de fermentação de açúcares por leveduras, mas é também, a partir de determinada concentração, um produto bastante tóxico tanto para as próprias leveduras quanto para outros micro-organismos. Algumas cepas de leveduras apresentam atividade biológica em concentração de etanol próxima de 30 % (v/v), outras já apresentam toxidez com 2 % (v/v). A inibição do crescimento e a diminuição da viabilidade celular de leveduras aumentam conforme aumenta a concentração de etanol no meio. A ação do etanol nas células tem profundo efeito em todos os aspectos do metabolismo e ocorre desde a integridade e permeabilidade da membrana plasmática das células e em membranas de organelas celulares (figura 3) ao provocar a dispersão de coenzimas e cofatores essenciais para a atividade glicolítica, bem como inibição e desnaturação de proteínas e enzimas responsáveis pelo transporte de nutrientes para o

interior da célula, além de, em altas concentrações, causar desnaturação de enzimas e perda de nucleotídeos (BAUER; PRETORIUS, 2000; D'AMORE et al., 1990; MA; LIU, 2010).

Ma e Liu (2010) e Stanley e colaboradores (2010) ao estudarem leveduras tolerantes ao stress, concluíram que leveduras são capazes de se adaptar e aumentar sua resistência. Diversos genes estão relacionados com a tolerância ao etanol em leveduras, e interagem de forma complexa em nível genômico. Os mecanismos de tolerância só podem ser entendidos se vistos de forma mais ampla, em conjunto com outras formas de resposta ao stress. A eficiência desses mecanismos como resposta à presença do etanol no ambiente fermentativo é o que irá determinar sua habilidade e robustez para a utilização industrial.

Existem inúmeros fatores ambientais que agem em sinergia com o álcool para inibir o crescimento das leveduras, incluindo baixo pH, alta temperatura, acidez acética, ácidos graxos de cadeia curta, esgotamento de nitrogênio assimilável, e deficiência de vitaminas.

Figura 3. Possíveis sítios de ação do etanol na célula de levedura



Fonte: D'AMORE et al., 1990

A definição de tolerância da levedura ao stress pode ser visto como o resultado de um processo de interação ao estímulo ao longo do tempo, existem porém, diferentes formas para definir a tolerância ao etanol, mas nenhuma é universalmente aceita. O etanol tem três principais efeitos na célula de leveduras: inibição do crescimento celular, diminuição da viabilidade celular e inibição da fermentação, dessa forma a definição de

tolerância ao etanol dependerá do(s) parâmetro(s) que serão utilizados para a avaliação.

### 3.4.3 Temperatura de fermentação

Durante o processo fermentativo as células liberam energia na forma de calor, e a alteração na temperatura é vista como uma fonte de estresse celular. Leveduras utilizadas em fermentações são mais sensíveis à alterações na temperatura por estarem sempre em condições não ótimas de crescimento, principalmente nos momentos finais do processo quando boa parte dos nutrientes já foram exauridos e há maior concentração alcoólica. A resposta celular das leveduras à mudança de temperatura é bastante similar à resposta ao etanol.

Atualmente, boa parte dos vinhos brancos e sidras são fermentados em temperaturas mais amenas (10-15 °C) porém longe da temperatura ideal de crescimento para a quase totalidade das leveduras (25-30 °C). A utilização de temperaturas de fermentação baixas acarretam em redução da velocidade de fermentação e, em consequência, há aumento do tempo de processo. Em contrapartida, resultam em produtos com maior produção e concentração de constituintes aromáticos e diminuição de acetaldeído, precursor tóxico do etanol (LLARAUDÓ et al., 2002; TORIJA et al., 2003). Temperaturas mais baixas também podem favorecer uma maior viabilidade celular e consequente permanência no meio fermentativo de leveduras não-*Saccharomyces* (CIANI, COMITINI, 2006; WILLIAMS et al., 2015).

### 3.4.4 Expressão de fenótipo *killer*

O fenótipo *killer* foi observado pela primeira vez por Bevan e Makower (1963), quando propuseram que as leveduras podiam ser classificadas em: *killer*, sensível e neutro. As linhagens *killer* produzem a toxina *killer* e matam células sensíveis quando crescidas no mesmo meio de cultura. As linhagens neutras são insensíveis a uma ou mais linhagens *killer*, bem como não matam células sensíveis. As linhagens sensíveis são totalmente suscetíveis à essas toxinas.

A produção da toxina por uma levedura confere uma grande vantagem competitiva do micro-organismo produtor em relação às leveduras sensíveis e, quando presentes em condições industriais na condição de contaminante, pode vir a suplantá-lo e alterar as propriedades do produto final. A atividade dessa toxina está diretamente relacionada com o pH do meio (FUENTEFRÍA, 2006).

A condição do pH do meio durante a fermentação possui efeito na expressão e atividade de toxinas *killer*, que são proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molar produzidas por algumas cepas de leveduras e atuam sobre as células de micro-organismos sensíveis, inibindo a síntese de macromoléculas, provocando o rompimento celular e consequente morte. A atividade *killer* é expressa, se mantendo estável e ativa geralmente sob condições ácidas (pH <5) e temperaturas abaixo de 40 °C (LIU et al., 2013).

As primeiras observações dessa característica ocorreram em *Saccharomyces cerevisiae*, contudo diversas outras espécies de diferentes gêneros também podem apresentar o fenótipo, como *Kluyveromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis*, entre outros. Além da grande variedade de gêneros de levedura onde o fenômeno ocorre, variados são também os micro-organismos que podem ser afetados pela atividade *killer*, abrangendo desde leveduras a outros eucariotos e até mesmo micro-organismos procariotos (LIU et al., 2013; MAGLIANI et al., 1997).

A fim de obter produtos menos suscetíveis à contaminações, é grande o emprego de cepas iniciadoras *killer* em ambientes fermentativos industriais, podendo chegar a quase 90 % dos isolados nesse tipo de ambiente e, uma vez que essa toxina confere uma grande vantagem competitiva do micro-organismo produtor em relação aos micro-organismos sensíveis, é desejável que, durante a seleção de novas cepas iniciadoras, mistura de cepas para cofermentação ou inoculação sequencial, sejam verificados e selecionados os isolados *killer* ou que apresentem resistência a essa toxina, mas nunca suscetibilidade (MAGLIANI et al., 1997).

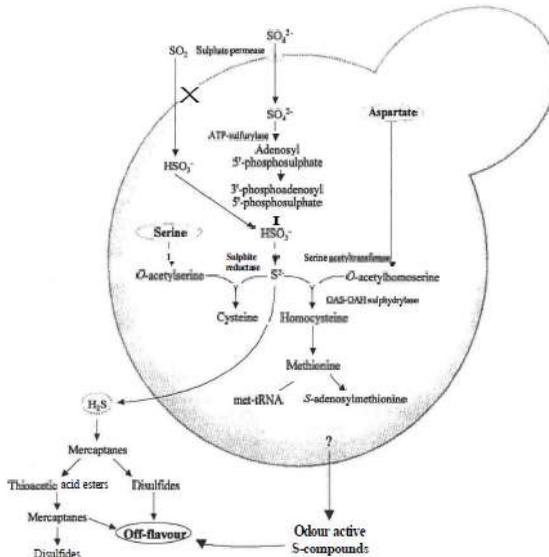
#### 3.4.5 Sulfeto de hidrogênio

Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um tiol altamente volátil produzido pelo metabolismo da levedura durante o início e meio do processo fermentativo com a redução de sulfato ou sulfito, que serve de intermediário para a biossíntese de todos os compostos sulfurados, incluindo os aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) (Figura 4). Esse composto possui limiar de detecção olfativo bastante baixo (1,6 µg L<sup>-1</sup>) sendo comumente descrito como odor de esgoto, putrefação e/ou ovo podre (BELL; HENSCHKE, 2005; LINDERHOLM et al., 2008; RAUHUT, 1993; UGLIANO et al., 2011).

A produção de H<sub>2</sub>S está diretamente relacionada com a demanda da levedura por aminoácidos sulfurados e ausência de nitrogênio

prontamente assimilável em presença de sulfito, o que desencadeia o processo. Essa produção pode ser aumentada caso a fermentação ocorra em temperaturas elevadas, maiores valores de pH e em mostos com maior teor de sólidos (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Figura 4. Representação dos mecanismos de formação de compostos aromáticos sulfurados.



Fonte: LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000.

O nível de produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , bem como o período em que o composto é produzido é altamente dependente do isolado de levedura e do meio onde é cultivado. Independente da origem do isolado, ao estudá-los em diferentes meios de cultivo e mostos durante diferentes safras, estudos inferem que não há cepa que apresente constantemente a nula ou baixa capacidade de produção de sulfeto nas diferentes condições fermentativas, tornando a cepa de levedura o fator mais importante para a produção de  $\text{H}_2\text{S}$  (MENDES-FERREIRA et al., 2002, 2009; SEA et al., 1998; SPIROPOULOS et al., 2000;). Mesmo sendo importante, outros fatores não podem ser negligenciados, pois a rota metabólica de regulação da produção de compostos sulfurados, bem como o metabolismo de nitrogênio é altamente complexo.

Estudos indicam que a produção dependente da cepa ocorre nos primeiros dias (período I), em decorrência de deficiências nutricionais

durante o crescimento celular e apresenta boa resposta à adição de nutrientes, enquanto a produção dependente do meio ocorre no período final da fermentação (período II), onde a maior parte do composto é produzida próximo ao período de exaustão dos açúcares e não está relacionada com o crescimento (SCHUTZ; KUNKEE, 1977; THOMAS et al., 1993; SEA et al., 1998). Estudo de Ugliano e colaboradores (2011) reportam ainda que a adição de nutrientes em mostos com baixa concentração de nitrogênio pode resultar em aumento na produção de  $H_2S$ .

O  $H_2S$  produzido durante o período I pode ser facilmente carregado para fora do líquido juntamente com o  $CO_2$  produzido durante a fermentação pela sua baixa solubilidade em solução aquosa caso a cepa apresente alta capacidade fermentativa. Já o  $H_2S$  produzido no período II pode vir a apresentar problemas, pois a sua produção ocorre no período de menor atividade fermentativa e maior presença de etanol no meio, resultando em menor perda por arraste, além de maior solubilidade do composto em soluções alcoólicas (UGLIANO et al., 2009).

O sulfito não incorporado é convertido pelas leveduras em cisteína e metionina, e são transformados em  $H_2S$  e liberados no meio em uma reação dependente do pH, que, nas condições fermentativas por haver maior disponibilidade de íons de hidrogênio, favorece a reação de formação do gás (LINDERHOLM; BISSON, 2005)

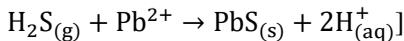
A habilidade da levedura em formar  $H_2S$  tem grande importância comercial. Giudici e Kunkee (1994) concluíram que a linhagem da levedura está intimamente ligada à quantidade do composto produzido, onde linhagens sem ou com baixa atividade sulfito redutase não produziram quantidades detectáveis.

A remoção do  $H_2S$  é complicada e problemática, envolvendo o uso de cobre na clarificação do produto final, o que pode levar a remoção de compostos desejados juntamente com o  $H_2S$ , formação de outros indesejados bastante estáveis, além de requerer etapas adicionais no processamento e, por isso, é importante que na elaboração da sidra sejam utilizadas linhagens com capacidade de efetuar uma rápida combinação do  $H_2S$  formado com precursores nitrogenados ou com deficiência na atividade da enzima sulfito redutase (da SILVA; da SILVA, 1987; HERDERICH et al., 2011).

A detecção da produção de  $H_2S$  pelas leveduras é uma metodologia rápida para a seleção de leveduras, haja visto que cepas diferentes variam amplamente a capacidade de produção do composto (STRAUSS et al., 2001). Do ponto de vista comercial, a disponibilidade de cepas que não produzem esse defeito sensorial é altamente desejado.

Uma das técnicas disponíveis que podem ser utilizadas para a detecção deste composto baseia-se na reação química entre o sulfeto de hidrogênio, carregado juntamente com o CO<sub>2</sub> para fora do meio de cultura, com o chumbo e formação de precipitado escuro (equação 1).

Equação 1. Reação química para a formação de sulfeto de chumbo



### 3.5 EFEITO DAS LEVEDURAS NAS CARACTERÍSTICAS DE BEBIDAS FERMENTADAS

A produção industrial de bebidas fermentadas sofre efeito de um complexo conjunto de fatores abióticos (pressão osmótica, pH, etanol, temperatura, etc.) e fatores bióticos (espécie de microrganismo, fatores *killer*, variedade de mosto, etc).

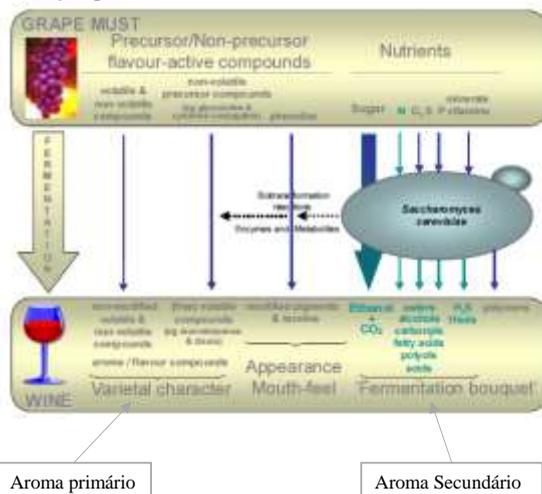
Dentre os fatores bióticos, as leveduras são responsáveis pelo processo de fermentação, durante o qual produzem diversos metabólitos secundários (glicerol, acetato, succinato, piruvato, alcoóis superiores e ésteres) que contribuem para as propriedades sensoriais dos produtos (SALVADÓ et al., 2011).

A aceitação e consolidação de bebida alcoólica fermentada estão diretamente relacionadas ao seu sabor. O sabor, por sua vez, é a resposta integrada ao gosto (doce, salgado, amargo, ácido) e ao aroma, dada pela presença de numerosos compostos voláteis. Segundo Rapp e Mandery (1986), o aroma é uma das características organolépticas que determinam a qualidade de uma bebida, sendo composta de centenas de compostos diferentes em concentrações desde 10<sup>-4</sup> até 10<sup>-13</sup> ppm. O olfato, juntamente com o sabor, constituem os principais atributos sensoriais percebidos durante a avaliação de uma bebida. Desses, o olfato é percebido antes do sabor pelo consumidor e por isso torna-se importante ter conhecimento sobre as características aromáticas dos fermentados produzidos, da forma como é percebida pelo ser humano. Assim, o aroma das bebidas constitui um dos principais impulsionadores da aceitação de um produto pelos consumidores e sua caracterização representa um grande desafio para a indústria.

Em bebidas alcoólicas alguns desses compostos tem origem no próprio fruto (aroma primário ou varietal) enquanto outros, no decorrer do processo fermentativo (aroma secundário ou fermentativo) (figura 5) e de reações químicas durante o envelhecimento (aroma terciário ou *bouquet*) (BELL; HENSCHKE, 2005). As leveduras podem

influenciar/alterar todos os três grupos de aromas. O aroma primário é influenciado quando ocorre a hidrólise de compostos originários da matéria prima em compostos voláteis pela ação de enzimas secretadas pelas leveduras. O aroma secundário surge como parte da fermentação alcoólica e é determinado pelo metabolismo da levedura. O *bouquet* pode sofrer alterações quando ocorre a hidrólise da borras de levedura pela ação de enzimas secretadas durante o processo fermentativo ou de envelhecimento. Comitini e colaboradores (2017), em um trabalho de revisão, relatam a existência de diferenças entre a utilização de leveduras autóctones selecionadas e comerciais nos parâmetros de qualidade e de aroma, resultando em aromas mais complexos e típicos de cada região quando usadas leveduras autóctones.

Figura 5. Representação da biotransformação de compostos do mosto em compostos do vinho pela fermentação por leveduras.



Fonte: BELL; HENSCHKE, 2005.

Os compostos voláteis formados durante a fermentação, principalmente pelo metabolismo da levedura, afetam as características organolépticas da sidra (HERRERO et al., 2006). Acetatos e ésteres etílicos, álcoois superiores, ácidos graxos, cetonas e aldeídos formam a principal porção dos compostos aromáticos produzidos durante a fermentação (MALLOUCHOS et al., 2003).

### 3.5.1 Leveduras autóctones

A fermentação espontânea apresenta como vantagens produtos com diversidade e complexidade de aromas, a sutileza e o caráter regional, além de uma característica única a cada safra, promovendo diferenciação e aumento do valor comercial, porém a dependência de fatores naturais traz menor previsibilidade do processo, como lentidão ou mesmo paradas de fermentação, além de inconsistências na qualidade do produto como produção excessiva de ácidos voláteis. O perfil organoléptico da sidra nesse caso é muito variável e depende de fatores como da população relativa de cada espécie microbiana associada à fruta e aos equipamentos, das condições de colheita da maçã, do pré-tratamento e da temperatura do suco no início da fermentação (FLEET et al., 1984; FLEET, 2008). Essa imprevisibilidade no processo fermentativo levou as indústrias a utilizarem leveduras comerciais puras e selecionadas. Essas culturas asseguram a fermentação desde o seu início. Sua adoção e difusão devem-se ao fato de ser prática, segura e cômoda, além de ser uma estratégia para manter a qualidade e produção de bebidas fermentadas ao longo de diferentes safras. A fim de obter bebidas com características regionais típicas que possam ser reproduzidas industrialmente em diferentes safras faz-se necessário acrescentar as qualidades da fermentação espontânea sem os riscos associados à prática. Nesse sentido tem sido proposto o uso de leveduras autóctones isoladas de regiões produtoras da bebida, uma vez que a diversidade microbiana é característica de cada local e ela afeta as características organolépticas do produto (COMITINI et al., 2011; COMITINI et al., 2017; SCHVARCZOVÁ et al., 2017).

Fermentações, inoculadas ou não, são ecologicamente complexas e não envolvem apenas o crescimento de leveduras, mas também o desenvolvimento sucessivo de diferentes micro-organismos durante o processo fermentativo, incluindo leveduras oxidativas e fermentativas, bactérias produtoras de ácido lático e bactérias acéticas.

Dentre as leveduras que compõem o mosto estão uma grande variedade de espécies dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Kluyvomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulasporea*, *Dekkera* e *Schizosaccharomyces*, espécies estas conhecidas coletivamente como não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*. Essas leveduras são oriundas da microbiota do fruto e da microbiota do ambiente. É de conhecimento que muitas dessas espécies não-*Saccharomyces* iniciam a fermentação alcoólica espontânea do suco e seu crescimento limita-se até o segundo

ou terceiro dia quando começam a morrer pela ação tóxica do etanol e são suplantadas pelo crescimento de leveduras *Saccharomyces* que dominam o processo até o final, frequentemente sendo a única espécie encontrada nessas fases (BOKULICH et al., 2012, FLEET, 2008, GRAÇA et al., 2015, MANZANARES et al., 2011; VALLES et al., 2007).

A presença de leveduras autóctones no mosto tende a melhorar as propriedades organolépticas e sensoriais do produto fermentado. Leveduras principalmente não-*Saccharomyces*, pela maior produção de enzimas, podem contribuir para melhorar etapas do processo fermentativo (maceração, filtração, clarificação, envelhecimento), aumento de rendimento e extração de cor, e melhorar características do produto, especialmente o aroma pela produção de álcoois, ésteres, aldeídos e ácidos (HEARD, 1999). Manzanares e colaboradores (2011) ressaltam que leveduras não-*Saccharomyces* podem ser utilizadas como componentes estratégicos para a obtenção de diferentes tipos de vinho, principalmente no que tange aromas.

Heard (1999) estudou o efeito de diferentes espécies de leveduras na composição química de fermentado e encontrou que algumas espécies eram capazes de contribuir positivamente para as características sensoriais. Espécies como *C. stellata* e *K. apiculata* contribuem com a produção de glicerol. *Candida colliculosa* tem importância na produção de acetaldeído e propanol. Nogueira e Wosiacki (2012) indicam a participação de leveduras das espécies *Metschnikowia pilcherrima* e *H. valbyensis* como participantes do processo de clarificação do mosto por flotação através da liberação de gás carbônico e algumas cepas de *Hanseniaspora* contribuindo para a composição de aroma frutado e produção de ésteres como acetato de etila e fenil-etil. Em um estudo de revisão, Manzanares e colaboradores (2011) indicam a participação de leveduras não-*Saccharomyces* na produção e excreção para o meio de enzimas pectolíticas (*Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*), proteolíticas (*Kluyveromyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*), celulolíticas e hemicelulolíticas (*Candida*, *Cryptococcus*) que podem contribuir para melhor extração de pigmentos e aroma e redução de turbidez.

### 3.5.1.1 Leveduras autóctones de maçãs

Dentre as leveduras comumente associadas a maçãs ou de origem relacionadas à maleicultura estão *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *Aureobasidium pululans*, *H. uvarum*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus*

*flavescens*, *Pichia guilliermondii*, *P. kluyveri*, diversas espécies de *Candida*, *Meyerozyma caribbica*, *M. guilliermondii*. Leveduras do gênero *Saccharomyces* geralmente são encontrados apenas quando o isolamento das mesmas é realizado em ambiente onde ocorre fermentação, como dornas e cavas ou quando o isolamento ocorre após inoculação em caldo nutritivo (GRAÇA et al., 2015; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; PELLICCIA et al., 2011; VALLES et al., 2007; VAUGHAN-MARTINI, MARTINI, 1995; WEI et al., 2017).

### 3.5.2 Fermentações mistas

As vantagens e desvantagens de fermentações realizadas por cepas puras de micro-organismos e pela microbiota selvagem têm sido debatidas desde meados de 1950, quando foi sugerido o uso de *Torulospora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* em vinhos para a redução de ácido acético (CASTELLI, 1955).

A interação entre leveduras ocorre inicialmente com o consumo do oxigênio disponível, de nutrientes e produção de metabólitos por parte de leveduras oxidativas. Com o crescimento das leveduras com alta capacidade fermentativa o efeito tóxico do etanol torna-se presente e o dióxido de carbono produzido expurga o oxigênio, limitando o crescimento das espécies oxidativas. Há ainda a possibilidade de algumas espécies produzirem compostos protéicos que lisam a parede celular de outras espécies. A morte e lise de células libera aminoácidos e vitaminas que podem servir de substrato para espécies de crescimento tardio (FLEET, 2003).

Em fermentações espontâneas ou inoculadas, leveduras não-*Saccharomyces* apresentam crescimento quantitativamente significativo e influenciam na composição química do fermentado. Essas leveduras geralmente não são capazes de exaurir totalmente os açúcares presentes nos mostos, por esse motivo, geralmente são aplicadas em fermentações mistas. Existem basicamente duas formas de trabalho com fermentações mistas inoculadas: i) co-inoculação; ii) inoculação sequencial.

A co-inoculação trata-se da inoculação concomitante das cepas no meio de cultivo, enquanto a inoculação sequencial de leveduras, com inoculação inicial de cepa(s) de leveduras não-*Saccharomyces* seguida de inoculação da cepa de *Saccharomyces*. A inoculação sequencial pode ser usada para melhorar a qualidade e aumentar a complexidade aromática do produto. Essa técnica permite que as leveduras inicialmente inoculadas metabolizem uma parte dos açúcares e demais nutrientes sem sofrer o efeito da cepa de *Saccharomyces*, geralmente mais competitiva e com

capacidade metabólica superior (CIANI et al., 2014). Na co-inoculação pode ser trabalhado apenas a razão entre a concentração das cepas enquanto que na inoculação sequencial também pode ser trabalhado o tempo entre as inoculações.

Na inoculação sequencial, para que as características das leveduras do primeiro inóculo possam ser notadas, deve-se levar em consideração a concentração do inóculo e o tempo entre as inoculações. O primeiro, quanto maior for, maior será a competitividade dessas com leveduras que estejam no mosto e com as leveduras do segundo inóculo. O intervalo entre as inoculações afeta a duração da atividade metabólica dessas leveduras. Um grande período entre inoculações pode não ser viável do ponto de vista industrial, pois pode acarretar contaminações principalmente quando a competitividade das leveduras inoculadas é baixa. Por outro lado, o uso de grande quantidade de inóculo leva a um aumento nos custos do processo. O tempo para a segunda inoculação pode ser realizado simulando a fermentação espontânea, o que permite uma interação sinérgica entre as cepas

A combinação de diferentes cepas de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* em culturas iniciadoras pode ser utilizada com o intuito de obter um produto com características organolépticas únicas. Leveduras *Saccharomyces* previnem a parada da fermentação e garantem a exaustão dos açúcares fermentescíveis e consequente término da fermentação, dificultando contaminações, enquanto leveduras não-*Saccharomyces* contribuem com enzimas importantes para o processo fermentativo e metabólitos que aumentam a complexidade aromática (MANZANARES et al., 2011; PLATA et al., 2003; ROMANO et al., 2003).

Dentre as possíveis vantagens do uso de mais de um isolado de levedura em um mesmo processo fermentativo estão a redução de álcool, acidez total, acidez volátil e acetaldeído, melhora do perfil organoléptico e aromático do produto fermentado (BELY et al., 2008; CIANI et al., 2014; MOREIRA et al., 2008; MORENO et al., 1991; PIETROWSKI, 2011). Independentemente da técnica de cultura mista a ser utilizada é imprescindível a verificação de compatibilidade entre os isolados, como a não produção/sensibilidade à toxina *killer*.

### 3.6 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Segundo Coton et al. (2006), a identificação de leveduras é importante para o estudo da biodiversidade e dinâmica populacional de ecossistemas fermentativos, bem como para a seleção de leveduras com

potencial tecnológico. As leveduras são normalmente identificadas com base nas suas características fenotípicas e bioquímicas (método que inclui reações de fermentação com diferentes açúcares, respostas de crescimento a diferentes fontes de carbono/nitrogênio, caracterização microscópica das células vegetativas e a forma de reprodução) e/ou a partir de métodos moleculares.

Métodos moleculares, baseados no estudo do DNA e na caracterização genotípica dos micro-organismos, constituem grande avanço para a caracterização das espécies com diferentes finalidades, permitindo também a avaliação da variabilidade intra-específica entre amostras. Estes métodos oferecem vantagens por apresentarem maior estabilidade dos caracteres ao longo do tempo, alta reprodutibilidade e objetividade na interpretação dos resultados. As técnicas moleculares tornaram-se mais acessíveis nos últimos anos e tem sido extensivamente aplicadas para a classificação e a caracterização genética de leveduras das mais diversas áreas de pesquisa.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

As leveduras utilizadas no presente trabalho, apresentadas no Apêndice A, pertencem ao grupo de micro-organismos do Laboratório de Micro-organismos e Processos Biotecnológicos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

O isolamento desses micro-organismos foi realizado em estudo anterior a partir do fruto, galho ou folhas de maçãs da região de Fraiburgo, Santa Catarina. As amostras foram maceradas e diluídas em solução salina estéril (0,85 %), plaqueadas em meio de cultura YEPD sólido com adição de cloranfenicol 0,2 % e incubadas por 72 horas. Após esse período, colônias de leveduras foram selecionadas ao acaso e plaqueadas para isolamento final.

Foram também utilizadas cepas comerciais fornecidas pela empresa AEB Bioquímica Latino Americana S.A. (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil): Fermol Cryoaromae (*S. bayanus*) (CRY), Fermol Charmat (*S. bayanus*) (CHA), Fermol Arôme Plus (A+) e Perlage BB (*S. cerevisiae*) (PER), e de culturas de outras coleções: André Tosello, CCT 0761 e CCT 0765 (*S. cerevisiae*), CCT 2369 (*P. anomala*) e CCT 3437 (*C. kefir*); Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológico (UFRGS), QU 11 (*Yarrowia lipolytica*), QU 18 (*C. catenulata*), QU 30, QU 37 e QU 133 (*K. lactis*), QU 103 (*K. marxianus*), QU 134 (*C. parapsilosis*) e QU 139 (*Trichosporum japonicum*).

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Os isolados foram crescidos a 25 °C por 72 a 96 horas e conservados sob refrigeração a 8 °C em meio de cultura YEPD, com composição (g L<sup>-1</sup>): glicose (20,0), peptona bacteriológica (20,0), extrato de levedura (10,0), agar (15,0), pH 5,5 ± 0,2 (ATLAS, 2010). Os isolados também foram criopreservados à temperatura de -80 °C após crescimento da cultura pura em meio YEPD líquido por 72 h a 25 °C, transferidos para recipiente estéril contendo crioprotetor (glicerol 20 %), resfriamento à temperatura de -20 °C por 2 horas (BOND, 2007). Para a aplicação nos experimentos, os isolados utilizados foram repicados e retirados de cultivos em meio sólido ou líquido com até 72 horas.

Para os ensaios de capacidade fermentativa e produção de H<sub>2</sub>S foi utilizado meio caldo mosto de maçã (CMM) descrito por da Silva e da

Silva (1984), com composição (g L<sup>-1</sup>): sulfito de sódio (1,0) e triptona (10,0) solubilizados em suco de maçã comercial (Suco de maçã integral SANJO (São Joaquim, Santa Catarina, Brasil), 100 % natural (Fuji e Gala), sem conservantes, lote 18/2014, açúcares, 135 g L<sup>-1</sup>, pH 3,5), adquiridos diretamente da empresa. O papel indicador (Whatman, Reino Unido) para produção de H<sub>2</sub>S foi impregnado com solução aquosa de acetato de chumbo 3 %.

Os ensaios de crescimento e viabilidade celular nas temperatura de 25 °C e 8 °C e tolerância ao etanol exógeno, nas concentrações de 0, 4 e 8 % de etanol 99,5 % foram realizados em triplicata e acompanhado pelo período de 14 dias utilizando suco de maçã comercial (Suco de maçã integral SANJO (São Joaquim, Santa Catarina, Brasil), 100 % natural (Fuji e Gala), sem conservantes, lote 18/2014, açúcares, 135 g L<sup>-1</sup>, pH 3,5), adquiridos diretamente da empresa.

A detecção da produção de toxina *killer* e sensibilidade à toxina pelos isolados foi realizados em placa de petri com meio de cultura de composição (g L<sup>-1</sup>): agar (20,0); suco de maçã comercial; azul de metileno (0,003 %).

Os meios e soluções foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e posteriormente armazenados a 8 °C até o momento do uso.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

A caracterização genotípica dos isolados selecionados com potencial para a aplicação em sidra foi realizada por meio do sequenciamento parcial da região do espaçador interno transcrito (ITS).

A região do ITS é uma sequência que está localizada entre a subunidade menor (SSU) e a subunidade maior (LSU) do rDNA e possui grande número de cópias no rDNA. Em fungos esta região é rica em inserções e deleções e sofre evolução mais rápida do que outras regiões, como SSU e LSU, e isto a torna uma sequência de grande importância que permite, assim, detectar variações entre gêneros, espécies e, inclusive, dentro de populações (SCHOCH et al., 2012).

Para a extração do rDNA, as linhagens isoladas foram submetidas ao método adaptado descrito por da Silva et al. (2012). Para tal, uma alçada de células foi transferida para tubos de 200 µL contendo 100 µL de água ultrapura (MilliQ Direct 8, Merck, Darmstadt, Alemanha) estéril e friccionada contra a parede do tubo. A suspensão foi aquecida a 100 °C por 5 min, centrifugada (Mini Spin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 13.793 x g por 3 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo e armazenado a -20 °C.

As amostras foram amplificadas por PCR analisando seu rDNA total utilizando os iniciadores (*primers*) para leveduras. Foi utilizado o par de *primers* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al., 1990) almejando a região ITS do rDNA. As ampliações foram realizadas para um volume final de 25  $\mu$ L. 100 ng de material foi adicionado à reação de PCR, que consistiu de tampão da enzima Taq DNA polimerase 1x (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 10 mM de cada *primer* (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

As ampliações consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 54 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de extensão final a 72 °C por 10 min em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os produtos de amplificação foram mantidos a -20 °C.

Alíquotas de 4,0  $\mu$ L dos produtos de PCR e padrão de referência Low Mass DNA Ladder (100 a 2000 pb) (Life Technologies, São Paulo, Brasil) foram aplicadas em gel de agarose 1 % (AMRESCO, Ohio, EUA). A corrida foi realizada com tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 1x, contendo 40 mM TRIS (AMRESCO, Ohio, EUA), 20 mM de ácido acético (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) e 1 mM EDTA pH 8,0 (F. Maia, São Paulo, Brasil) a 80 V por 45 min. Os géis foram corados com SYBR Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e fotografados utilizando transiluminador UV ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, EUA) para verificação de banda intensa e única. A concentração e qualidade do DNA foram verificadas em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA).

As amostras foram purificadas com etanol segundo o procedimento descrito por Sambrook e Russel (2006). Dois volumes de etanol absoluto gelado foram adicionados ao microtubo contendo o DNA juntamente com cloreto de sódio suficiente para atingir a concentração de 0,2 M. A solução resultante foi homogeneizada e acondicionada a -20 °C por 30 minutos, centrifugada a 13.793 x g por 10 minutos e remoção do sobrenadante. Ao tubo foi adicionado 50 % de sua capacidade de etanol 70 %, seguido de centrifugação a 13.793 x g por 5 minutos, remoção do sobrenadante e secagem em câmara de fluxo laminar por 15 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspenso em volume suficiente para quantificação, verificação de qualidade. As amostras purificadas foram enviadas e

processadas pela Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em analisador capilar de DNA ABI 3730 XL (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA).

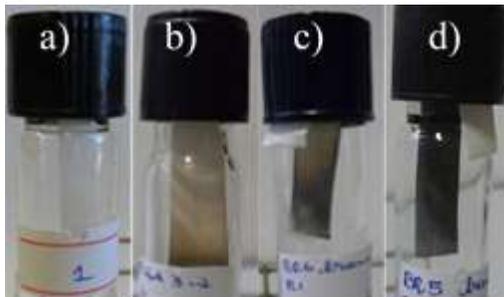
As sequências resultantes foram processadas com o programa BioEdit v. 7.2.6.1 (HALL, 1999) para a remoção de bases com baixa qualidade (Phred  $\geq 20$ ) e unificação das sequências *forward* e *reverse*. As sequências obtidas foram comparadas com sequências do *Genbank* disponíveis na plataforma online BLAST e a partir delas foi construída a árvore filogenética utilizando o software MEGA v. 7.1.0 (KUMAR et al., 2016).

#### 4.4 TRIAGEM E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

##### 4.4.1 Produção de sulfeto de hidrogênio

A produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) pelos isolados foi identificada de acordo com a metodologia de da Silva e da Silva (1984). 1 mL de suspensão celular ( $10^7$  células  $mL^{-1}$ ) foi inoculado em 9 mL de caldo mosto de maçã (CMM) e acompanhamento da formação de coloração escura em papel indicador pelo período de 14 dias à temperatura de 25 °C. O ensaio foi realizado em triplicata e os isolados foram classificados de acordo com a intensidade de cor no papel indicador (Figura 6)

Figura 6. Resultados para a produção de  $H_2S$  pelos isolados: a) negativo, b) baixo, c) médio e d) alto



##### 4.4.2 Análise olfativa

A avaliação olfativa dos fermentados produzidos com todos os isolados foram realizados por 25 julgadores não treinados segundo a

seguinte metodologia: O provadores foram instruídos a cheirar as amostras, descrever e quantificar na ficha os odores percebidos em uma escala hedônica de nove pontos para cada categoria de aroma previamente estabelecido: alcoólico, doce, frutado, floral, fermento, herbal, ovo podre e acético, ou algum outro aroma percebido que não constava na ficha (Figura 7) (IAL, 2008). As amostras foram fermentadas e analisadas entre 72 e 96 horas após a inoculação com  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  em mosto de maçã, em triplicata.

A análise sensorial desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos na Plataforma Brasil (<http://plataformabrasil.saude.gov.br/>) sob o número CAAE 61513316.4.0000.0121

Figura 7. Ficha de análise olfativa com escala hedônica de nove pontos

Amostra: \_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_\_

AROMA	Intensidade									
	nula/baixa			média			Alta			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alcoólico										
Doce										
Frutado										
Floral										
Fermento										
Herbal										
Ovo podre										
Acético										

#### 4.4.3 Capacidade fermentativa

A capacidade fermentativa de todos os isolados foi determinada pelo monitoramento periódico da perda de massa dos fermentadores durante o processo fermentativo com concentração inicial de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de cada isolado em caldo mosto de maçã (CMM). Os ensaios foram realizados em triplicata e foi acompanhado o período de 14 dias à temperatura constante de 25 °C com pesagens em balança analítica (OHAUS Adventurer, Nova Jersey, EUA) até peso constante ou final do período proposto. A quantidade perdida pela liberação de gás de cada isolado foi descontada de eventual perda por evaporação do líquido com a utilização de controle negativo (ROGER et al., 2002). Foram estimados

o vigor fermentativo, máximo teórico de álcool que pode ser produzido (% (v/v)) por estequiometria, multiplicando a perda total de gás, em gramas, por 1,3642, e velocidade de fermentação ( $\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) pelo total de gás produzido ao final de 3 dias de processo, conforme proposto por Ciani e Maccarelli (1998).

#### 4.4.4 Tolerância ao etanol e viabilidade celular em fermentações a 8 °C e 25 °C

Os isolados que apresentaram resultados satisfatórios no teste de produção de  $\text{H}_2\text{S}$  (nula ou baixa produção do composto) e/ou análise olfativa foram testados quanto sua capacidade de tolerar a presença de etanol exógeno (etanol absoluto 99,5 %) adicionados no início do ensaio em três concentrações (0, 4 e 8 % v/v) em suco de maçã, na concentração de inicial de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , obtidas a partir do crescimento prévio em mosto de maçã por 96 horas. O mosto foi homogeneizado em vortex e uma alíquota foi retirada para contagem de 4 replicatas em câmara de Neubauer com adição de solução indicadora azul de metileno 0,023 % (m/v) quanto a concentração e viabilidade celular nos tempos 0, 7 e 14 dias, em microscópio óptico (Laboval 4, Zeiss, Alemanha) de acordo com metodologia de contagem de leveduras descrita por Fugelsang e Edwards (2007).

#### 4.4.5 Toxina *killer*

Para verificar o nível de sensibilidade e a expressão da toxina pelos isolados selecionados em testes anteriores, um volume de inóculo de levedura na concentração de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foi espalhado com alça de Drigalsky sobre o meio de cultura em placas de Petri. Em seguida foi realizado a inoculação pontual de leveduras *killer* no meio de cultura, já previamente identificadas, bem como dos demais isolados selecionados a serem testados, na mesma concentração de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C e analisadas quanto à formação de halo ao redor da região inoculada pontualmente, se o halo for claro indica crescimento ou seja, não inibição, da levedura sensível padrão ou daquela em análise, um círculo azul escuro entre o halo e a região de crescimento da levedura testada indica a morte das leveduras em função da difusão das proteínas para a área de crescimento (ANGIOLETTO, 2013; TOSTA, 2004). As leveduras foram classificadas como *killer*, sensível ou neutra quanto à interação entre isolados. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.4.6 Cinética fermentativa

Os isolados que apresentaram resultados satisfatórios no teste de produção de H<sub>2</sub>S (nula ou baixa produção do composto) e/ou análise olfativa foram submetidos tanto à fermentação (20 °C) quanto ao cultivo agitado (20 °C, 150 rpm) de mosto de maçã, com inóculo de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> e acompanhadas por período de 60 dias. Foram realizadas, periodicamente a retirada de amostras de forma asséptica em câmara de fluxo laminar, contagens celulares em câmara de Neubauer com adição de azul de metileno para quantificação e verificação da viabilidade celular (FUGELANG; EDWARDS, 2007), bem como quantificação de açúcares redutores totais pela metodologia do ácido dinitrossalicílico (DNS) proposta por Gonçalves et al. (2010) e glicose por kit enzimático (Glicose Liquiform, Labtest Diagnóstica), além de álcool ao final do processo pela conversão da densidade relativa da amostra destilada (IAL, 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a contagem e viabilidade foi realizada contando 8 câmaras..

#### 4.4.7 Análise estatística e ajuste dos dados

O cálculo das velocidades ( $\mu$ ) médias de produção de gás, crescimento celular e consumo de açúcares redutores foi feito utilizando o método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy e Zajic (1973) conforme apresentado em formato para editor de planilhas por Gombert (2001) a partir da equação de ajuste dos pontos experimentais obtidas no software TableCurve 2D v.5.01 (SYSTAT, 2002).

Para o cálculo da velocidade de consumo de açúcares redutores foi realizada a conversão da concentração celular de células mL<sup>-1</sup> para g L<sup>-1</sup>, uma alíquota homogeneizada de cada isolado foi contada em câmara de Neubauer e posteriormente filtrada para realizar a quantificação da biomassa seca por secagem em microondas (OROZCO; KILIKIAN, 2008). Utilizando o software Sisvar v.5.3 (DEX/UFLA, Brasil, 2007) foram realizadas as análises estatísticas de variância (ANOVA), teste de diferenciação de médias de Tukey (p<0,05) e, para a análise da capacidade fermentativa, onde o número de tratamentos era grande, foi realizado um agrupamento dos isolados com perfil fermentativo semelhante por meio do teste de diferenciação de médias e agrupamento de Skott-Knott (p<0,05).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CAPACIDADE FERMENTATIVA

120 isolados de leveduras foram analisados e, de acordo com sua perda de massa pela liberação de gases ao final dos 14 dias de processo, foram agrupados (Apêndice A) após análise de variância e teste de diferenciação de médias e agrupamento de Skott-Knott ( $p < 0,05$ ). A Figura 8 ilustra a composição por número de isolados pertencentes a cada grupo gerado. O perfil cinético de perda de massa dos fermentadores de cada um dos grupos obtidos pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 8. Agrupamento dos isolados de levedura segundo sua produção máxima de gás ao final de 14 dias por análise de variância e teste de diferenciação de médias de Skott-Knott ( $p < 0,05$ )

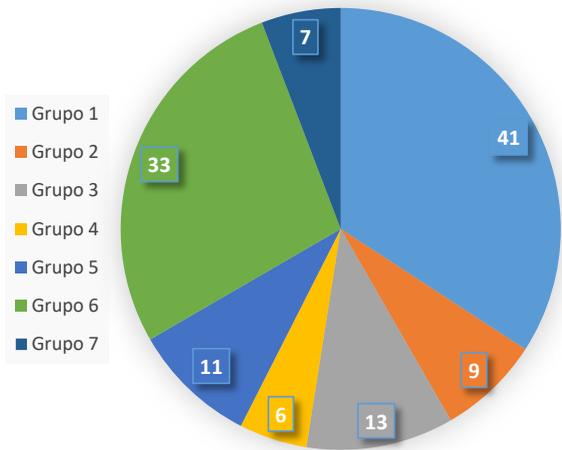
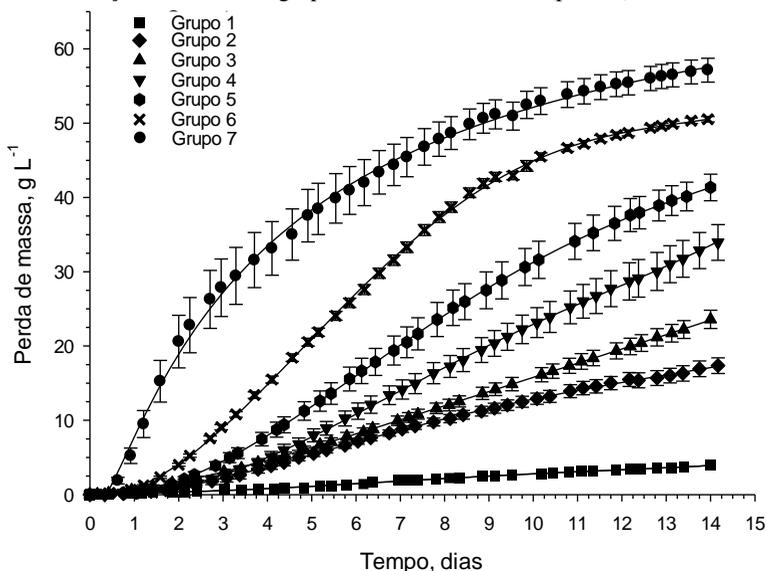


Figura 9. Perfil cinético dos grupos de leveduras formados pelo agrupamento de acordo com sua perda de massa total ao final de 14 dias por análise de variância e teste de diferenciação de médias e agrupamento de Skott-Knott ( $p < 0,05$ )



O grupo 1 é o maior grupo formado e representa 35 % do total de leveduras. Dentre as leveduras já identificadas estão QU 139 (*Trichosporon japonicum*), QU 30 (*Kluyveromyces lactis*), QU 18 (*Candida catenulata*), QU 11 (*Yarrowia lipolytica*). Do grupo 3, QU 133 (*K. lactis*), CCT 3437 (*K. marxianus*), QU 134 (*C. parapsilosis*), QU 37 (*K. lactis*) e do grupo 4, QU 103 (*K. marxianus*).

*Y. lipolytica* e *T. japonicum* não possuem capacidade de fermentar açúcares, porém podem utilizar glicose como fonte de carbono (KURTZMAN, 2011b; SUGITA, 2011). Leveduras *K. lactis*, *C. parapsilosis* e *C. kefir* possuem capacidade variável para fermentação de glicose dentre os isolados (LACHANCE, 2011; LACHANCE et al., 2011, MICROBIOLOGY ONLINE, 2015). Em estudo utilizando cultura pura de *K. lactis*, Yamaoka et al. (2014) também obtiveram fermentação lenta, fato atribuído à falta de capacidade da levedura em tolerar o acúmulo de etanol no meio.

Leveduras *C. parapsilosis* e *K. marxianus* possuem capacidade de fermentar glicose porém em quantidades diferentes e em velocidades diferentes. A diferenciação desses isolados em grupos distintos, apesar de ambos fermentarem glicose pode ser devido ao fato que *K. marxianus* possui também capacidade de fermentar sacarose, ausente em *C.*

*parapsilosis*, uma vez que a sacarose representa, em média, 27 % dos açúcares totais em maçãs (LACHANCE, 2011; LACHANCE et al., 2011, WOSIACKI et al., 2008).

O grupo 6 possui o segundo maior número isolados, apresenta capacidade fermentativa considerável, apenas 12 % menor que o grupo de maior produção de gás ( $57 \text{ g L}^{-1}$ ), porém não possui isolados com nula ou baixa produção de sulfeto de hidrogênio (Tabela 2; Apêndice A).

O grupo 7 é composto de apenas 7 leveduras, 4 controles comerciais e 3 leveduras de coleção de culturas, a saber: *Saccharomyces bayanus* (CHA, CRY), *S. cerevisiae* (A+, PER, CCT 0761 e CCT 0765) e *Pichia anomala* (CCT 2369). A média de liberação de gás desse grupo está de acordo com valores obtidos por Santos et al. (2016) para fermentação de sidra com isolados de *S. cerevisiae* comercial (Arôme Plus, Bouquet e Aromatic; AEB Bioquímica Latino Americana S.A. (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

A alta capacidade fermentativa de leveduras do gênero *Saccharomyces* é amplamente conhecida e, por essa característica, é a principal utilizada para produção de etanol, cervejas, pães, vinhos, sidra. Essa propriedade ficou evidente por todas as *Saccharomyces* identificadas comporem quase a totalidade do grupo com maior produção de gás ao final dos 14 dias de processo.

Estudos com outras matérias primas indicam a capacidade de leveduras do gênero *Pichia* para crescer e suportar concentração alcoólica dentro dos limites da legislação brasileira para sidra (4 a 8 % (v/v)) (RYUN et al., 2012; TAO et al., 2011), fator que pode estar relacionado com a inclusão dessa levedura no grupo que obteve a maior produção de gás.

Os dados provenientes do agrupamento dos isolados em grupos leva à suposição de que não há leveduras *Saccharomyces* entre os isolados obtidos, uma vez que esse gênero é caracterizado por forte metabolismo fermentativo e, no grupo com essa característica, apenas leveduras já previamente identificadas o compõem. A ausência de leveduras *Saccharomyces* pode ser devido à metodologia de isolamento dos micro-organismos, que foi realizado com plaqueamento direto dos frutos após diluição em solução salina, com repique e seleção das colônias crescidas em até 72 h de cultivo. Esse tempo geralmente é insuficiente para o crescimento dessa levedura, que se encontra em concentração bem menor que as leveduras não-*Saccharomyces*. (VAUGHAN-MARTINI e MARTINI, 1995; MONTIMER e POLSINELLI, 1999; VALLES et al., 2007; BOKULICH et al., 2012; STEFANINI et al., 2012).

Foram realizadas regressões e ajuste dos dados (Apêndice B) e calculadas as velocidades médias de produção de gás, vigor fermentativo e velocidade de fermentação (tabela 1).

Tabela 1. Velocidade média de produção de gás, vigor fermentativo e velocidade de fermentação por grupo de isolados obtidos a partir do agrupamento gerado pela análise de variância e separação de médias e agrupamento de Skott-Knott ( $p < 0,05$ )

Grupo	Velocidade média de produção de gás ( $\mu$ médio) ( $\text{dia}^{-1}$ )	Vigor fermentativo (etanol % (v/v))	Velocidade de fermentação ( $\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ )
1	0,35	0,56	0,57
2	0,57	1,60	2,38
3	0,54	3,23	3,18
4	0,69	4,67	2,91
5	0,81	5,63	4,77
6	0,84	6,89	9,36
7	1,33	7,79	27,67

A diferença observada no gráfico do perfil cinético entre os sete grupos formados ficou também evidente ao comparar os valores de velocidade média de liberação de gás. A produção teórica máxima de álcool do grupo 7 ficou abaixo do encontrado por Ciani e Maccarelli (1998) para leveduras *Saccharomyces*. Esse menor valor pode ser devido à menor concentração de açúcares presentes no mosto no início da fermentação com suco de maçã (11 °BRIX) em comparação com o mosto utilizado pelos autores (27 °BRIX) pois valores semelhantes para a produção de etanol foram obtidos para a fermentação de mosto de maçã com isolados de *S. cerevisiae* comercial (Arôme Plus, Bouquet e Aromatic; AEB Bioquímica Latino Americana S.A. (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) (ALBERTI et al., 2011; SANTOS et al., 2016). Os demais grupos também podem ter sido afetados pela diferença na concentração do substrato, porém apresentam vigor fermentativo dentro da faixa encontrada pelos autores para leveduras não-*Saccharomyces*. Teoricamente, as leveduras dos grupos 4, 5, 6 e 7 apresentam vigor fermentativo suficiente para enquadrar o produto fermentado dentro dos parâmetros definidos pela legislação brasileira. Os grupos 1 e 2 apresentam vigor fermentativo baixo, de modo que podem ser classificadas como não fermentativas.

A velocidade de fermentação do grupo 7 no 3º dia está de acordo com valores encontrados por Ciani e Maccarelli (1998) para 20 % dos isolados de *S. cerevisiae* estudados, pertencentes à coleção de leveduras

do Departamento de Biologia Vegetal e Microbiologia Aplicada da Universidade de Perugia (DBVPG), sendo que 40 % dos isolados apresentaram velocidade igual ou superior a  $20 \text{ g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Valores semelhantes foram encontrados por Tristezza e colaboradores (2012) para isolados de *S. cerevisiae* obtidos de fermentações espontâneas de mosto de uva.

O grupo 6 apresentou velocidade de fermentação comparável com a maioria dos isolados de *Torulaspota deubrueckii*, um contaminante de vinificações e alguns isolados de *Saccharomyces ludwigii*, também contaminante de vinificações e espécie tipicamente produtora de acetaldeído (CIANI, MACCARELLI, 1998).

Os grupos 1 a 5 apresentaram baixas velocidades de fermentação que foram comparáveis com diferentes gêneros do estudo de Ciani e Maccarelli (1998), dentre eles *C. stellata* e *Hanseniaspora uvarum*.

## 5.2 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

Os resultados de produção de  $\text{H}_2\text{S}$  pelos isolados foram classificados e categorizados (tabela 2) de acordo com a intensidade da coloração negra do papel indicador (Figura SS) e, os isolados com baixa produção total ao final de 14 dias foram estudados mais detalhadamente, com acompanhamento da produção do composto durante a fermentação (Tabela 3) a fim de determinar o período em que o composto é produzido.

Tabela 2. Resultado para produção de H<sub>2</sub>S dos isolados em meio líquido.

Amostra	Resultado	Amostra	Resultado	Amostra	Resultado	Amostra	Resultado
7	++	205	+	200-1	+ -	R-6	++
151	+	209	++	200-2	++	R-8	++
153	++	210	++	203-1	++	SJ1M 01	++
158	++	150-1	+	203-2	++	SJ1M 05	++
159	++	154-1	++	4-m	++	SJ1M 06	++
162	++	155-1	++	A+	+ -	SJ1M 06	++
163	++	155-2	++	BR 2-2	++	SJ1M 07	++
165	++	157-1	+	BR 4	++	SJ1M 08	++
167	++	157-2	+	BR 4-4	++	SJ1M 10	+
168	++	164-1	++	BR 5 brilho	+ -	SJ1M 11	++
176	+ -	164-2	++	BR 6-6	++	SJ1M 12	++
177	++	169-1	+ -	BR 7	++	SJ1M 13	++
178	++	169-2	++	BR5 Bco	++	SJ1M 14	++
180	++	170-1	+	BR6 Bco	+	U-4	++
181	+	170-2	++	CCT 0761	+ -	U-5	++
182	++	172-2	++	CCT 0765	+	U-6	++
183	++	173-1	+	CCT 2369	+	Villa 1	++
186	++	173-2	++	CCT 3437	-	Villa 2	++
187	++	175-1	+ -	CHA	-	Villa 3	++
188	++	179-2	+ -	PER	-	Villa 3-1	++
192	++	184-1	++	Pomi-2	++	Villa 3-2	+
194	+	184-2	++	QU 103	+ -	Villa 3-2	+ -
195	++	185-2	++	QU 11	-	Villa 3-3	+
196	++	189-1	++	QU 133	+ -	Villa 4	++
197	++	190-1	++	QU 134	+	Villa 5-1	++
198	-	190-2	++	QU 139	-	Villa 5-2	++
199	++	191-1	++	QU 18	+	Villa 6	++
201	++	191-2	++	QU 30	-	Villa 7	++
202	++	193-1	++	QU 37	+ -		
204	+ -	193-2	++	R-5	++		

Nota: (-) Negativo para produção de H<sub>2</sub>S; (+-) Baixa produção de H<sub>2</sub>S; (+) Média produção de H<sub>2</sub>S; (++) Alta produção de H<sub>2</sub>S.

Tabela 3. Período de produção de H<sub>2</sub>S pelos isolados de levedura classificados como pouco produtores do composto.

Isolado	Resultado	Período de produção	Isolado	Resultado	Período de produção
169-1	+-	II	Villa 3-2	+-	I
175-1	+-	II	Villa 3-3	+-	II
176	+-	I	A+	+-	I
179-2	+-	II	CCT 0761	+-	I
200-1	+-	II	QU 37	+-	II
204	+-	II	QU 103	+-	II
BR 5 brilho	+-	II	QU 133	+-	II

Nota: (+-): Baixa produção de H<sub>2</sub>S. Período I – até 5 dias após inoculação; Período II – após 5 dias de inoculação

Estudos indicam que o nível de produção de H<sub>2</sub>S pelas leveduras é altamente dependente das condições de crescimento, composição do meio de cultura e estado físico do meio (sólido ou líquido) e local de isolamento. Dentre os componentes do meio de cultura, o teor de nitrogênio e sua assimilabilidade são extensamente discutidos na literatura e indicados como o principal responsável pela alta variabilidade (JIRANEK et al., 1995; UGLIANO et al., 2011).

Nos estudos de Strauss et al. (2001) com leveduras provenientes de vinhedos na África do Sul, 29 % dos isolados não-*Saccharomyces*, em agar mosto sintético de uva, apresentaram capacidade de produção de H<sub>2</sub>S. Já Włodarczyk et al. (2011), em estudo realizado diretamente em mosto de uva da região de Bento Gonçalves, encontraram que 65 % dos isolados não produziam H<sub>2</sub>S.

O presente trabalho resultou em um número menor que os dois estudos citados, com somente 19 % dos isolados (22) produzindo nenhuma ou baixa quantidade de H<sub>2</sub>S, ao retirar cepas comerciais (A+, CHA, CRY, PER) e de coleções de culturas (códigos CCT e QU) da contabilização, o número reduz para 10 % (10). Levando-se em consideração que nos três trabalhos os mostos continham quantidades suficientes de nitrogênio assimilável, o fator predominante para a enorme diferença entre o percentual de cepas produtoras de sulfeto de hidrogênio pode estar relacionado com a microbiota existente em cada uma das localizações onde os isolados foram obtidos.

Outros dois estudos, de Neto e Mendes-Ferreira (2005) e Valles et al. (2008) corroboram com essa suposição por serem estudos realizados

com mesmo meio de cultura mas mesmo assim apresentam resultados bastante diferentes. No primeiro trabalho, isolaram leveduras de uvas e mostos em Portugal e, das leveduras não-*Saccharomyces* testadas para a produção de H<sub>2</sub>S em agar BiGGY, 14 % apresentaram produção baixa ou nula. O segundo trabalho, de Valles et al. (2008), também em agar BiGGY, porém isoladas de tanques de fermentação de sidra na Espanha, foram obtidos 54 % dos isolados com colônias pouco ou não produtoras.

Além da menor quantidade de isolados, os que produziram baixa quantidade de H<sub>2</sub>S ainda diferiram no período onde o mesmo passou a ser detectado, com 4 isolados (176, Villa 3-2, A+ e CCT 0761) apresentando a produção nos cinco primeiros dias do experimento, enquanto os demais isolados apresentaram a produção nos dias finais (tabela 3). Em estudo mais aprofundado sobre a detecção da produção de sulfeto de hidrogênio durante a fermentação, Thomas e colaboradores (1993) e Spiropoulos e colaboradores (2000) obtiveram dois picos de produção do composto e concluíram que o meio de cultivo, cepa de levedura e concentração celular são os elementos mais influentes na concentração e momento de produção do composto, sendo o primeiro pico, ocorrido nos primeiros dias de fermentação, decorrente principalmente da cepa utilizada, enquanto o segundo, detectado a partir do momento de exaustão de açúcares, decorrente do meio utilizado e concentração celular.

O pico I de produção pode vir a não apresentar acúmulo de H<sub>2</sub>S no produto final caso a levedura apresente boa capacidade fermentativa no período de produção, uma vez que o CO<sub>2</sub> produzido concomitantemente carrega o composto para fora do meio fermentativo. O pico II, apresenta-se mais problemático, uma vez que ocorre em momento de baixa atividade fermentativa e próxima à exaustão de nutrientes, além de não cessar ao final da fermentação, causando problemas em produtos finalizados. Esse pico pode ser gerado pela presença de etanol ou mesmo pela degradação de compostos sulfurados (THOMAS et al., 1993; UGLIANO et al., 2009). Diversos trabalhos estudaram a suplementação de meios de cultura com nitrogênio e observaram que em certas concentrações o mesmo apresentou diminuição na produção de H<sub>2</sub>S relacionados ao pico I, sugerindo que existe uma faixa ideal de concentração de compostos nitrogenados para uma fermentação com baixa ou sem formação de H<sub>2</sub>S (HERDERICH et al., 2012; MENDES-FERREIRA et al., 2002; UGLIANO et al., 2011). O pico II de produção, relacionado com a forma como o metabolismo de redução de sulfato de cada levedura se comporta na situação de esgotamento de nutrientes, torna-se mais difícil de contornar mesmo por modificação molecular na expressão de enzimas que compõem o mecanismo, pois esse metabolismo

que gera o sulfeto de hidrogênio e outros intermediários tóxicos também é o responsável por produzir compostos essenciais à tolerância ao etanol e manutenção do estado redox da célula (LINDERHOLM et al., 2008).

Com exceção do isolado 176 e Villa 3-2, os isolados A+ e CCT 0761 são cepas de *S. cerevisiae* e compõem o grupo de leveduras com alta capacidade fermentativa, reduzindo a possibilidade de acúmulo de H<sub>2</sub>S no produto final. Os demais isolados, que apresentaram produção de H<sub>2</sub>S nos dias finais de fermentação, apesar de pouca quantidade, podem vir a apresentar problemas. Uma forma possível de ser trabalhada a fim de controlar a produção desse pico é a concentração, vitalidade e viabilidade celular durante a fermentação, conforme evidência encontrada por Thomas e colaboradores (1993) ao analisar o efeito inversamente proporcional da concentração celular do inóculo na formação desse pico.

### 5.3 ANÁLISE OLFATIVA

O resultado qualitativo para a produção de H<sub>2</sub>S pelos isolados em suco de maçã gerou poucos isolados e em função disso realizou-se com todos os isolados também a análise olfativa a fim de obter um maior número de isolados que pudessem ser estudados mais profundamente.

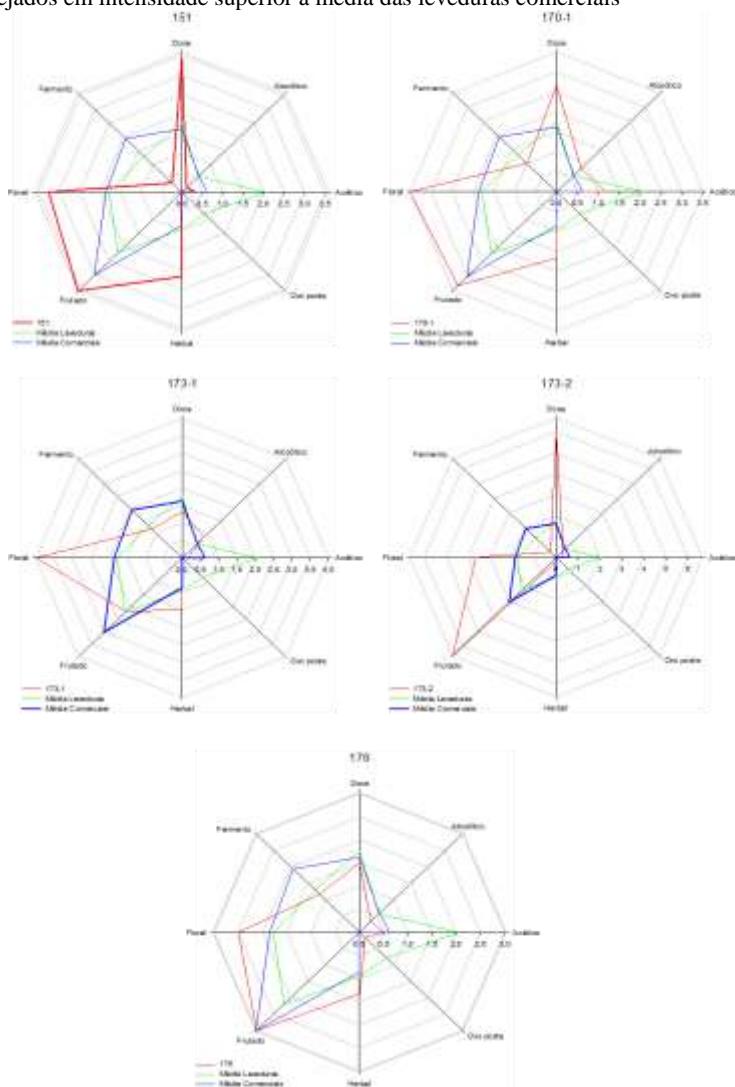
A partir dos dados obtidos pela análise olfativa dos fermentados de cada isolado, foram selecionados os que apresentaram perfil aromático agradável e em maior intensidade. Os resultados podem ser visualizados na figura 10.

Oito isolados apresentaram características aromáticas com ao menos um atributo agradável superior à média das características das leveduras comerciais, sendo portanto, potenciais produtoras de aromas. Desses, destacaram-se os isolados 173-2 e Villa 3-2 por apresentarem valores superiores aos demais para os aromas doce e frutado, e floral e frutado, respectivamente.

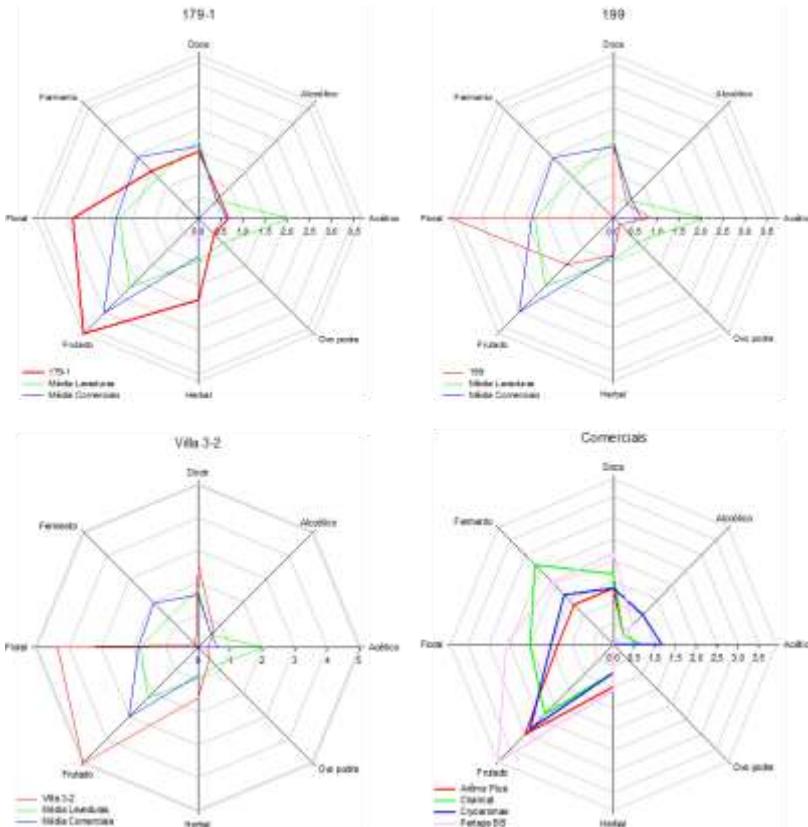
Ao cruzar os resultados obtidos pela análise de produção de H<sub>2</sub>S com a análise olfativa, somente dois isolados, 176 e Villa 3-2, compõem ambos os grupos. Apesar de serem leveduras com vigor fermentativo e velocidade de fermentação baixos (Tabela 1), podem ser utilizados em conjunto com uma levedura com capacidade de fermentar os açúcares.

A análise olfativa mostrou ser mais restritiva quanto à triagem de isolados, gerando menor número, também foi possível detectar não somente a presença do aroma ruim de ovo podre (H<sub>2</sub>S), como também outras 7 classes de aromas (alcoólico, acético, doce, frutado, floral, herbal, fermento).

Figura 10. Gráfico de perfil aromático dos isolados que apresentaram atributos desejados em intensidade superior à média das leveduras comerciais



Continuação figura 10



#### 5.4 PERFIL CINÉTICO DOS ISOLADOS COM NULA OU BAIXA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S

Os isolados apresentaram perfil cinético bastante variado, desde poucos (3 a 5) gramas de gás por litro de mosto (isolado Villa 3-2) até aproximadamente 60 g L<sup>-1</sup> de gás para os isolados comerciais.

As curvas de liberação de gás das leveduras comerciais do presente estudo apresentam perfil semelhante ao de outras cepas de leveduras *Saccharomyces* utilizadas em outros trabalhos, porém o valor encontrado variou consideravelmente quando comparado com o estudo de Carvalho e colaboradores (2010) com mosto de maçã e com mosto de uva (CIANI et al., 2006), produzindo aproximadamente 30 g L<sup>-1</sup> a mais do que o trabalho com sidra e a mesma quantidade a menos que no estudo com fermentação de uvas. Utilizando mosto de uva, Włodarczyk e

colaboradores (2012) realizaram ensaio cinético, e o resultado apresentou perfil próximo ao do presente estudo, com produção máxima de  $65 \text{ g L}^{-1}$ , porém em apenas 4 dias. Resultado semelhante também foi obtido ao final da fermentação tanto de mosto de maçã quanto mosto sintético de maçã (SANTOS et al., 2016).

Mesmo utilizando mostos diferentes, o presente trabalho e o de Włodarczyk e colaboradores (2012) apresentaram fase *lag* bastante semelhante, cerca de 24 horas. A estabilização do desprendimento de gás no presente estudo não pode ser observado, mesmo após 14 dias de cultivo apesar de apresentar diminuição considerável no desprendimento após 100 horas para a cepa mais ativa. No trabalho com mosto de uva a estabilização não pode ser observada, pois o mesmo foi finalizado antecipadamente em apenas 96 horas de cultivo, porém é possível verificar decréscimo do desprendimento de gás nas horas finais.

Uma eventual intoxicação e morte celular por etanol é improvável, pois todas as leveduras são cepas comerciais recomendadas para a produção de vinho e no trabalho apresentado as mesmas exauriram completamente os açúcares disponíveis. As causas para a discrepância de valores, principalmente entre os dois trabalhos com mosto de maçã, podem estar relacionadas às cepas de levedura utilizadas, que apresentam grande variação em seu metabolismo mesmo entre leveduras de um mesmo gênero.

Os demais isolados apresentaram perfil cinético bastante variado, com isolados encaixando em cada um dos grupos (tabela 4) gerados na análise cinética com todos os isolados.

Tabela 4. Agrupamento cinético por perda de massa dos demais isolados por possuir nula ou baixa produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e/ou qualidades aromáticas

Isolados	Grupo cinético
160; Villa 3-2	1
151; 169-1; 170-1; 173-1; 200-1; 204	2
179-2; CCT 3437; Villa 3-3	3
175-1; BR 5 brilho	4
176; 179-1; 198	5
199	6
CCT 0761	7

Em estudo com leveduras oxidativas produtoras de aromas frutados provenientes de maçãs, Pietrowski (2011) selecionou duas leveduras, *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, e realizou ensaios cinéticos

com essas leveduras, em mosto de maçã, a fim de determinar os parâmetros cinéticos ótimos para posterior aplicação na fermentação de sidra. Ciani e colaboradores (2006) estudaram diferentes interações entre culturas puras, mistas e sequenciais de *H. uvarum*, *K. thermotolerans* e *T. delbrueckii* com *Saccharomyces cerevisiae* e, para a cinética de liberação de gás, a 20 °C, em suco de uva, obteve perfil cinético semelhante ao estudo de Pietrowski (2011) para o isolado *H. uvarum*. O perfil cinético em mosto de maçã dos isolados 175-1 e BR 5 brilho se assemelham com o perfil, bem como dos valores totais de gás liberado ao longo dos 10 dias de fermentação apresentado pelo isolado *H. uvarum* a 25 °C do referido estudo com mesma concentração de inóculo. A mesma semelhança é notada para os isolados 176, 179-1 e 198 em relação ao isolado *H. guilliermondii* na avaliação realizada, porém, esses isolados também apresentam características cinéticas comparáveis com os isolados *K. thermotolerans* e *T. delbrueckii* de Ciani e colaboradores (2006).

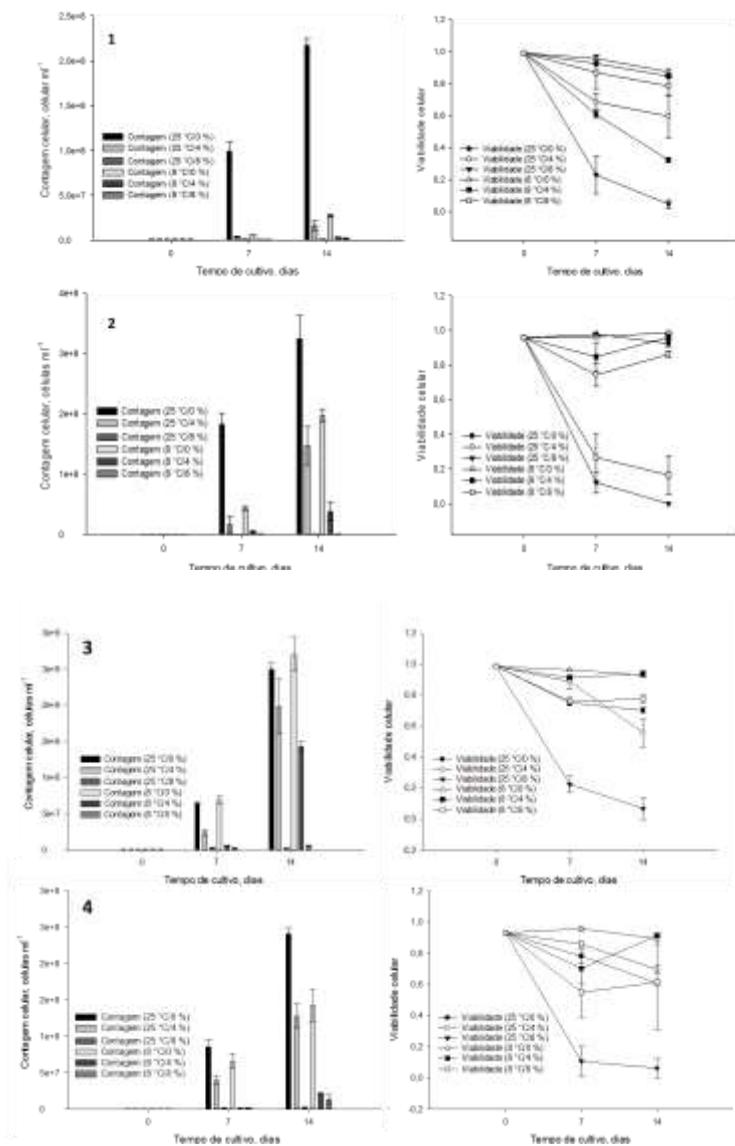
Os isolados 179-2, Villa 3-3 e CCT 3437 apresentam somente valores semelhantes de perda total de gás no tempo de 10 dias se comparados com a cepa de *H. uvarum*.

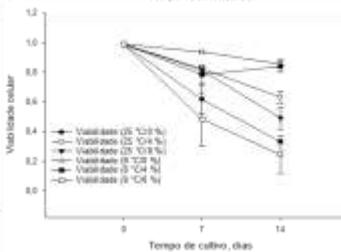
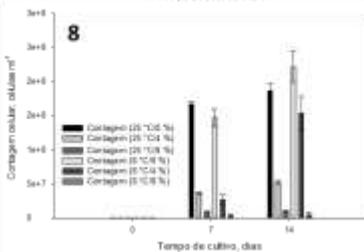
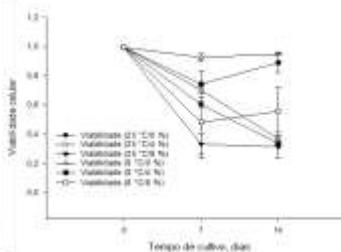
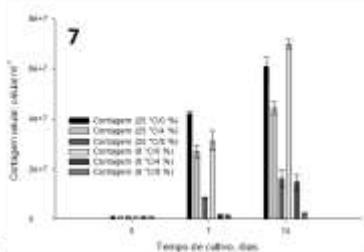
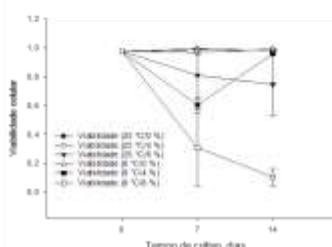
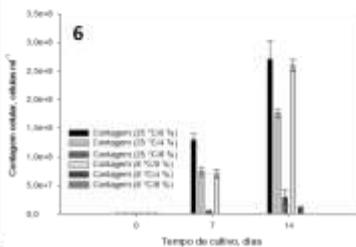
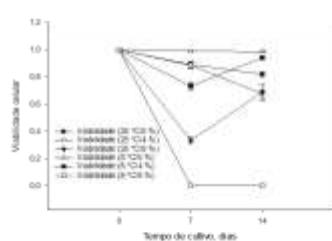
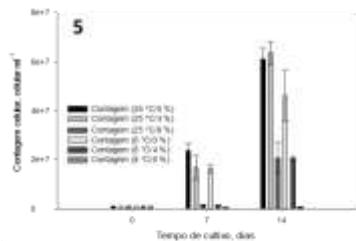
Apesar da menor capacidade fermentativa das leveduras dos outros grupos em comparação com leveduras *Saccharomyces*, isolados que apresentem contribuição positiva para características organolépticas e sensoriais em produtos fermentados podem vir a ser utilizados em conjunto com uma levedura de alto poder fermentativo.

## 5.5 TOLERÂNCIA AO ETANOL E VIABILIDADE CELULAR EM FERMENTAÇÕES A 8 °C E 25 °C

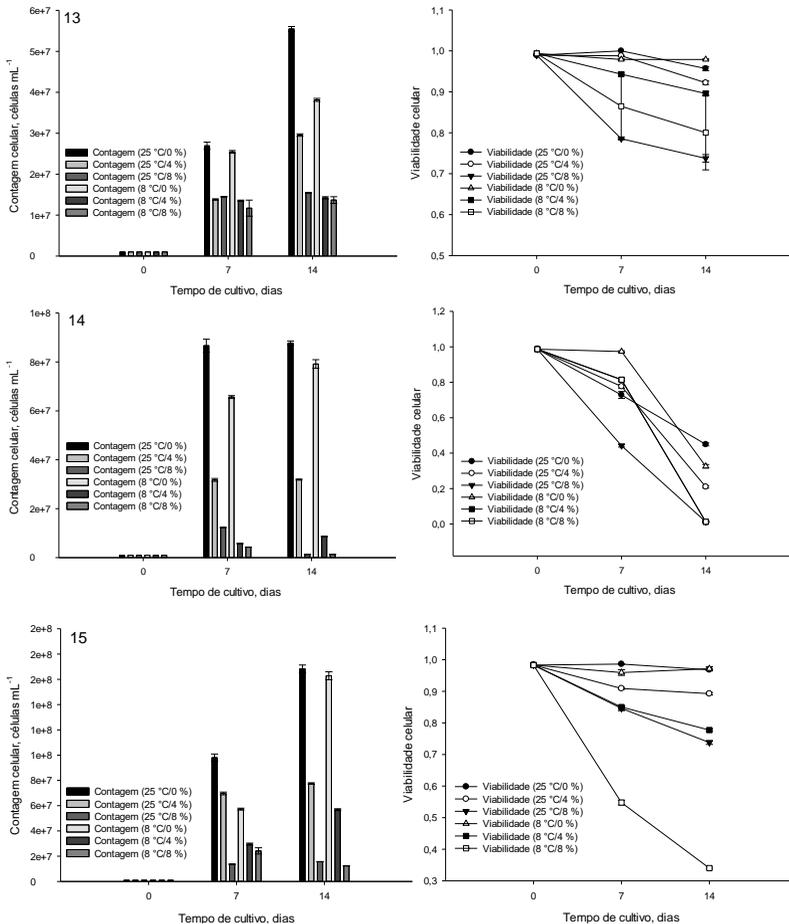
Os resultados para a interação entre temperatura de fermentação e concentração alcoólica no crescimento e viabilidade dos isolados podem ser observados na figura 11.

Figura 11. Efeito da temperatura de fermentação e da concentração de etanol exógeno na concentração celular e viabilidade celular no tempo 0, 7 e 14 dias









Nota: 1) 160; 2) Villa 3-2; 3) 169-1; 4) 200-1; 5) 179-2; 6) Villa 3-3; 7) 175-1; 8) 198; 9) 176; 10) 199; 11) 170-1; 12) 173-1; 13) 173-2; 14) 179-1; 15) 151

De modo geral os isolados testados apresentaram bom crescimento e manutenção de alta viabilidade celular ( $> 0,8$ ) em ambas as temperaturas testadas, com exceção dos isolados 179-1 e 199, desde que sem a adição de etanol exógeno, com aumento da concentração celular entre os três pontos de amostragem.

Com exceção do isolado 160, pertencente ao grupo 1 de capacidade fermentativa, e do isolado 199, pertencente ao grupo 6, todos apresentam capacidade de crescimento celular e boa manutenção da viabilidade em temperatura de 8 °C. O isolado 199 também apresentou inibição do

crescimento para qualquer concentração de álcool exógeno presente no mosto desde o início do cultivo.

Os isolados Villa 3-2, 200-1, 179-2, 176, 170-1, 173-1, 173-2 e 151 demonstraram capacidade de manutenção da viabilidade e crescimento, mesmo que tardio, nos ensaios com concentração inicial de etanol acima de 4 % (v/v).

Temperaturas acima de 30 °C, bem como temperaturas baixas, entre 5 e 10 °C, podem aumentar a sensibilidade de leveduras ao etanol e o baixo pH dos meios de cultivo tem pouco efeito na sensibilidade (BILBAO et al., 1997; GAO; FLEET, 1988; VAN UDEN, 1985).

O presente estudo verificou o comportamento dos isolados previamente selecionados perante às condições de stress, concentração de etanol e baixa temperatura com o intuito de estabelecer parâmetros de aplicação futura na fermentação de sidra. O nível de suscetibilidade de uma cepa ao etanol exógeno, que é menos tóxico que o endógeno, em concentrações dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira para sidras pode determinar até que momento da fermentação a cepa pode ser adicionada ou sobreviva no mosto de forma que possa contribuir de forma positiva para o processo. A capacidade da levedura de fermentar e resistir a baixas temperaturas é outro parâmetro que pode ser utilizado em fermentações para a obtenção de produtos mais aromáticos (D'AMORE et al., 1990; TORIJA et al., 2003)

Existem inúmeros fatores ambientais que agem em sinergia com o álcool para inibir o crescimento das leveduras, incluindo baixo pH, alta temperatura, acidez acética, ácidos graxos de cadeia curta, esgotamento de nitrogênio assimilável, e deficiência de vitaminas.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

A eficácia da técnica de extração e amplificação do rDNA dos isolados pode ser verificada na figura 12, com alta similaridade entre tamanhos dos fragmentos obtidos no estudo com dados da literatura para os isolados identificados.

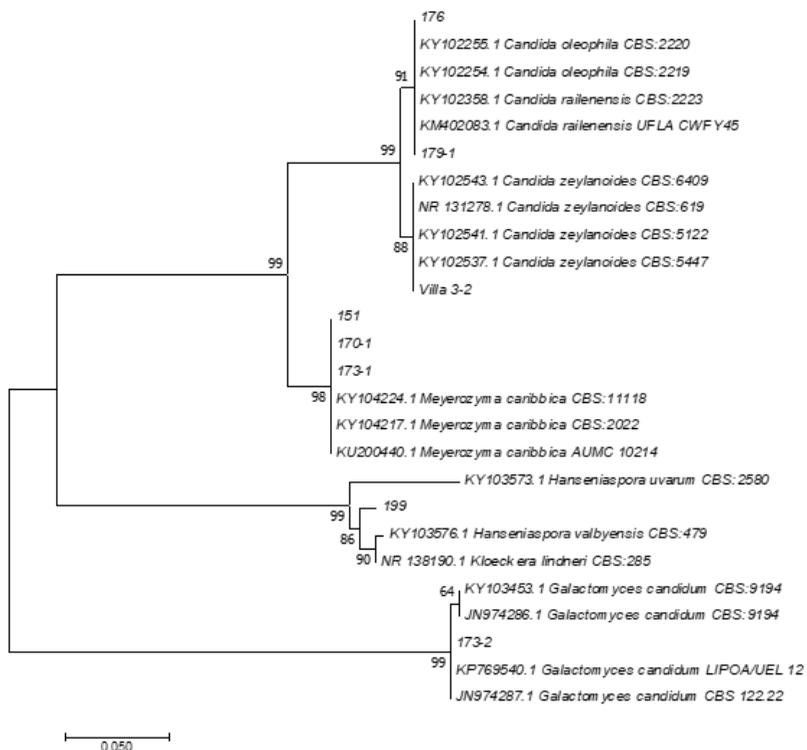
Figura 12. Imagem do gel de agarose com os fragmentos produto de PCR da região ITS do rDNA



Nota. 1: Marcador; 2: CHA; 3: A+; 4: PER; 5: CCT 2369; 6: 150-1; 7: 151; 8: 153; 9: 154-1; 10: 155-2; 11: 156; 12: 157-1; 13: 158; 14: 159; 15: 160; 16: Marcador

O isolados selecionados pelo teste olfativo (151, 170-1, 173-1, 173-2, 176, 179-1, 199, Villa 3-2) foram sequenciados e comparados com seqüências similares e agrupadas em uma árvore filogenética pelo método de máxima similaridade do modelo de Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980) (figura 13). O percentual de árvores no qual o isolado está associado é mostrado nas chaves. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidos automaticamente aplicando os algoritmos *Neighbor-Join* e *BioNJ* à matriz de distâncias estimadas usando a abordagem de proximidade composta máxima (MCL), e então selecionando a topologia com os valores de log de proximidade superior. A árvore é desenhada em escala, com o comprimento horizontal mensurado em número de substituições por local. Foram utilizadas 26 seqüências de nucleotídeos na análise e posições com espaço, dados ausentes foram eliminados.

Figura 13. Árvore filogenética construída pelo método de máxima proximidade



A partir das informações obtidas na plataforma BLAST e pela análise filogenética, os isolados podem ser identificados, segundo a nomenclatura utilizada pela base de dados Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>), como apresentado na tabela 5 abaixo. As seqüências de nucleotídeos de cada isolado estão no APÊNDICE C

Tabela 5. Identificação dos isolados de levedura selecionados

Isolado	Origem	Identificação	Sinônimo	Similaridade (%)
151	Maçã câmara frigorífica, Lebron Régis – SC	<i>Meyerozyma caribbica / M. guilliermondii</i>	<i>C. fermentati C. carpophila</i>	100 / 100
170-1	Maçã, Água Doce -SC	<i>M. caribbica / M. guilliermondii</i>	<i>C. fermentati C. carpophila</i>	100 / 100
173-1	Maçã, Água Doce -SC	<i>M. caribbica / M. guilliermondii</i>	<i>C. fermentati C. carpophila</i>	100 / 100
173-2	Maçã, Água Doce -SC	<i>Dipodascus geotrichum</i>	<i>Galactomyces candidus</i>	100
176	Maçã, Água Doce -SC	<i>Yarrowia lipolytica / Candida railenensis</i>	<i>C.oleophila</i>	99 / 99
179-1	Uva, Água Doce - SC	<i>Y. lipolytica / C.railenensis</i>	<i>C.oleophila</i>	100 / 100
199	Maçã, Fraiburgo – SC	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>		98
Villa 3-2	Maçã triturada, Água Doce - SC	<i>C. zeylanoides</i>		
CRY	Comercial	<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>S. uvarum</i>	100

As 8 leveduras identificadas na plataforma BLAST e agrupadas em uma árvore filogenética compreendem 5 gêneros e 5 espécies diferentes, sendo que 5 dos isolados eram anteriormente classificados no gênero *Candida*, desses, 3 estão atualmente classificados no gênero *Meyerozyma*. Também houve dupla identificação de 5 isolados, isso pode ser devido a diferentes fatores, como similaridade entre espécies ou fragmento de rDNA sequenciado de tamanho insuficiente para clara diferenciação.

Leveduras do gênero *Meyerozyma* compreendem apenas duas espécies e são altamente similares em seu genoma, o que torna difícil sua diferenciação (ROMI et al., 2014). De modo geral são leveduras patogênicas oportunistas em humanos que apresentam capacidade de fermentar glicose, sacarose e trealose, sendo encontradas em ambientes variados como solo, flores, frutas, insetos, cana de açúcar, maçãs.

Produzem riboflavina, xilitol e podem apresentar atividade celulolítica, porém sem ampla aplicação biotecnológica. (GRAÇA et al., 2015; KURTZMAN, 2011a; PELLICCIA et al., 2011).

*H. valbyensis* são leveduras que fermentam e crescem em meio que contém glicose como fonte de carbono. Como outras espécies apiculadas de levedura são comumente isoladas de plantas, solo, insetos, maçãs e bebidas fermentadas. Da mesma forma que leveduras do gênero *Meyerozyma* não possuem uma aplicação biotecnológica definida, porém são associadas a alimentos e bebidas fermentadas, como sidra e vinagre balsâmico. Não foram encontrados dados sobre sua patogenicidade em humanos (CADEZ, 2011; GRAÇA et al., 2015; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

*C. railenensis* possuem capacidade de fermentar glicose e galactose, porém não sacarose, apesar de apresentarem crescimento em meio com esse carboidrato, bem como em substratos contendo glicose, galactose, maltose, xilose. Podem ser isoladas a partir de frutos, flores, sidra, uva e vinhos e podem estar associadas a insetos. Apresentam potencial para uso como agente de controle biológico pós-colheita em citrus e maçãs. Não foram encontrados dados sobre sua patogenicidade em humanos (CHAVANOVA, 2011; LACHANCE et al., 2011). *Y. lipolytica*, ao contrário, não apresenta capacidade de fermentar carboidratos mas apresentam crescimento em substrato líquido contendo glicose, etanol, glicerol, manitol. São encontradas em uma grande variedade de ambientes, como milho, produtos cárneos, solo, ambientes marinhos. São reconhecidas produtoras de proteases, lipases, ácido cítrico (KURTZMAN, 2011b).

*C. zeylanoides* não apresentam capacidade fermentativa porém, da mesma forma que outras espécies não fermentativas, possuem capacidade de crescimento na presença de glicose, glicerol, manitol. Podem ser isoladas de águas, seres vivos, produtos cárneos, laranja, mosto de uva. Pelo fato de sua fonte de isolamento incluir espécies de origem clínica e hospitalar, há a possibilidade de ação patogênica oportunista em seres humanos (DIAZ et al., 2013; LACHANCE et al., 2011; OBASI et al., 2014).

Leveduras da espécie *Dipodascus geotrichum* apresentam ausência ou baixa capacidade fermentativa de glicose e galactose mas crescem na presença dos mesmos, além de etanol, glicerol, manitol. Comumente são encontrados em substratos com alta umidade como frutos e tomates, causando podridão. Podem também ser encontrados em produtos lácteos, solo poluído com petróleo, insetos. Algumas cepas apresentam produção de lipase e por tal capacidade é utilizado na

maturação de queijos. Há algumas desordens alimentares descritas relacionadas à espécie devido a seu consumo, sendo classificada como patogênica biossegurança nível I (de HOOG; SMITH, 2011). Zhu e colaboradores (2016) aplicaram isolados de *Dipodascus* em vinhos e licores, obtendo aumento na diversidade e concentração de ésteres e diminuição de álcoois superiores, o que acarretou em produtos mais frutados. Aromas frutados de melão, abacaxi e maçã foram produzidos por cepas de *Dipodascus* (MDAINI et al., 2006; SUTANI et al., 2015).

## 5.7 PRODUÇÃO E SENSIBILIDADE À TOXINA KILLER

Os resultados dos isolados testados quanto à produção e sensibilidade à toxina *killer* podem ser visualizado na Tabela 6 e na Figura 14.

Apenas o isolado 173-1 (*Meyerozyma caribbica/guilliermondii*) não apresentou atividade *killer* contra 4 leveduras oriundas da UFRGS, QU 11 (*Yarrowia lipolytica*), QU 18 (*Candida catenulata*), QU 30 (*Kluyveromyces lactis*) e QU 139 (*Trichosporum japonicum*). Por outro lado, o isolado 199 (*H. valbyensis*), apresentou atividade *killer* em agar mosto de maçã contra diferentes leveduras, 176 e 179-1 (*Y. lipolytica/C. railenensis*), Villa 3-2 (*C. zeylanoides*) e CCT 0765 (*S. cerevisiae*). O isolado Villa 3-2 ainda apresentou atividade contra o isolado CCT 3437 (*C. kefir*).

Os resultados encontrados no presente ensaio, onde mesmas espécies de levedura apresentaram comportamento distinto para a produção, neutralidade ou sensibilidade à toxina, está em consoante acordo com a indicação de que o comportamento é totalmente variável e diverso entre leveduras (LIU et al., 2013). Dois isolados de *K. lactis* não apresentaram sensibilidade à ação *killer* do isolado 176 (*Yarrowia lipolytica* ou *Candida railenensis*), da mesma forma que o isolado 173-1 (*Meyerozyma caribbica* ou *M. guilliermondii*) não expressou a característica, enquanto outros dois isolados da mesma espécie inibiram o crescimento de 4 leveduras.

A cepa comercial Arome Plus, uma *S. cerevisiae*, é identificada como sendo produtora da toxina, porém em nenhum dos oito isolados apresentou sensibilidade quando testadas com essa levedura. Nenhum dos oito isolados teve ação *killer* contra qualquer das 4 cepas comerciais utilizadas.

A utilização do isolado 199 (*H. valbyensis*) deve ser realizada com cautela no caso de fermentação mista, pois a mesma inibe o crescimento de diferentes espécies de leveduras.

Tabela 6. Resultado do ensaio de atividade *killer* dos isolados de levedura

	151	170-1	173-1	173-2	176	179-1	199	Villa 3-2
151		N	N	N	N	N	N	N
170-1	N		N	N	N	N	N	N
173-1	N	N		N	N	N	N	N
173-2	N	N	N		N	N	N	N
176	N	N	N	N		N	S	N
179-1	N	N	N	N	N		S	N
199	N	N	N	N	N	N		N
Villa 3-2	N	N	N	N	N	N	S	
Charmat	N	N	N	N	N	N	N	N
Cryoaromae	N	N	N	N	N	N	N	N
Arome Plus	N	N	N	N	N	N	N	N
Perlage BB	N	N	N	N	N	N	N	N
CCT 0761	N	N	N	N	N	N	N	N
CCT 0765	N	N	N	N	N	N	S	N
CCT 2369	N	N	N	N	N	N	N	N
CCT 3437	N	N	N	N	N	N	N	S
QU 11	S	S	N	S	S	S	S	S
QU 18	S	S	N	S	S	S	S	S
QU 30	S	S	N	S	S	S	S	S
QU 73	N	N	N	N	N	N	N	N
QU 103	N	N	N	N	N	N	N	N
QU 134	N	N	N	S	N	N	N	N
QU 139	S	S	N	S	S	S	S	S

Nota: N: neutro; S: sensível. Nomes nas linhas indicam os isolados inoculados pontualmente nas placas que continham os isolados das colunas

Figura 14. Placa de petri com agar mosto de maçã com resultado para expressão da atividade *killer*



## 5.8 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE SIDRA

O isolado 173-1 (*Meyerozyma caribbica* ou *M. guilliermondii*), que apresentou perfil aromático semelhante às comerciais, baixa capacidade fermentativa e comportamento de tolerância à temperatura e etanol similar aos outros 2 isolados da mesma espécie, foi descartado para posteriores estudos.

Os gráficos com os comportamentos de cada isolado tanto em cultivo agitado (A) quanto fermentativo (F) podem ser encontrados na figura 17, no APÊNDICE C.

Na tabela 7 são apresentados os resultados de análise físico-química dos fermentados de maçã elaborados com os isolados selecionados com potencial para a aplicação na produção de sidra. Também são apresentados os dados obtidos de fermentações mistas realizadas com os isolados 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) e Villa 3-2 (*C. zeylanoides*), que apesar de apresentarem bom perfil aromático não são leveduras com capacidade de fermentar os açúcares do mosto de maçã. A cofermentação e a fermentação sequencial foram realizadas com a inoculação de levedura autóctone-*S. bayanus* (Cryoaromae) na razão de 1000:1, com inóculo inicial de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  do isolado autóctone. A inoculação sequencial ocorreu no 3º dia de fermentação.

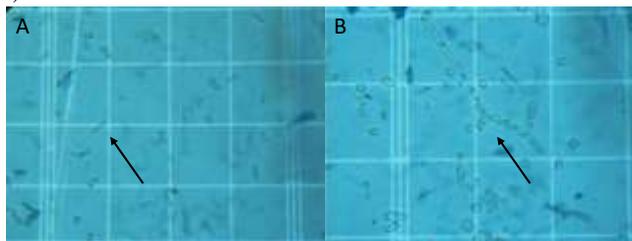
Observa-se que 3 isolados, 176, 179-1 (*C. railenensis*/*Y. lipolytica*) e 199 (*H. valbyensis*), atingiram a exaustão dos açúcares ao final dos 60 dias de cultivo. O cultivo fermentativo de *H. valbyensis* consumiu os açúcares em cerca de 10 dias (Apêndice C), mesmo período em que a quase totalidade das células perderam a viabilidade ao atingirem produção de etanol de 4 %, com total de células máximo de cerca de  $2 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Xu e colaboradores (2006) obtiveram valores semelhantes para o máximo de células, porém com teores de etanol de 6 % ao utilizarem essa espécie em fermentações de sidra, provavelmente pela maior concentração inicial de açúcares do mosto utilizado (22º BRIX). A partir das informações obtidas para os isolados 176 e 179-1 é possível sanar sua dupla identificação, pois *C. railenensis* possui capacidade de fermentar glicose, produzindo álcool, enquanto *Y. lipolytica* não possui essa capacidade (KURTZMAN, 2011b; LACHANCE et al., 2011).

Os demais isolados autóctones apresentaram diferença estatística entre os cultivos agitado e fermentativo para todos os parâmetros analisados. As concentrações de açúcares redutores totais (ART) e de glicose ao final de 14 dias e também após dois meses de cultivo atesta que esses isolados, caso sejam aplicados para a produção de sidra, devem ser utilizadas em conjunto com uma levedura que consiga exaurir os açúcares rapidamente, como o isolado 199 (*H. valbyensis*) e os isolados comerciais de *Saccharomyces*.

Os valores de álcool ao final dos cultivos tanto agitados quanto fermentativos podem ser explicados pela baixa capacidade de produção por parte dos isolados e também pelo longo tempo de processo (60 dias), o que provavelmente levou à evaporação desse composto, principalmente quando sob agitação.

O isolado 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) foi o único que apresentou maior consumo de substrato no cultivo fermentativo em comparação ao agitado, foi também o único que não apresentou consumo de carboidratos em cultivo agitado, não diferindo estatisticamente do suco de maçã, mesmo ao longo de 60 dias. Apesar do maior consumo de açúcares, o total de células foi menor em relação ao cultivo agitado, gerando praticamente a metade do total de células. Esse resultado pode ser devido à característica dimórfica dessa espécie. No cultivo agitado, pela maior força de cisalhamento, as células se mantiveram na sua maioria apenas na forma unicelular, enquanto no cultivo estático, ocorreu aumento do tamanho das células e diferenciação de algumas células em hifas, como pode ser observado na Figura 15 abaixo.

Figura 15. Imagem em microscópio óptico das células do isolado 173-2 (*Dipodascus geotrichum*)



Nota: A) célula em cultivo agitado (10 dias); B) célula em cultivo estático (10 dias)

Para período mais curto, de 14 dias de processo, o isolado Villa 3-2 (*C. zeylanoides*) em cultivo fermentativo também não diferiu estatisticamente do suco de maçã, o que confirma que a espécie não

é capaz de metabolizar rapidamente os açúcares presentes no suco de maçã.

A partir dos dados experimentais de crescimento celular e consumo de açúcares foi calculada a velocidade média de crescimento e de consumo pois o comportamento cinético apresentado por essas leveduras não permitiu a determinação de um período de crescimento exponencial (velocidade constante) para determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu$  máximo) e também adequação em modelos cinéticos existentes, como Monod. Com a obtenção das velocidades médias, período onde foi detectada velocidades positivas a partir das derivadas dos pontos experimentais, foi calculado o fator de conversão de carboidrato em células ( $Y_{x/s}$ ). Valores elevados para conversão é um indicativo de que não ocorreu fermentação. As equações dos ajustes da regressão para cada cultivo, agitado e fermentado, cofermentação (C) e fermentação sequencial (S) são apresentadas no APÊNDICE D e os valores de velocidade média de crescimento celular e de consumo de açúcares, bem como dos fatores de conversão calculados são apresentadas na tabela 8.

Tabela 7. Análises físico-químicas dos fermentados de maçã no 14º dia e ao final do estudo (60 dias).

Isolado	Cultivo	ART (14 dias) (g.L <sup>-1</sup> )	ART (60 dias) (g.L <sup>-1</sup> )	Glicose (14 dias) (g.L <sup>-1</sup> )	Glicose (60 dias) (g.L <sup>-1</sup> )	Alcool final (%)
Suco de maçã		110,30 <sup>a</sup> ± 8,93	110,30 <sup>a</sup> ± 8,93	22,09 <sup>a</sup> ± 3,55	22,09 <sup>a</sup> ± 3,55	
151	Agitado	77,70 <sup>d</sup> ± 5,29	22,22 <sup>e</sup> ± 0,77	10,53 <sup>ab</sup> ± 1,10	0,43 <sup>c</sup> ± 0,75	0,00 ± 0,00
151	Fermentativo	107,92 <sup>b</sup> ± 0,96	38,08 <sup>d</sup> ± 0,69	16,98 <sup>bc</sup> ± 0,53	0,00 ± 0,00	1,12 <sup>i</sup> ± 0,05
170-1	Agitado	90,42 <sup>c</sup> ± 4,36	7,94 <sup>g</sup> ± 0,77	11,63 <sup>d</sup> ± 2,07	0,03 <sup>c</sup> ± 0,05	0,11 <sup>k</sup> ± 0,01
170-1	Fermentativo	93,74 <sup>bc</sup> ± 8,46	10,34 <sup>f</sup> ± 0,70	13,20 <sup>cd</sup> ± 0,31	0,03 <sup>c</sup> ± 0,05	1,31 <sup>h</sup> ± 0,02
173-2	Agitado	108,72 <sup>a</sup> ± 2,55	104,65 <sup>ab</sup> ± 0,99	21,55 <sup>a</sup> ± 3,81	20,39 <sup>a</sup> ± 2,11	0,11 <sup>k</sup> ± 0,01
173-2	Fermentativo	82,93 <sup>cd</sup> ± 5,02	53,60 <sup>e</sup> ± 0,47	6,24 <sup>g</sup> ± 0,61	1,72 <sup>e</sup> ± 0,22	1,15 <sup>i</sup> ± 0,05
176	Agitado	65,40 <sup>e</sup> ± 2,85	0,00 ± 0,00	5,26 <sup>g</sup> ± 0,95	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
176	Fermentativo	37,58 <sup>g</sup> ± 3,59	0,16 <sup>h</sup> ± 0,01	3,36 <sup>gh</sup> ± 0,75	0,00 ± 0,00	1,70 <sup>g</sup> ± 0,03
179-1	Agitado	60,71 <sup>ef</sup> ± 2,10	0,00 ± 0,00	7,18 <sup>ef</sup> ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,10 <sup>k</sup> ± 0,00
179-1	Fermentativo	53,27 <sup>f</sup> ± 0,76	0,74 <sup>h</sup> ± 0,13	5,79 <sup>g</sup> ± 0,49	0,00 ± 0,00	1,62 <sup>g</sup> ± 0,02
199	Agitado	10,61 <sup>h</sup> ± 0,83	0,00 ± 0,00	0,34 <sup>h</sup> ± 0,32	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
199	Fermentativo	1,84 <sup>h</sup> ± 0,76	1,84 <sup>gh</sup> ± 0,76	1,12 <sup>h</sup> ± 0,77	1,12 <sup>c</sup> ± 0,77	4,01 <sup>e</sup> ± 0,02
Villa 3-2	Agitado	88,16 <sup>cd</sup> ± 5,50	33,36 <sup>d</sup> ± 0,54	14,56 <sup>cd</sup> ± 1,19	0,99 <sup>c</sup> ± 0,07	0,00 ± 0,00
Villa 3-2	Fermentativo	102,76 <sup>ab</sup> ± 3,07	99,09 <sup>b</sup> ± 0,43	19,61 <sup>ab</sup> ± 0,73	16,64 <sup>b</sup> ± 0,75	0,35 <sup>i</sup> ± 0,05
Arome Plus	Fermentativo	2,28 <sup>h</sup> ± 0,25	3,97 <sup>gh</sup> ± 0,74	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	6,62 <sup>abc</sup> ± 0,03
Cryoaromae	Fermentativo	1,69 <sup>h</sup> ± 0,06	3,04 <sup>gh</sup> ± 0,58	0,01 <sup>h</sup> ± 0,01	0,00 ± 0,00	6,52 <sup>c</sup> ± 0,03
Perlage BB	Fermentativo	2,09 <sup>h</sup> ± 0,46	3,40 <sup>gh</sup> ± 0,32	0,23 <sup>h</sup> ± 0,40	0,15 <sup>c</sup> ± 0,26	6,63 <sup>abc</sup> ± 0,06
Charmat	Fermentativo	2,51 <sup>h</sup> ± 0,41	2,86 <sup>gh</sup> ± 0,44	0,04 <sup>h</sup> ± 0,04	0,13 <sup>c</sup> ± 0,19	6,57 <sup>bc</sup> ± 0,06
173-2	Cofermntação	2,41 <sup>h</sup> ± 0,05		0,00 ± 0,00		6,62 <sup>ab</sup> ± 0,03
173-2	Fermentação sequencial	53,42 <sup>f</sup> ± 0,84		5,95 <sup>g</sup> ± 0,25		3,67 <sup>i</sup> ± 0,03
Villa 3-2	Cofermntação	2,06 <sup>h</sup> ± 0,04		0,02 <sup>h</sup> ± 0,04		6,67 <sup>a</sup> ± 0,03
Villa 3-2	Fermentação sequencial	33,38 <sup>g</sup> ± 0,68		3,02 <sup>gh</sup> ± 0,31		4,72 <sup>d</sup> ± 0,03

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as amostras para a análise de variância e teste de diferenciação de médias de Tukey (p<0,05)

Tabela 8. Fator de conversão de substrato em células dos isolados de levedura. A letra A após a identificação do isolado indica cultivo agitado. A letra F indica cultivo fermentativo. Cofermentação (C) indica que a inoculação de ambas as leveduras foi realizada simultaneamente. Fermentação sequencial (S) indica que a inoculação da cepa comercial de *S. bayanus* foi realizada 3 dias após o início do cultivo

Levedura	$\mu X$ médio (dia <sup>-1</sup> )	$\mu S$ médio (dia <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$
170-1 A	0,16	1,71	0,09
170-1 F	0,13	6,59	0,02
173-2 A	0,31	0	a
173-2 F	0,11	0	a
151 A	0,38	2,73	0,14
151 F	0,11	2,84	0,04
176 A	0,10	0,48	0,20
176 F	0,10	2,51	0,04
179-1 A	0,17	0,34	0,50
179-1 F	0,10	3,14	0,03
Villa 3-2 A	0,11	0,76	0,41
Villa 3-2 F	0,11	0,62	0,18
199 A	0,15	0,65	0,23
199 F	0,65	3,05	0,22
Cryoaromae 14 dias	0,77	3,64	0,21
173-2 C <sup>1</sup>	0,33	1,03	0,32
173-2 C <sup>2</sup>	1,21	5,94	0,20
173-2 S <sup>1</sup>	0,13	0,76	0,17
173-2 S <sup>2</sup>	0,56	3,74	0,15
Villa 3-2 C <sup>1</sup>	0,33	5,42	0,06
Villa 3-2 C <sup>2</sup>	0,75	4,72	0,16
Villa 3-2 S <sup>1</sup>	0,41	5,90	0,07
Villa 3-2 S <sup>2</sup>	0,60	9,82	0,06
Arôme Plus	0,19	1,43	0,13
Perlage BB	0,26	2,14	0,12
Charmat	0,15	1,73	0,09
Cryoaromae	0,17	1,53	0,11

Nota: <sup>1</sup> Isolado autóctone; <sup>2</sup> Levedura comercial; <sup>a</sup> não foi possível calcular

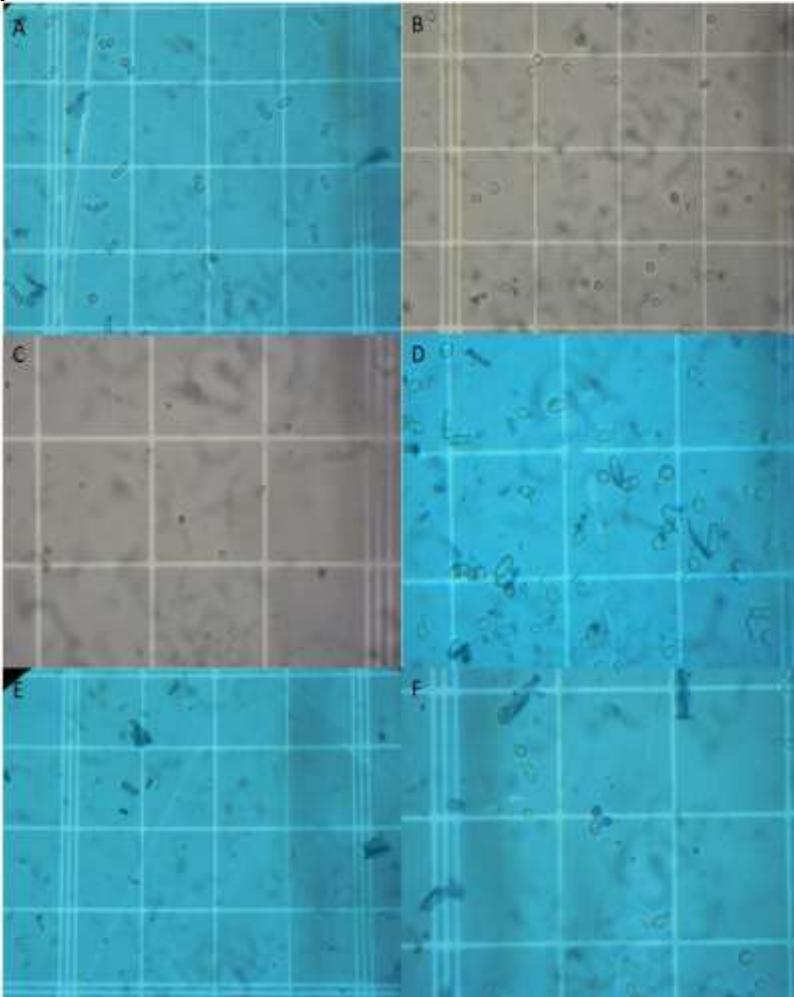
Para uma eventual produção de sidra, utilizando apenas os isolados autóctones identificados, com base nos resultados dos testes de tolerância à temperatura e etanol, produção de H<sub>2</sub>S, capacidade fermentativa, produção e sensibilidade à toxina *killer*, e principalmente, análise olfativa, nenhum isolado apresenta sozinho todas as características desejadas.

O isolado 199 (*H. valbyensis*) seria o mais indicado para a fermentação com uma única levedura, pois é capaz de fermentar até a exaustão dos açúcares em poucos dias, porém ele apresenta baixa tolerância ao etanol, tanto exógeno quanto endógeno, e também aroma levemente acético e não muito intenso em relação aos outros aromas.

Outra alternativa possível é a utilização dos isolados em fermentações mistas (cofermentação ou sequencial) com uma levedura do gênero *Saccharomyces*. Nessa hipótese, os fatores mais importantes são a produção intensa de aromas agradáveis, não produção ou baixa produção de H<sub>2</sub>S e outros aromas pungentes, e não ter ação *killer* contra a espécie de levedura *Saccharomyces*. Dos isolados, as cepas de *D. geotrichum* e *C. railenensis* são os que apresentam as melhores características. O fato de apresentarem baixa velocidade de crescimento celular e de consumo de açúcares pode ser interessante para não haver competição por substrato com a levedura fermentativa (CIANI et al., 2014; MOREIRA et al., 2008).

Escolhidos os isolados autóctones (173-2 e Villa 3-2) para ensaios de fermentação mista, foi escolhida a cepa comercial Cryoaromae (*S. bayanus*) seguindo os seguintes critérios: apresentar aromas em menor intensidade (figura 10), exaustão rápida dos açúcares presentes no mosto (figura 17) no APÊNDICE C. Também foram selecionados por apresentarem estruturas celulares distintas (tamanho e/ou forma) da *S. bayanus*, facilitando a identificação das células durante a contagem (figura 16).

Figura 16. Imagens de microscopia, aumento de 400x, dos isolados *Dipodascus geotrichum*, *Candida zeylanoides* e *Saccharomyces bayanus* em culturas mistas e puras



Nota: Células de: (A) *Dipodascus geotrichum*; (B) *Saccharomyces bayanus*; (C) *Candida zeylanoides*; (D) Cultivo misto de *D. geotrichum* e *S. bayanus*; (E) Cultivo misto de *C. zeylanoides* e *S. bayanus*; (F) *S. bayanus* com levedura corada (morta)

A concentração de células no momento da inoculação deve ser de tal forma que a levedura com maior velocidade de crescimento não domine o processo desde o início e impeça o crescimento e contribuição do outro micro-organismo (NISSEN et al., 2003). Os ensaios de cofermentação com *S. bayanus* foram realizados com inoculação de *D. geotrichum* ou *C. railenensis* na concentração de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e de *S. bayanus*,  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Os ensaios de inoculação sequencial seguiram a mesma razão entre células, porém com a inoculação de *S. bayanus* ocorrendo no 3º dia. Essa razão e concentrações celulares geralmente encontradas em mostos em que ocorre fermentação espontânea ou em estudos onde são realizadas fermentações mistas (BOKULICH et al., 2012; CABRANES et al., 1990; CAÑAS et al., 2014; COMBINA et al., 2005; COMITINI et al., 2011; LEE et al., 2012; MESTRE et al., 2016).

Os ensaios de cofermentação de *D. geotrichum/S. bayanus* e *C. zeylanoides/S. bayanus* chegaram à exaustão de glicose e açúcares redutores em aproximadamente 7 e 10 dias, respectivamente. A fermentação do mosto com apenas *S. bayanus* exauriu os açúcares redutores no mesmo tempo e glicose em apenas 4 dias. Essa diferença indica uma competição das leveduras pela glicose. Em ambos os cultivos a levedura comercial atingiu menor concentração celular máxima, porém esta se manteve constante e com alta viabilidade por período mais prolongado se comparado à fermentação pura, indicando benefício pela presença do isolado autóctone. A fermentação mista também apresentou graduação alcoólica superior e estatisticamente diferente do cultivo puro de *S. bayanus* (Tabela 7).

O isolado 173-2 (*D. geotrichum*) cresceu até cerca de  $4.10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  na cofermentação, atingindo a mesma concentração cultura pura, porém 6 dias mais rápido, o que pode indicar interação positiva entre as espécies durante esse período. Tanto no cultivo puro como na cofermentação houve queda acentuada da viabilidade celular após o consumo da glicose, indicando afinidade para consumo desse carboidrato e dificuldade de metabolizar frutose e sacarose. O isolado de *C. zeylanoides* (Villa 3-2) apresentou crescimento celular em cofermentação semelhantes a valores alcançados em cultura pura no 3º dia, porém apesar de manter essa concentração por todo o período, a diminuição drástica na viabilidade celular a partir do 2º dia indica uma provável interação negativa com *S. bayanus*. Medina e colaboradores (2012) encontraram que, para as leveduras utilizadas, em proporção 10:1 de leveduras não-*Saccharomyces/Saccharomyces* afetaram o crescimento da levedura *Saccharomyces* e

consequentemente a fermentação, mesmo resultado encontrado quando realizaram inoculação sequencial e atribuem o fato ao consumo de nutrientes essenciais ao crescimento celular. Em estudo com dois isolados de leveduras não-*Saccharomyces* em cofermentações com *S. cerevisiae*, Nissen e colaboradores (2003) atribuem a diminuição da concentração celular das leveduras não-*Saccharomyces* a partir de determinado tempo de fermentação, à interação célula-célula quando a concentração de *Saccharomyces* atingiu  $5.10^7$  células mL<sup>-1</sup>, valor de concentração celular similar ao encontrado nos dois ensaios realizados em cofermentação no presente estudo, o que pode sugerir que também há interação célula-célula entre os isolados e a cepa comercial, mesmo que não seja ação de toxina *killer*.

A inoculação sequencial, em ambos os ensaios não houve exaustão dos açúcares ao final do 14º dia, sendo consumidos apenas cerca de 50 % dos açúcares disponíveis para o cultivo com *D. geotrichum* e 70 % para *C. zeylanoides*. Também houve menor crescimento celular para todas as leveduras em ambos os ensaios. Se as condições do meio fossem as mesmas do ensaio de cofermentação no momento da inoculação da levedura comercial no ensaios sequencial era esperado que houvesse um atraso de cerca de 3 dias para a exaustão completa dos açúcares. Pela não exaustão dos açúcares em ambos os ensaios, o teor alcoólico obtido foi abaixo e estatisticamente diferente dos obtidos pela levedura comercial pura ou mesmo nos ensaios de cofermentação (3,67 % para *D. geotrichum* e 4,74 para *C. zeylanoides*). De modo geral, leveduras com capacidade fermentativa não dependem da respiração para gerar energia para suprir suas necessidades, porém mesmo para leveduras *Saccharomyces*, ambientes anaeróbios impõe restrições e maiores requisitos nutricionais para seu crescimento e um consumo prévio desses nutrientes por parte das leveduras não-*Saccharomyces* pode acarretar em uma fermentação mais lenta. Outro fator é que leveduras não-*Saccharomyces* necessitam de oxigênio disponível para metabolizar carboidratos (van DIJKEN et al., 1993). Esses requisitos por parte das leveduras, podem explicar a ocorrência de uma fermentação mais lenta na inoculação sequencial, pois em cultivo estático, inicialmente há o consumo do oxigênio dissolvido pela levedura inicialmente inoculada (não-*Saccharomyces*) para crescimento celular, tornando o ambiente líquido anóxico e, juntamente com a inoculação de *S. bayanus* em baixa concentração em etapa posterior, a levedura comercial não dispõe de oxigênio

dissolvido ou outro nutriente essencial já consumido para crescimento. Os dados obtidos para a velocidade média de crescimento celular da levedura comercial em ambos os cultivos (1,21 d<sup>-1</sup> para a cofermentação e 0,56 d<sup>-1</sup> para a fermentação sequencial com isolado de *D. geotrichum* e 0,75 d<sup>-1</sup> para a cofermentação e 0,60 d<sup>-1</sup> para a fermentação sequencial com *C. zeylanoides*) ajudam a confirmar a existência de uma fermentação mais lenta quando executada de forma sequencial.

O estudo da cinética de um processo e o conhecimento dos parâmetros permitem uma melhor compreensão e são necessários para que se possa comparar diferentes condições e micro-organismos, também permitem analisar mais facilmente as melhores condições para uma eventual otimização do processo de cultivo dessas leveduras para a aplicação desejada.

Não há na literatura estudos que relatem o uso de qualquer dessas duas espécies em fermentações de mostos de maçã ou mesmo de outras frutas, seja em fermentação espontânea, inoculada pura, mista ou sequencial, o que torna difícil a comparação e também a obtenção de possíveis explicações para tal resposta para a fermentação. Para *D. geotrichum* existem trabalhos com a análise dos voláteis produzidos a partir de cultivo em placas ou meio sintético definido (MDAINI et al., 2006; SUTANI et al., 2015) ou para alteração dos compostos voláteis pela adição da levedura em produto final para envelhecimento (ZHU et al., 2016). Nos três estudos é relatado a produção de compostos voláteis relacionados com aromas de frutas (abacaxi, maçã, melão), indicando o potencial dessa levedura para aplicação em bebidas fermentadas. Em relação à *C. zeylanoides* há poucos trabalhos, e tratam apenas da identificação da espécie em substratos como suco de laranja e fermentação espontânea de vinho, sendo relatadas dificuldades para seu isolamento e cultivo (DÍAZ et al., 2013; OBASI et al., 2014).

Outros estudos com diferentes proporções da levedura autóctone e levedura comercial, intervalo entre inoculações, tempo de fermentação, análise de outros constituintes do mosto são necessários para uma melhor compreensão dos fenômenos que regem a interação entre essas leveduras, bem como para a otimização do processo fermentativo.

## 6 CONCLUSÕES

Do total de 120 isolados autóctones de leveduras provenientes da maleicultura catarinense, não há isolados pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Apenas 10 isolados autóctones apresentam produção de H<sub>2</sub>S baixa ou nula em mosto de maçã e 8 isolados apresentam produção de aromas agradáveis em níveis iguais ou superiores aos 4 isolados comerciais testados quando inoculados em mosto de maçã. Todos os 15 isolados obtidos a partir dos ensaios de produção de H<sub>2</sub>S e aromas agradáveis apresentam baixa tolerância ao etanol exógeno quando em concentração superior a 4 % (v/v).

A produção e sensibilidade à toxina *killer* é variável em isolados da mesma espécie. O isolado 199 (*Hanseniaspora valbyensis*) apresenta atividade *killer* contra 6 isolados de diferentes espécies de levedura nas condições testadas. O isolado 173-1 (*Meyerozyma caribbica/guilliermondii*) não produz toxina *killer* nas condições testadas.

Os isolados 176 e 179-1 são da espécie *Candida railenensis* após diferenciação de *Yarrowia lipolytica* pela cinética de crescimento.

O isolado 199 (*Hanseniaspora valbyensis*) apresenta velocidade consumo de açúcares e de crescimento celular semelhante ao isolado comercial Fermol Cryoaromae (*S. bayanus*) no período de 14 dias em suco de maçã.

Os isolados 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) e Villa 3-2 (*C. zeylanoides*) são produtores de aromas frutados e florais em concentração superior aos isolados comerciais testados.

Cofermentações do isolado Villa 3-2 (*C. zeylanoides*) com levedura comercial Fermol Cryoaromae (*S. bayanus*) e 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) com a mesma levedura comercial, na proporção de 1000:1 de células e temperatura de 20 °C apresentam fermentação completa dos açúcares do mosto de maçã e produção de álcool dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira. Fermentações sequenciais dos mesmos isolados com inoculação da levedura comercial Fermol Cryoaromae após 3 dias na proporção 1000:1 e temperatura de 20 °C não é capaz de exaurir os açúcares do mosto de maçã, restando 50 % e 30 %, para os cultivos com os isolados de 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) e Villa3-2 (*C. zeylanoides*), respectivamente.

No total, 3 isolados apresentam potencial para aplicação na produção de sidra, um como inóculo puro, isolado 199 (*Hanseniaspora valbyensis*), e outros dois, 173-2 (*Dipodascus geotrichum*) e Villa 3-2 (*C. zeylanoides*) em cofermentações a 20 °C por 14 dias.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABPM** – Associação Brasileira de Produtores de Maçãs. Disponível em <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em 19 de setembro, 2017.
- ABRABE** – Associação Brasileira de Bebidas. Disponível em <<http://www.abrabe.org.br>>. Acesso em 11 de setembro, 2011.
- ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.3, p.551-558, 2011.
- ANGIOLETTO, E. **Isolamento e caracterização de leveduras para produção de sidra**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2013.
- ATLAS, R. M. **Handbook of Microbial Media 4th edition**, Florida: CRC Press, 2036p., 2010.
- BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine – a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, special issue, p. 27-51, 2000.
- BELL, S-L.; HENSCHKE, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 242-295, 2005.
- BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNUEF-POMARÈDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulospira delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 312-320.
- BENASSI, M. T.; DAMÁSIO, M. H.; CECCHI, H. M. Avaliação sensorial de vinhas Riesling Itálico nacionais utilizando o perfil livre. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, Campinas Aug./Oct., 1998.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER. The physiological basis of the killer character in yeast. In: GEERTS, S. J. (ed). **Genetics Today, XI International Congress of Genetics**, vol. 1, Pergamon Press. Oxford, pp.202-203, 1963.

- BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUEÑAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter in Applied Microbiology**, v. 24, p. 37-39, 1997.
- BITTENCOURT, C. C.; MATTEI, L. F.; de SANT'ANNA, P. R.; LONGO, O. C.; BARONE, F. M. A cadeia produtiva da maçã em Santa Catarina: competitividade segundo produção e *packing house*. **Revista de Administração Pública**, Rio de Janeiro, v. 45(4), p.1199-222, jul./ago., 2011.
- BOKULICH, N. A.; HWANG, C-F.; LIU, S.; BOUNDY-MILLS, K. L.; MILLS, D. A. Profiling the yeast communities of wine fermentations using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 63, n. 2, 2012.
- BOND, C. Cryopreservation of Yeast Cultures. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. **Methods in Molecular Biology vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, 2nd edition, New Jersey:Humana Press Inc, p.109-117, 2007.
- BRAGA, H. J., SILVA Jr, V. P., PANDOLFO, C., PEREIRA, E. S. Zoneamento de riscos climáticos da cultura da maçã no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v.9 (3), p.439-445, 2001.
- BRASIL. Brasília, Lei nº 6.871, de 04 de Junho de 2009. **Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Diário Oficial da União. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 64, de 23 de Abril de 2008. **Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê**. Diário Oficial da União. 2008.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola**, v. 25, n. 2, 88p. Rio de Janeiro, 2012.
- BRDE - Banco Regional De Desenvolvimento Do Extremo Sul. Superintendência de Planejamento. **Cadeia Produtiva da Maçã no**

- Brasil: Limitações e Potencialidades.** Porto Alegre: BRDE, 44 p., 2011.
- CABRANES, D.; MORENO, J.; MANGAS, J. J. Dynamics of yeast population during cider fermentation in Asturian Region of Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.12, p.3881-3884, 1990.
- CADEZ, N.; SMITH, M. T. *Hanseniaspora* Zikes (1912). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p. 421-434, 2011.
- CAÑAS, P. m. I.; ROMERO, E. G.; PÉREZ-MARTÍN, F.; SESEÑA, S.; PALOP, M. P. Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. **Food Science and Technology International**, v.21, n.3, p.203-212, 2014.
- CARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2001.
- CARVALHO, J. R. F.; SILVA, K. M.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frisante de maçã com característica semelhantes à sidra francesa. **Boletim CEPPA**, v. 28, n. 1, p. 97-114, 2010.
- CASTELLI, T. Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 6, p. 18-20, 1955.
- CHAVANOVÁ, K.; KRAKOVÁ, L.; ZENISOVÁ, K.; TURCOVSKÁ, V.; BREZNÁ, B.; KUČHTA, T.; PANGALLO, D. Selection and identification of autochthonous yeasts in Slovakian wine samples using a rapid and reliable three-step approach. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, p.231-237, 2011.
- CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P.; ZANUS, M. C.; ZORZAN, C.; MARODIN, G. A. B. Caracterização físico-química do mosto e do vinho Moscato Giallo em videiras cultivadas sob cobertura de plástico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.911-916, jul. 2008.
- CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations.

- International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239-245, 2006.
- CIANI, M.; CANONICO, L.; ORO, L.; COMITINI, F. Sequential fermentation using non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. **BIO Web of Conferences**, v. 3, 2014.
- CIANI, M.; COMITINI, F. Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behavior of *Candida stellate* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.619-623, 2006.
- CIANI, M.; MACCARELLI, F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.199-203, 1998.
- CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v. 21, p. 149–155, 2004.
- COMBINA, M.; ELÍA, A.; MERCADO, L.; CATANIA, C. GANGA, A.; MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.237-243, 2005.
- COMITINI, F.; CAPECE, A.; CIANI, M.; ROMANO, P. New insights on the use of wine yeasts. **Current Opinion in Food Science**, v.13, p.44-49, 2017.
- COMITINI, F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.28, p.873-882, 2011.
- CORDERO-BUESO, G.; ARROYO, T.; SERRANO, A.; TELLO, J.; APORTA, I.; VÉLEZ, M. D.; EVA VALERO, E. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 132–139, 2011.

- COTON, E.; COTON, M.; LEVERT, D.; CASAREGOLA, S.; SOHIER, D. Yeast ecology in French cider and Black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, n. 108, p. 130-135, 2006.
- D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. A study of ethanol tolerance in yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, n.4, p. 287-304, 1990.
- da SILVA, G. A.; BERNARDI, T. L.; SCHAKER, P. D. C.; MENEGOTTO, M.; VALENTE, P. Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling And Freeze-Thawing Without Using Chemical Reagents And DNA Purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55 (2), p.319-327, 2012.
- da SILVA, G.A.; da SILVA, M.A.A.A. Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio. **Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa**, Bento Gonçalves: UEPAE de Bento Gonçalves, 1984.
- de HOOG, G. S.; SMITH, M. T. *Dipodascus* de Lagerheim (1982). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study** New York:Elsevier, p. 385-392, 2011.
- DÍAZ, C.; MOLINA, A. M.; NÄHRING, J.; FISCHER, R. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. **BioMed Research International**, v.2013, 13p., 2013.
- DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. 2006. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro - SP. 2006.
- dos SANTOS, C. M. E.; ALBERTI, A.; PIETROWSKI, G. A. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; JORGE, R. M. M. Supplementation of amino acids in apple must for the standardization of volatile compounds in ciders. **Journal of Brewing and Distilling**, v.122, p.334-341, 2016.
- DURIEUX, A., NICOLAY, X., SIMON, J-P. (2005) Application of immobilisation technology to cider production: a review. **Application of Cell Immobilisation Biotechnology**, p. 275-284.
- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – EPAGRI. **Frutas de clima temperado - Situação da safra**

- 2009/2010; Previsão da safra 2010/2011.** Gerência Regional de Videira, Estação Experimental de Videira – EEV, 15 p., 2010.
- FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYONI, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p. 034-1038, 1984.
- FLEET, G. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.11-22, 2003.
- FLEET, G. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, n.8, p.979-995, 2008.
- FUENTEFRIA, A.M. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos.** 2007. 144f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2007.
- FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures 2nd edition**, New York:Springer, 393p., 2007.
- GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, 405-409, 1988.
- GOMBERT, A. K. Apêndice. In: HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial, volume 2 – Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Blucher, 2001, cap. 6, p.114-122.
- GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, p. 2046-2048, 2010.
- GONZÁLEZ, R.; MUÑOZ, R.; CARRASCOSA, A. V. Production of wine starter cultures. In: CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. **Molecular Wine Microbiology**. Londres: Academic Press, 2011. Cap. 11, p. 279-302.

- GOOGLE EARTH.** Disponível em <<http://maps.google.com>>. Acesso em 22 de janeiro, 2015.
- GRAÇA, A.; SANTO, D.; ESTEVES, E.; NUNES, C.; ABADIAS, M.; QUINTAS, C. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. **Food Microbiology**, v. 51, p. 179-185, 2015.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999
- HEARD, G. Novel yeasts in winemaking – looking to the future. **Food Australia**, v.51, n.8, aug. 1999.
- HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds. In: FLEET, G. H. (ed.). **Wine Microbiology and Biotechnology**, Chur: Harwood Academic Publishers, 1993, p. 77-164.
- HERDERICH, M. J.; FRANCIS, I. L.; UGLIANO, M.; SIEBERT, T. E.; JEFFERY, D. W. Analysis and formation of key sulfur aroma compounds in wine. In: QIAN, M.; FAN, X.; MAHATTANATAWEE, K. **Volatile Sulfur Compounds in Food**, Washington: American Chemical Society, p. 267-286, 2012
- HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Volatile compounds in cider: inoculation time and fermentation temperature effects. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 112 (3), p. 210-214, 2006.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia Industrial, volume 2 – Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Blucher, 2001, cap. 6, p.93-122.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil/ coord. Oliveira, O. C.**, v.30, n.1,p.1-81. Rio de Janeiro: IBGE, jan. 2017.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coord. Zenebon, O., Pascuet, N. S. and Tiglea, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020 p., 2008.
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces*

- cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.461-467, 1995.
- KIM, H. R.; KIM, J-H.; BAI, D-H.; AHN, B-H. Feasibility of brewing *Makgeolli* using *Pichia anomala* Y197-13, a Non-*Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22 (12), p. 1749–1757, 2012.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p. 111-120, 1980.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.1 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- KURTZMAN, C. P. *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p. 621-624, 2011a.
- KURTZMAN, C. P. *Yarrowia* van der Walt & von Arx (1980). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p. 927-929, 2011b.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p.87-110, 2011.
- KVITSCHAL, M. V.; DENARDI, F. **Programa de Melhoramento Genético da Macieira na Epagri, Brasil**. Rincón del Colorado, 2014. 71 slides, color. Seminario de Actualización Técnica en Frutales de Pepita. Disponível em: <[http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA\\_LB/Programa Frutícola/Seminario Pepita 2014/02 Kvitschal APRESENTAÇÃO PMGM - INIA.pdf](http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA_LB/Programa_Fruticola/Seminario_Pepita_2014/02_Kvitschal_APRESENTAÇÃO_PMGM_-_INIA.pdf)>. Acesso em: 13 nov. 2015.
- LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma – a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.
- LACHANCE, M-A.; BOEKHOUT, T; SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; KURTZMAN, C. P. *Candida* Berkhout (1923). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p.987-1278, 2011.

- LACHANCE, M-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, New York:Elsevier, p.471-481, 2011.
- LEA, A. G. H. **Cidermaking - an overview**. Disponível em: <<http://www.cider.org.uk/cidermaking.pdf>>. Acesso em: 23 fevereiro 2011.
- LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J-F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production**, New York: Springer Science+Business Media, 2003, cap. 4, p. 59-88.
- LEE, P. R.; CHONG, I. S. M.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Effects of sequentially inoculated *Williopsis saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* on volatile profiles of papaya wine. **Food Research International**, v.45, p.177-183.
- LINDERHOLM, A. L.; FINDLETON, C. L.; KUMAR, G.; HONG, Y.; BISSON, L. F. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.5, p.1418-1427, mar 2008.
- LIU, G. H.; CHI, Z.; WANG, G-Y.; WANG, A-P.; Li, W.; CHI, Z-M. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Critical Reviews in Biotechnology, Early Online**, p.1-13, 2013
- LLARAUDÓ, J.; ROZÉS, N.; BOBET, R.; MAS, A.; CONSTANTINI, M. Low Temperature Alcoholic Fermentations in High Sugar Concentration Grape Musts. **Journal of Food Science**, v. 67 p. 269-273, 2002.
- MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 829-845, 2010.
- MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.
- MAIA, G. B. S.; ROITMAN, F. B. **Fruticultura: a produção de maçã no Brasil**. Informativo Técnico SEAGRI, Rio de Janeiro, n.2 , p. 1-12, nov. 2010.
- MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M. Wine fermentations by immobilized and free cells at different

temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. **Food Chemistry**, v. 80 p. 109-113, 2003.

MANZANARES, P.; VALLÉS, S.; VIANA, F. Non-*Saccharomyces* yeasts in the winemaking process. In: CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. **Molecular Wine Microbiology**. Londres: Academic Press, 2011. Cap. 4, p. 85-109.

MARTINS, P. A. **Análises físico-químicas utilizadas nas empresas de vinificação necessárias ao acompanhamento do processo de elaboração de vinhos brancos**. Trabalho de conclusão de curso. Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Bento Gonçalves-RS, 2007.

MDAINI, N.; GARGOURI, M.; HAMMAMI, M.; MONSER, L.; HAMDI, M. Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.128, p.227-235, 2006.

MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.245-250, 2012.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1033-1037, 2002.

MENDES-FERREIRA, A.; BARBOSA, C.; FALCO, V.; LEÃO, C.; MENDES-FAIA, A. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 571-583, 2009.

MESTRE, M. V.; MATURANO, Y. P.; MERCADO, L.; TORO, M. E.; VAZQUEZ, F.; COMBINA, M. Evaluation of different co-inoculation time of non-*saccharomyces/Saccharomyces* yeasts in order to obtain reduced ethanol wines. **BIO Web of Conferences 7**, 2016.

MONTIMER, R.; POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. **Research in Microbiology**, v. 150, p. 199-204, 1999.

- MOREIRA, N.; MENDES, F.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulfur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as a pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 231-238, 2008.
- MORENO, J. J.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J. M.; MEDINA, M. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast culture. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 181-189, 1991.
- MYCOLOGY ONLINE. *Candida kefir*. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/fungal\\_descriptions/yeasts/candida/candida\\_keyfir.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/fungal_descriptions/yeasts/candida/candida_keyfir.html)>. Acesso em: 09 nov. 2015.
- NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.275-278, 2005.
- NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v.20, p.331-341, 2003.
- NOGUEIRA, A., PRESTES, R. A., SIMÕES, D. R. S., DRILLEAU, J. F., WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina - Ciências Agrárias**, v.24, n. 2, p.289-298, 2003.
- NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In: HUI, Y. H. **Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology**, CRC Press, p. 209-235, 2012.
- OBASI, B. C.; WHONG, C. M. Z.; ADO, S. A.; ABDULLAHI, I. O. Isolation and identification of yeast associated with fermented orange juice. **The International Journal of Engineering and Science**, v.3, n.9, p.64-69, 2014.
- OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT 3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.263-268, 2008.
- PELLICCIA, C.; ANTONIELLI, L.; CORTE, L.; BAGNETTI, A.; FATICHENTI, F.; CARDINALI, G. Preliminary prospection of the

- yeast biodiversity on apple and pear from Northern Italy orchards. **Annals of Microbiology**, v.61, p.965-972, 2011.
- PEREIRA, L. B.; SIMIONI, F. J.; CARIO, S. A. F. Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca da competitividade. **Ensaio FEE**, v. 31, n. 1, p. 209-234, 2010.
- PIETROWSKI, G. A. M. **Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2011.
- PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v.20, p.217-224, 2003.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new Millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. **Yeast**, v.16, p.675-729, 2000.
- RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, n. 8, p. 873-884, 1986.
- RAUHUT, D. Yeast-production of sulfur compounds. In: FLEET, G.H. (Ed). **Wine Microbiology and Biotechnology**. Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 183–223, 1993.
- RECH, S.; CARIO, S. A. F.; AUGUSTO, C. A. Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 42, n. 1, p. 89-106, 2014.
- ROGER, J. M.; SABLAYROLLES, J. M.; STEYER, J. P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.79, n.7, p.804-815, 2002.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.
- ROMI, W.; KEISAM, S.; AHMED, G.; JEYARAM, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v.14, n.52, 2014.

- RYUN, K. H.; KIM, J-H.; BAI, D-H.; AHN, B. Feasibility of brewing *Makgeolli* using *Pichia anomala* Y197-13, a non-*saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.12, p.1749-1757, 2012.
- SALVADÒ, Z., ARROYO-LÓPEZ, F. N., BARRIO, E., QUEROL, A., GUILLAMÓN, J. M. Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.80, p.1155-1161, 2011.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Protocol – Standard ethanol precipitation of DNA in microcentrifuge tubes. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2006.
- SANTUR – Santa Catarina Turismo. Disponível em: < turismo.sc.gov.br>. Acesso em: 16 de outubro de 2015
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnology Industrial, volume 2 – Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Blucher, 2001, cap. 14, p.317-331.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; SCHINDEL, D. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109(16), 1–6, 2012.
- SCHVARCZOVÁ, E.; STEFÁNIKOVÁ, J.; JANKURA, E.; KOLEK, E. Selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of typical Pinot Gris wines. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.56, n.4, p.389-397, 2017.
- SCHÜTZ, M.; KUNKEE, R. E. Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation of wine yeast. **American Journal of enology and Viticulture**, v.28, n.3, p.137-144, 1977.
- SEA, K.; BUTZKE, C.; BOULTON, R. Seasonal variation in the production of hydrogen sulfide during wine fermentations. In: WATERHOUSE, A. L.; EBELER, S. E. **Chemistry of Wine Flavor**, New York: American Chemical Society, p.81-95, 1998.
- SETEL – Secretaria de turismo, esporte e lazer do Rio Grande do Sul. Disponível em: < <http://www.setel.rs.gov.br>>. Acesso em: 16 de outubro de 2015.

- SHARPIES, A. E. Cider and the marketing of the tourism experience in Somerset, England. **Journal of Travel & Tourism Marketing**, v.14, p.49-60, 2003.
- SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições de desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2004.
- SPIROPOULOS, A.; TANAKA, J.; FLERIANOS, I.; BISSON, L. F. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 3, p. 233-248, 2000.
- STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 13-24, 2010.
- STEFANINI, I.; DAPPORTO, L.; LEGRAS, J-L.; CALABRETTA, A.; PAOLA, M.; FILIPPO, C.; VIOLA, R.; CAPRETTI, P.; POLSINELLI, M.; TURILLAZZI, S.; CAVALIERI, D. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.33, p.13398-13403, 2012.
- STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.182-190, 2001.
- SUGITA, T. *Trichosporon* Behrend (1890). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study Volume 3**, New York:Elsevier, p. 2015-2061, 2011.
- SUTANI, A.; UENO, M.; NAKAGAWA, S.; SAWAYAMA, S. Melon aroma-producing yeast isolated from coastal marine sediment in Maizuru Bay, Japan. **Fisheries Science**, v.85, n.5, p.929-936, 2015.
- TAO, N.; GAO, Y.; LIU, Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 668-675, 2011.
- THOMAS, C. S.; BOULTON, R. B.; SILACCI, M. W.; GUBLER, W. D. The effect of elemental sulfur, yeast strain, and fermentation medium

- on hydrogen sulfide production during fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n.2, p. 211-216, 1993.
- TORIJA, M. J, ROZES, N., POBLET, M., GUILLAMON, J. M., MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.47-53, 2003.
- TOSTA, C.D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer**. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.
- TRISTEZZA, M.; VETRANO, C.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; TUFARIELLO, M.; QUARTA, A.; MITA, G.; SPANO G.; GRIECO, F. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.81-92, 2012.
- UGLIANO, M.; FEDRIZZI, B.; SIEBERT, T.; TRAVIS, B.; MAGNO, F.; VERSINI, G.; HENSCKE, P. A. Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in Shiraz fermentation and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4948-4955, 2009.
- UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCKE, P. A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.38, p.423-429, 2011.
- VALLES, B. S.; BEDRIÑANA, R. P.; QUEIPO, A. L.; ALONSO, J. J. M. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiology**, v.25, p.690– 697, 2008.
- van DIJKEN, J. P.; WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.343-352, 1993.
- van UDEN, N. Effects of ethanol on the temperature relations of viability and growth in yeast. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, p. 263-272, 1984.

- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 514-522, 1995.
- WEI, J.; NIU, C.; LIU, B.; YUAN, Y.; YUE, T. Identification and characterization of epiphytic yeasts on apples in China. **RSC Advances**, v.7, p.44766-44772, 2017.
- WANG, N. S. Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric method. Disponível em <<http://eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9d.htm>>
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 315–322, 1990.
- WILLIAMS, K. M.; LIU, P.; FAY, J. C. Evolution of ecological dominance of yeasts species in high-sugar environments. **Evolution**, v.69, p.2079-2095, 2015.
- WŁODARCZYK, S. R.; SOUZA, R. C.; BONFIM, T. M. B.; BRAND, D. Evaluation of Isolated Yeasts from Grapes of Pinto Bandeira Region, Bento Gonçalves (RS) in relation to Production of H<sub>2</sub>S and Fermentation Rate. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p.24-27, 2012.
- WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22, 2008.
- XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.192-196, 2006.
- YAMAOKA, C.; KURITA, O.; KUBO, T. Improved ethanol tolerance of *saccharomyces cerevisiae* in mixedcultures with *kluuyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. **Microbiological research**, v. 169, n. 12, p. 907–914, 2014.
- ZHU, J.; SHI, J. L.; LU, Y.; LIU, L. P.; LIU, Y. L. Application of strains of *Geotrichum* spp. To decrease higher alcohols and to increase esters. **Journal of the Institute of Brewing**, v.122, p.147-155, 2016



## 8 APÊNDICE

## APÊNDICE A – AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA

Quadro 1. Agrupamento dos isolados de levedura de acordo com a capacidade fermentativa segundo teste de análise de variância e teste de diferenciação de médias (Skott-Knott) ( $p < 0,05$ ).

Isolados	Grupo	Isolados	Grupo	Isolados	Grupo
7	1	200-1	2	158	6
160		151		159	
172		204		162	
178		164-2		163	
180		169-1		165	
182		170-1		167	
183		173-1		168	
196		173-2		177	
197		Villa 3		188	
202		181		192	
205		186	194		
209		150-1	195		
210		157-2	199		
157-1		179-2	201		
172-2		190-1	154-1		
200-2		CCT 3437	155-2		
203-1		QU 133	164-1		
203-2		QU 134	169-2		
4 m		QU 37	170-2		
BR 5 bco		Villa 3-1	184-1		
QU 11		Villa 3-3	184-2		
QU 139		Villa 04	185-2		
QU 18		175-1	189-1		
QU 30		BR 2-2	190-2		
SJ1M 01		BR 5 brilho	191-2		
SJ1M 05		BR 6 bco	193-2		
SJ1M 06		QU 103	BR 4		
SJ1M 07		Villa 07	BR 4-4		
SJ1M 08		153	BR 7		
SJ1M 10		176	pomi 2		
SJ1M 11		187	R 5		
SJ1M 12		198	R 6		
SJ1M 13		155-1	R8		
SJ1M 14	179-1	7			
U 4	191-1				
U 5	193-1				
U 6	BR 6-6				
Villa 2	Villa 1				
Villa 3-2	Villa 5-1				
Villa 5-2					
Villa 6					
		A +			
		CCT 0761			
		CCT 0765			
		CCT 2369			
		CHA			
		CRY			
		PER			

## APÊNDICE B – REGRESSÃO DOS DADOS DE PRODUÇÃO DE GÁS POR GRUPO DE LEVEDURA

Tabela 9. Equações obtidas pela regressão dos dados experimentais de produção de gás.

Grupo	Equação	r <sup>2</sup>	Equação referência <sup>a</sup>
1	$\ln y = 0,071 + 0,0282x - 8,3179 \cdot 10^{-5}x^2 + 9,2536 \cdot 10^{-8}x^3$	0,9965	6101
2	$\sqrt{y} = -0,7969 + 0,0913x - 0,0002x^2 + 2,1855 \cdot 10^{-7}x^3$	0,9997	6122
3	$\sqrt{y} = 0,9712 + 0,0718x - 0,00013x^2 + 1,196 \cdot 10^{-7}x^3$	0,9999	6122
4	$\sqrt{y} = -1,098 + 0,09x + 9,3853 \cdot 10^{-7}x^2 - 6,5055 \cdot 10^{-7}x^3 + 1,0799 \cdot 10^{-9}x^4$	0,9998	6123
5	$y = 0,2348 - 0,2794x + 0,016x^2 - 5,149 \cdot 10^{-5}x^3 + 5,145 \cdot 10^{-8}x^4$	0,9999	6001
6	$y = -0,3128 - 0,2359x + 0,028x^2 - 0,0001x^3 + 1,265 \cdot 10^{-7}x^4$	0,9998	6001
7	$y = \frac{2,2903 - 10,0656x + 1,1157x^2}{1 + 0,1393x + 0,0015x^2}$	0,9982	7903

Nota: <sup>a</sup> Número da equação no programa TableCurve 5.01

## APÊNDICE C – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS ISOLADOS SELECIONADOS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE NA PLATAFORMA BLAST

### 151 – *M. caribbica* / *M. guilliermondii*

C TTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTTCCTACCTGATTTGAGG  
 GTCAAAC TTGTTTGGTTGTTGTAAGGCCGGGCCAACAAATACCAGAAATA  
 TCCCGCCACACCATTCAACGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAGAGGT  
 CGACAGCACTACCAGTACTACCCATGCCAATACTTTTCAAGCAAACGCC  
 TAGTTCGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCCGGGGGTTTGAGAGA  
 GAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGCGCAAT  
 GTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTT  
 ATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTG  
 TTGAAAGTTTGAAGATTAATCAAAAATTTGACTATCAATAAAAATAAATT  
 AAATTGTGTTTTGTTAAACCTCTGGCCCAACCTATCTCTAGGCCAAACCA  
 AAGCAAGAGTTCTGTATCAAAAAGACACTGTGTGTAAGGTTTTTCGCCG  
 CGCAGTTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATGATCCTTCCG

### 170-1 – *M. caribbica* / *M. guilliermondii*

T ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTTCCTACCTGATTTGAGGT  
 CAAAC TTGTTTGGTTGTTGTAAGGCCGGGCCAACAAATACCAGAAATATC  
 CCGCCACACCATTCAACGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAGAGGTGCG  
 ACAGCACTATCCAGTACTACCCATGCCAATACTTTTCAAGCAAACGCCTA  
 GTTCGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCCGGGGGTTTGAGAGAGA  
 AATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGCGCAATGT  
 GCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTAT  
 CGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT  
 GAAAGTTTTGAAGATTAATCAAAAATTTGACTATCAATAAAAATAATTA  
 AATTGTGTTTTGTTAAACCTCTGGCCCAACCTATCTCTAGGCCAAACCAA

AGCAAGAGTTCTGTATCAAAAAGACACTGTGTGTAAGGTTTTTCGCCGC  
GCAGTTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATGATCCTTCCGC

173-1 – *M. caribbica* / *M. guilliermondii*

TTTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTTGAGGTC  
AAACTTGTGGTTGTTGTAAGGCCGGGCCAACCAATACCAGAAATATCC  
CGCCACACCATTCAACGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAGAGGTCGA  
CAGCACTATCCAGTACTACCCATGCCAATACTTTTCAAGCAAACGCCTAG  
TTCGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCCGGGGTTTGAGAGAGAA  
ATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGCGCAATGTG  
CGTTCAAAGATTGATGATTCACGAAAACTGCAATTCATATTACTTATC  
GCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG  
AAAGTTTTGAAGATTAATTCAAAATTTGACTATCAATAAAAAATAATTA  
ATTGTGTTTTGTAAACCTCTGGCCCAACCTATCTCTAGGCCAAACCCAAA  
GCAAGAGTTCTGTATCAAAAAGACACTGTGTGTAAGGTTTTTCGCCGC  
AGTTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATGATCCTTCCGC

173-2 – *Dipodascus geotrichum*

TTATACAGCAACAATAATTTTATAGTCAAAAACAAAAAATAAT  
AAAACTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGCAG  
CGAAACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGA  
ACGCACATTGCATTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTGTTGAGCGTT  
GTTTCTCTTGGAAATGCATTGCTTTTCTAAAATATTGAATCAAATTCGT  
TTGAAAAACAACACTATCAACCTCAGATC

176 – *Candida railenensis* / *Yarrowia lipolytica*

TTTTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGT  
CAAACCTTGTGGTTGTTGTAACGGCCGAGCCTGTGTAATAAACAAATAC  
TTTACTGGTCAATGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAAAACAGTTCAGC  
ACTATCTAGTACCACTCATGCCAATACATTTCAAGCAAACGCTTAGTCTG  
ACTAAGAGTATCACTCAAAACCAAATCCGAAGATTTGAGAGAGAAATGA  
CGTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTT  
CAAAGATTCGATGATTACGAAAAATCTGCAATATTAATTAATCTATCGCAT  
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG  
TTTTGAAGATTTTGGATATTAATCAACAAATTGACATAAAAATTAATA  
ACAATTCATAATAAATATTGAAGTTTTGATAAACCTTTGGCCCAACCT  
ATTTCTAAGCCAGACCAAAGCAATAGTTTCAAATTAAAAAACATAGTG  
TGTAAGGTTTTTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTA  
TGATCCTTCC

179-1 – *Candida railenensis* / *Yarrowia lipolytica*

ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAA  
CTTTGTTGTGTTGTAAGGCCGAGCCTGTGTAATAAACAAACTTTTAC  
TGGTCAATGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAAAACAGTTCAGCACTA  
TCTAGTACCACTCATGCCAATACATTTCAAGCAAACGCTTAGTCTGACTA  
AGAGTATCACTCAAAACCAAATCCGAAGATTTGAGAGAGAAATGACGCT

CAAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAA  
 GATTTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCG  
 CTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTT  
 GAAGATTTTTGATATTAATCAACAAATTGACATAAAAATAAAAATAACA  
 ATTCAATAATAAATATTGAAGTTTTGATAAAACCTTTGGCCCAACCTATT  
 TCTAAGCCAGACCAAAGCAATAGTTTTCAAATTAAAAAAACATAGTGTGT  
 AAGTTTTTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATGA  
 TCCTTCCG

199 – *Hanseniaspora valbyensis*

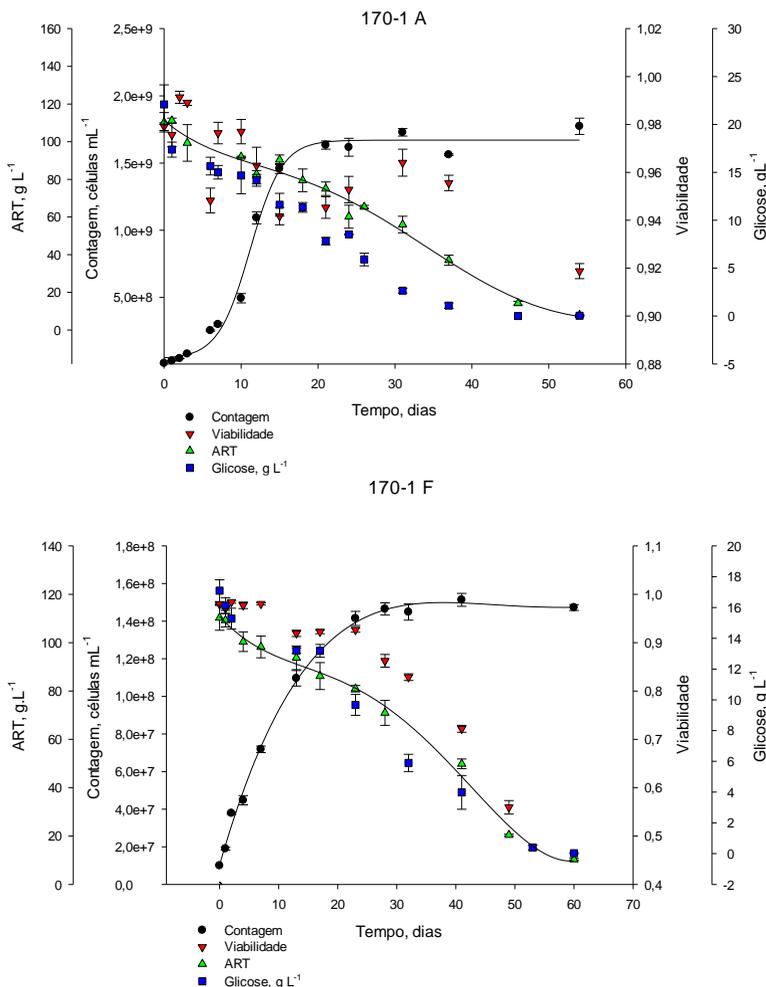
CCTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCCTA  
 CCTGATTTGAGGTCAAACCTTGATGAGTATTA AAAACAACCTTTTGCCTAA  
 GGTACTTTACCGAATCCCTTGCAAATGTAATAATAGACGAATCCATAAAT  
 ACATCACAGCGAGAACAGCGTCTCCAAGAAGCTAAGTGTTGAATTATC  
 AAAGATTAGAAAATCTTCAATTTCAAGCTAACCCCTGAGTATCGCTCACTA  
 CCAAAAAATAAAATCTTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGC  
 TCCCAGGAATACCTGAGAGCGCAATGTGCGTTCAAAAATTCAATGATTC  
 ACGAGTATCTGCAATTCACATTA CTTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCAT  
 CGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTTAAATTAATTTAAA  
 ATTTCCGTTAGGAATTTTGGTTTAGCTTA AAAAATAATAAAAAATTT  
 GTTTGTGTGTGTTTTAACTTTGGGCCCTTGCACCCAAAGCAGAAAGAATT  
 AAGTAGAAAACCTCACACTGTGTGTAGTAGTTGACTGAGATTCAATTA  
 AAATTA CTTACTGAGAGTCTCTGAATAAGCAGCGCAATTAAGCGCACA  
 TCTTAAACTGAAACAACCTCATTTAATTGTA AAAAGATCTTTAAAAGA  
 AACTGAGCAACAAATGATAATCAATCTAATGATCCTTCCGCAGGTC

Villa 3-2 – *Candida zeylanoides*

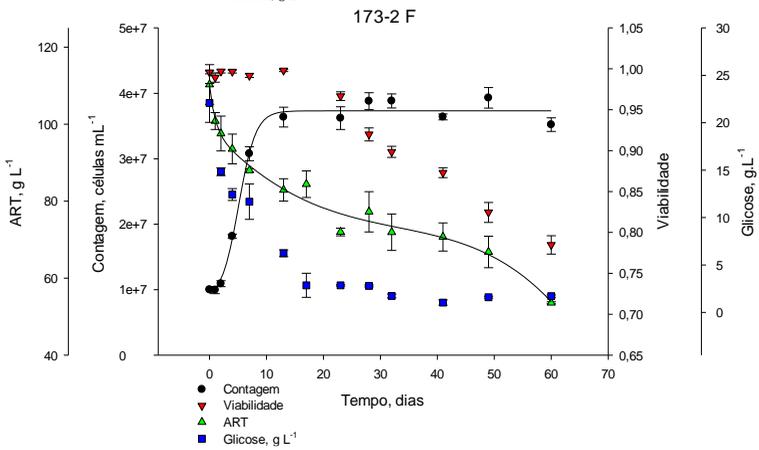
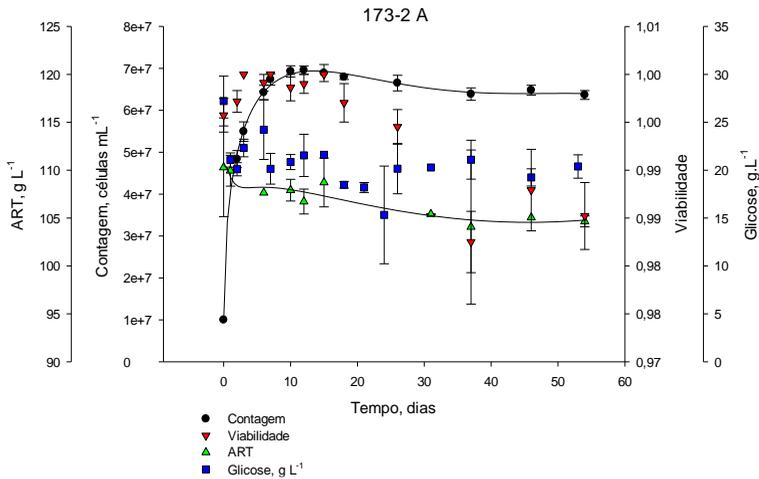
ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAA  
 CTTTGTGTTGTTGTTGTAAGGCCGAGCCTGTGTAATAAAACAAATACTATAC  
 TGGTCAACGAGTTGGATAAACCTAATACATTGAAACAGTTCAGCACTAT  
 CTAGTACCACACTCATGCCAATACATTTCAAGCAAACGCTTAGTCTGACTAA  
 GAGTATCACTCAAAACCAAATCCGAAGATTTGAGAGAGAAATGACGCTC  
 AAACAGGCATGCCCTATGGAATACCATAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
 ATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGC  
 TGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTTG  
 AAGATTTTTGAATTTAATCAACAAATTGACAATATAATTAATTAACAATT  
 CAATAATAAAAATTGAAGTTTTAGTATAAAACCTTTGGCCCAACTCATTT  
 TAAGTCAGACCAAAGCAAAGTTTTCAAATCAAAAAAACATAGTGTGTAA  
 GGTTTTTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATGATC  
 CTTC

## APÊNDICE C – CINÉTICA FERMENTATIVA E AGITADA EM SUCO DE MAÇÃ DOS ISOLADOS DE LEVEDURA COM BOA AVALIAÇÃO SENSORIAL.

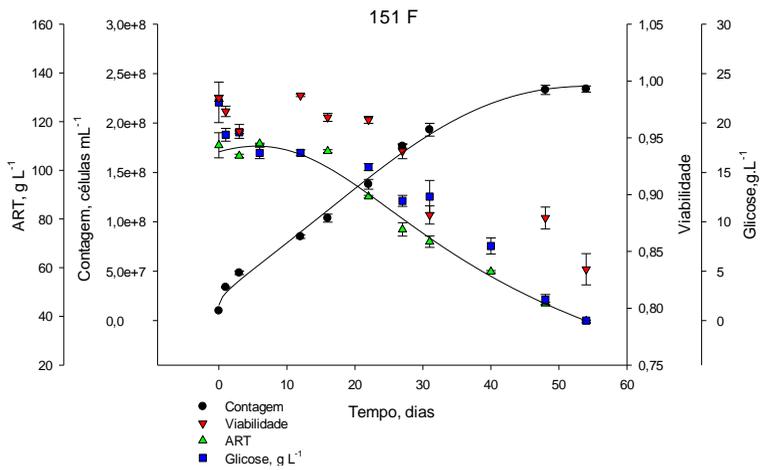
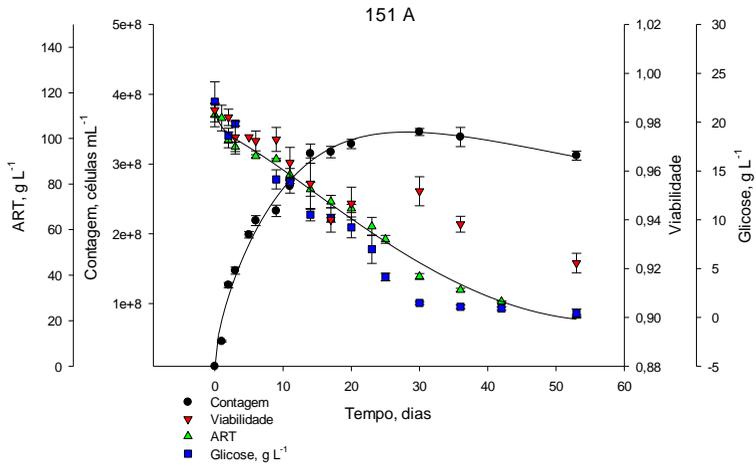
Figura 17. Gráficos de crescimento celular e consumo de carboidratos pelos diferentes isolados em cultivo agitado e sob condições de Fermentação. A letra A após a identificação do isolado indica cultivo agitado. A letra F indica cultivo fermentativo. Cofermentação (C) indica que a inoculação de ambas as leveduras foi realizada simultaneamente. Fermentação sequencial (S) indica que a inoculação da cepa comercial de *S. bayanus* foi realizada 3 dias após o início do cultivo.



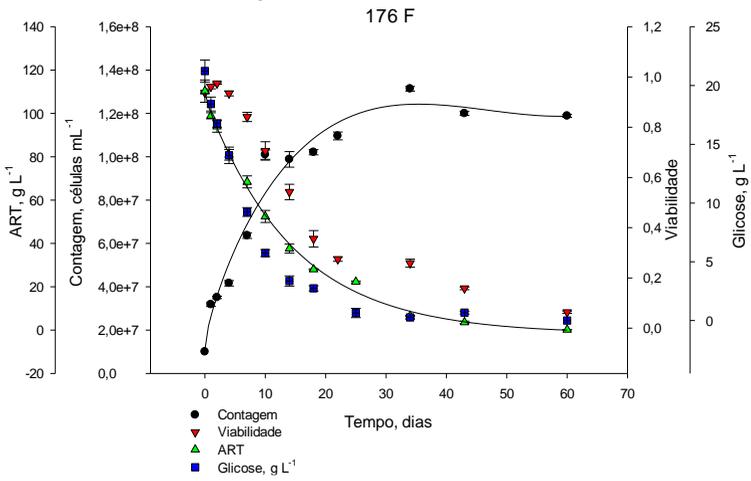
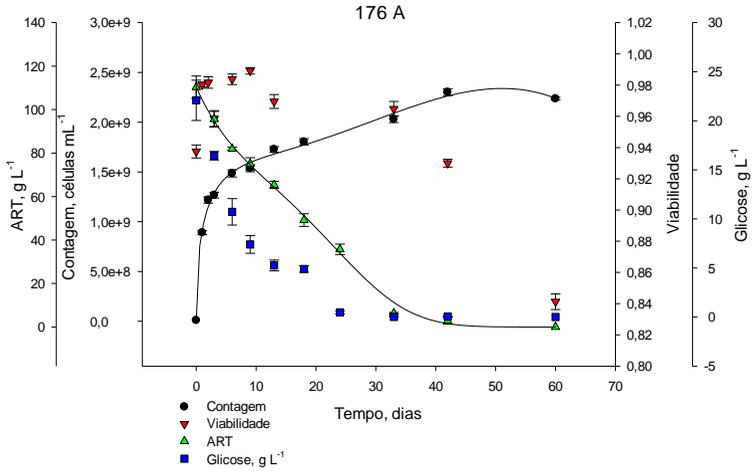
Continuação da Figura 17



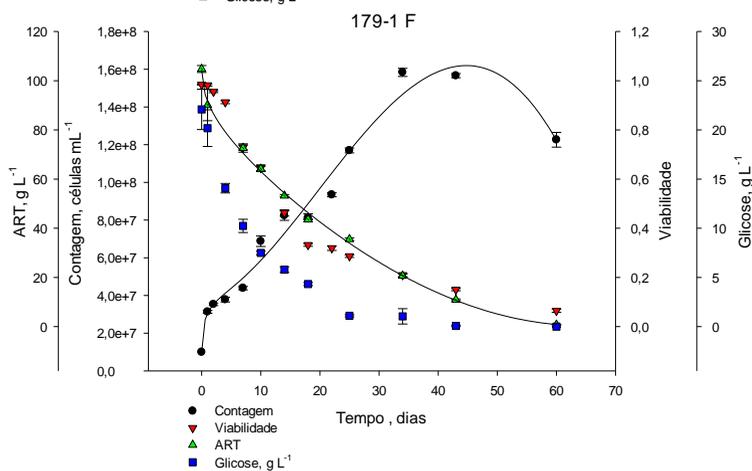
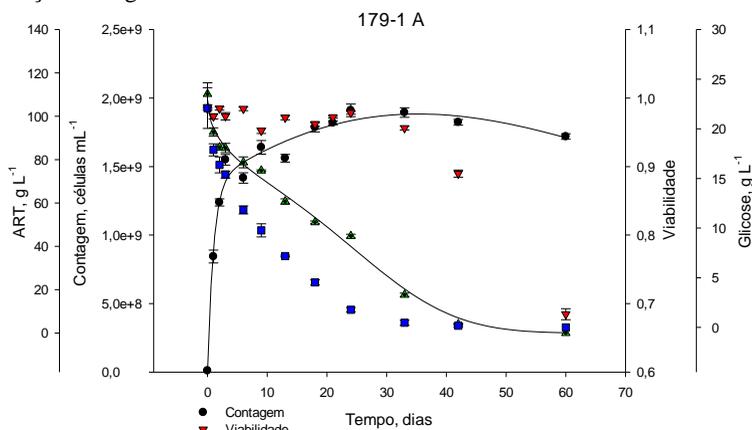
Continuação da Figura 17



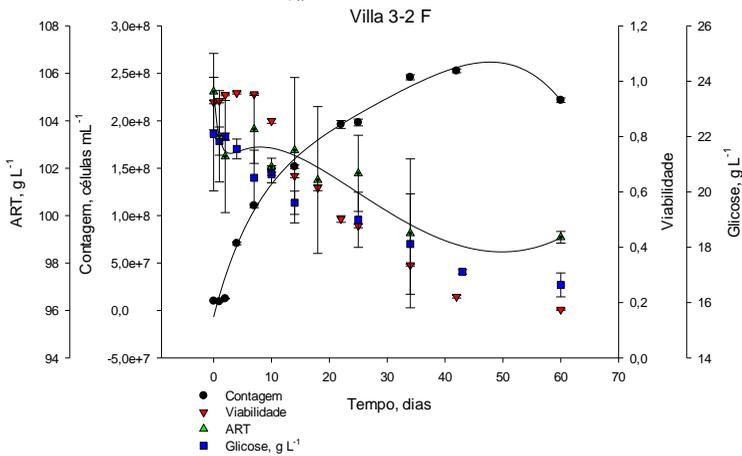
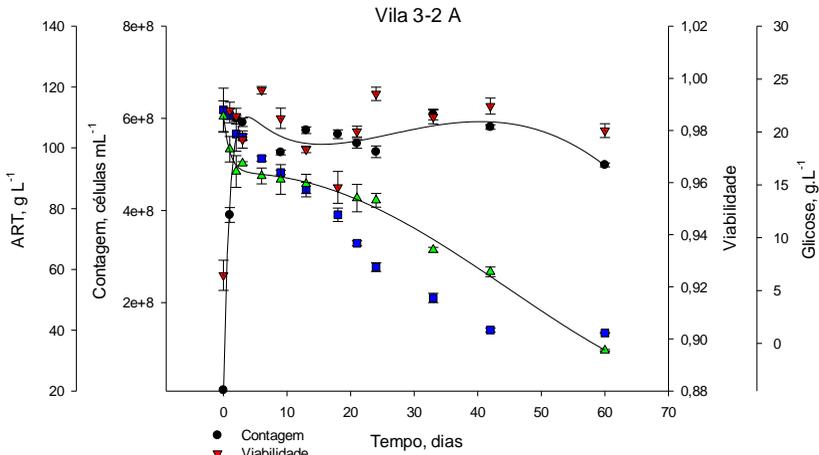
Continuação da Figura 17



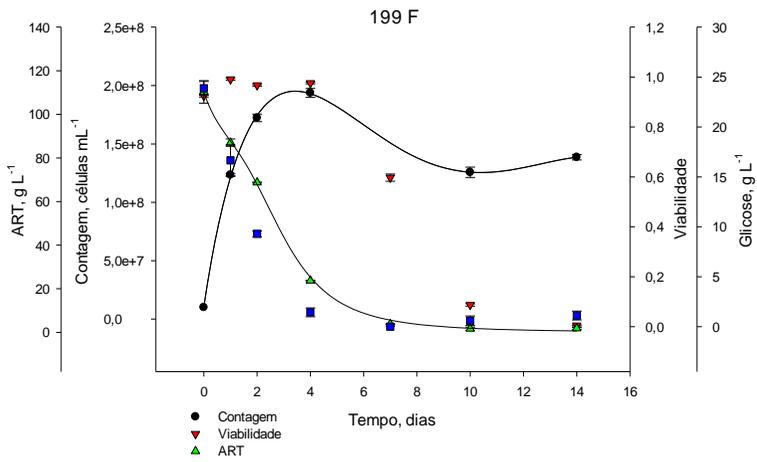
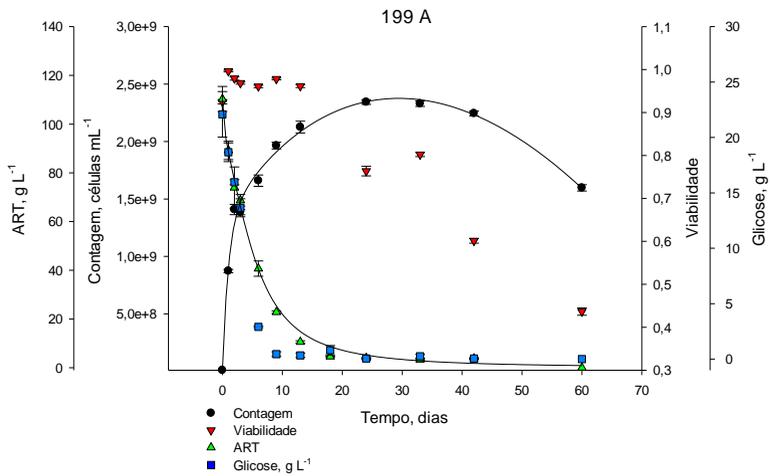
## Continuação da Figura 17



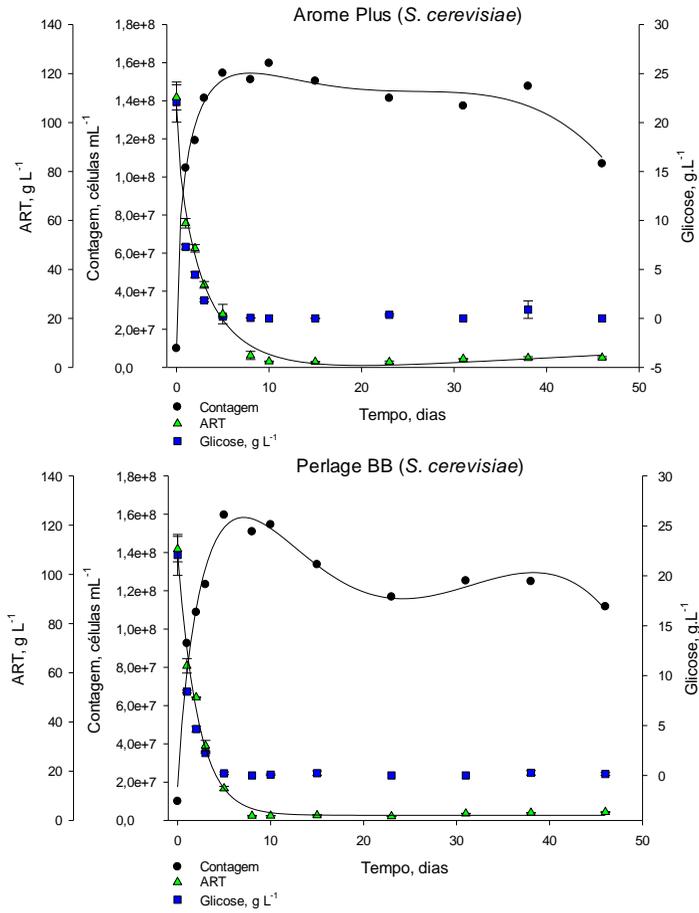
Continuação da Figura 17



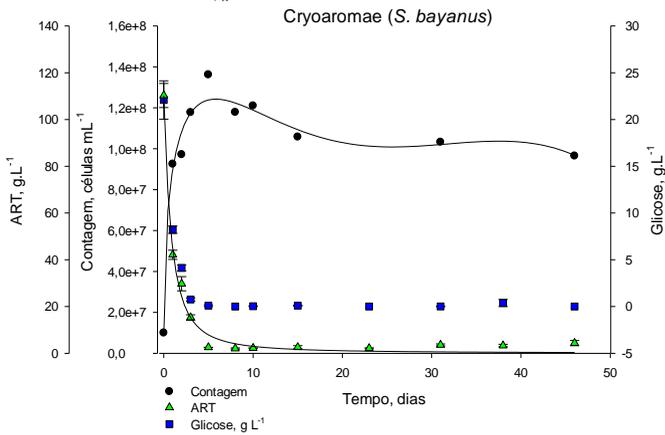
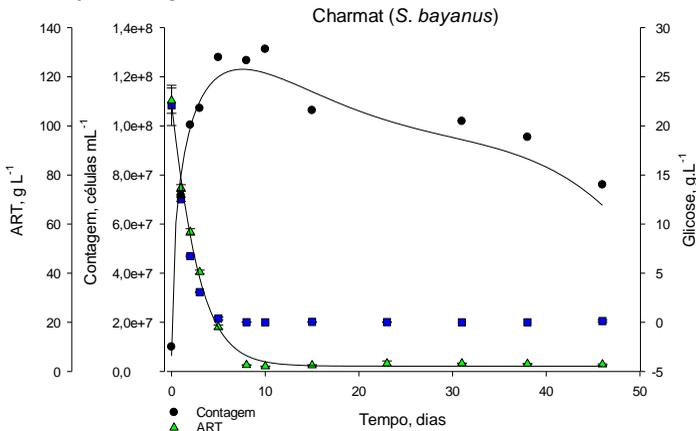
Continuação da Figura 17



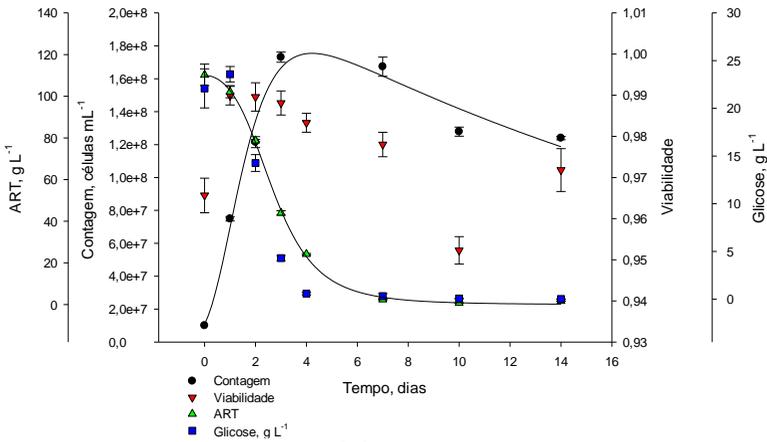
Continuação da Figura 17



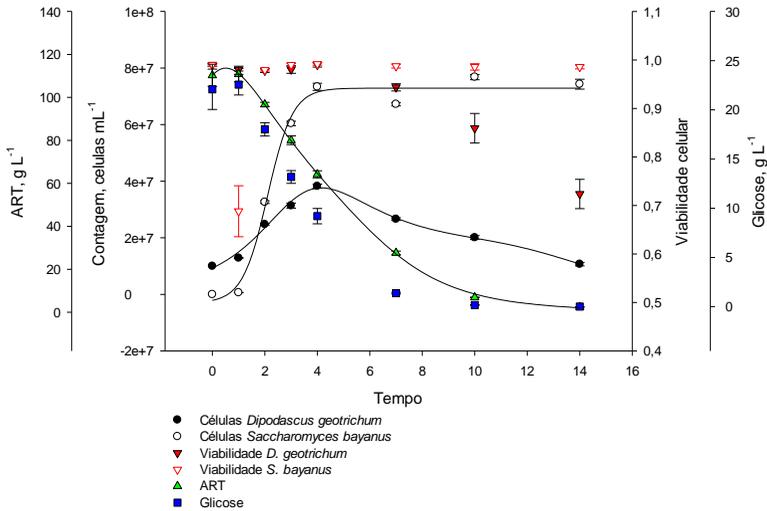
## Continuação da Figura 17



Continuação da Figura 17

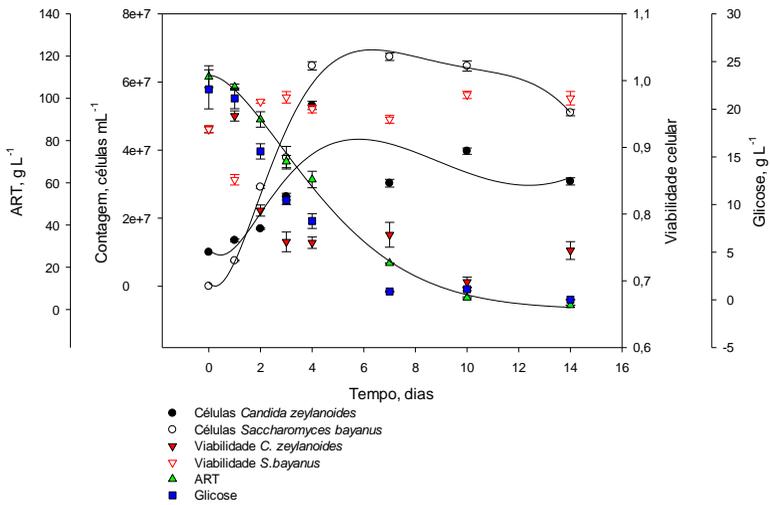
Cryoaromae (*S. bayanus*)

## Cofermentação

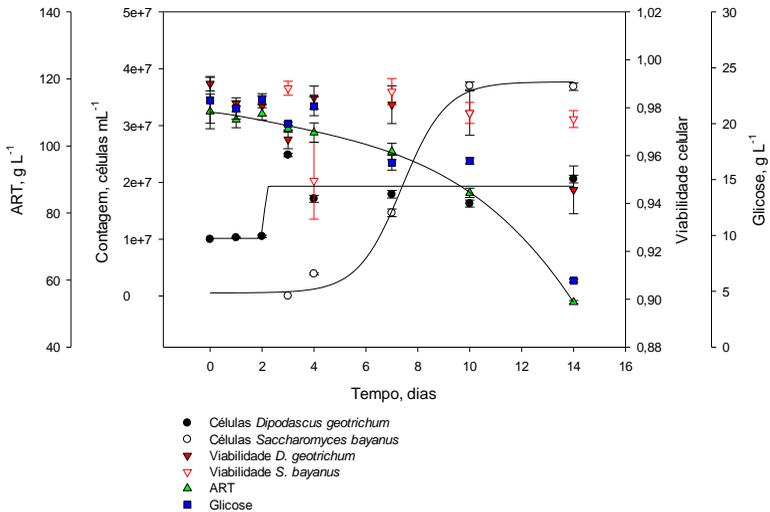


Continuação da Figura 17

### Cofermentação

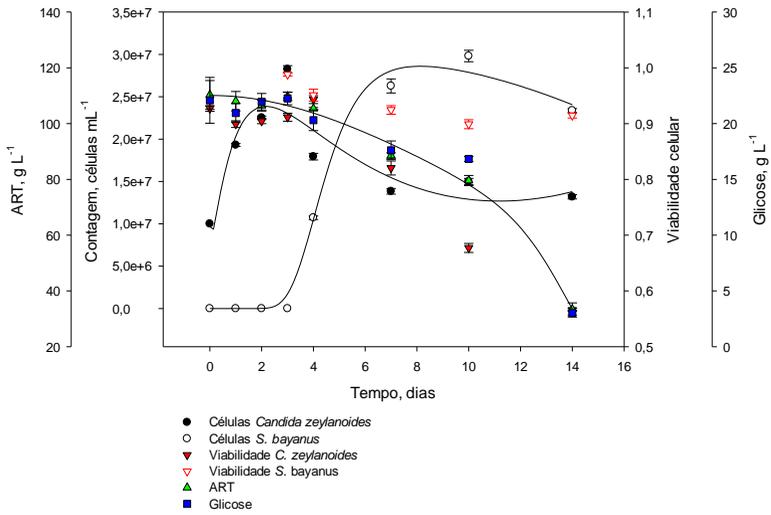


### Fermentação sequencial



Continuação da Figura 17

Fermentação sequencial



## APÊNDICE D – EQUAÇÕES DE AJUSTE DOS DADOS DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE AÇÚCARES DOS ISOLADOS COM BOA AVALIAÇÃO SENSORIAL

Tabela 10. Equações obtidas pelo ajuste dos dados experimentais de crescimento celular. A letra A após a identificação do isolado indica cultivo agitado. A letra F indica cultivo fermentativo. Cofermentação (C) indica que a inoculação de ambas as leveduras foi realizada simultaneamente. Fermentação sequencial (S) indica que a inoculação da cepa comercial de *S. bayanus* foi realizada 3 dias após o início do cultivo

Isolado	Equação	r <sup>2</sup>	Equação referencial <sup>a</sup>
170-1 A	$y = 4,395.10^7 + \frac{1,6267.10^9}{x-11,1814}$	0,9905	8011
170-1 F	$y = 1,032.10^7 + 1,099.10^7x - 3,12.10^5x^2 + 3768,7571x^3 - 16,4544x^4$	0,9969	6001
173-2 A	$y = 9,591.10^6 - 6,016.10^6x + 13067,631x^{2,5} - 1083,3154x^3 + 3,672.10^7x^{0,5}$	0,9980	4585
173-2 F	$y = 8,4425.10^6 + \frac{2,8886.10^7}{1 + e^{-\frac{x-5,1187}{1,4983}}}$	0,9899	8011
151 A	$y = \frac{7,0973.10^6 + 5,4993.10^7x^{0,5}}{1 - 0,2102x^{0,5} + 0,0348x}$	0,9858	87
151 F	$y = \frac{1,5607.10^7 + 6,4086.10^6x^{0,5}}{1 - 0,2263x^{0,5} + 0,0172x}$	0,9948	87
176 A	$y = 1,04.10^7 - 3,236.10^6x + 3,408.10^7x^{1,5} - 16023,6x^3 + 1,197.10^9x^{0,5}$	0,9960	4224
176 F	$y = 1,09.10^7 + 5,8415.10^6x - 2,295.10^5x^2 + 18193,342x^{2,5} + 9,84.10^6x^{0,5}$	0,9683	4346
179-1 A	$y = 1,3783.10^9 + 2,3738.10^7x - 1,1261.10^5x^{2,5} + 8471,0689x^3 - 1,13815.10^9e^{-x}$	0,9804	4594
179-1 F	$y = 9,83.10^6 - 1,31.10^7x + 2,83.10^6x^{1,5} - 23442,62x^{2,5} + 3,098.10^7x^{0,5}$	0,9790	4210
Villa 3-2 A	$y = 7,228.10^6 - 5,036.10^7x + 1,382.10^7x^{1,5} - 1,008.10^6x^2 - 7,19.10^9e^{-x}$	0,9774	4188
Villa 3-2 F	$y = -6,903.10^6 + 2,414.10^7x - 2,06.10^6x^2 + 4,057.10^5x^{2,5} - 23698,15x^3$	0,9855	4341
199 A	$y = 1,268.10^9 + 1,129.10^8x - 1,388.10^7x^{1,5} - 1,257.10^9e^{-x}$	0,9928	2037
199 F	$y = 1,058.10^7 + 1,547.10^8x - 6,546.10^7x^2 + 2,413.10^7x^{2,5} - 2,515.10^6x^3$	0,9995	4341
Cryoaromae1 4 dias	$\ln y = 19,215 - 0,044x - 3,024e^{-x}$	0,9740	1230
173-2 C	(1) $y^{-1} = 1,074.10^{-7} - 5,064.10^{-8}x + 1,082.10^{-8}x^2 - 9,150.10^{-10}x^3 - 2,882.10^{-11}x^4$	(1) 0,9872	6112
	(2) $y = -3.10^6 + \frac{7,59.10^7}{1 + e^{-\frac{x-2,107}{0,477}}}$	(2) 0,9898	8011
173-2 S	(1) $y = 1,01.10^7 + \frac{9,2.10^6}{1 + e^{-\frac{x-2,079}{0,075}}}$	(1) 0,7621	8011
	(2) $y = 5,405.10^5 + \frac{3,715.10^7}{1 + e^{-\frac{x-386}{0,852}}}$	(2) 0,9970	8011
Villa 3-2 C	(1) $y = -7,15.10^7 + 8,87.10^7x - 4,11.10^7x^{1,5} + 5,18.10^6x^2 + 8,17.10^7e^{-x}$	(1) 0,6980	4188
	(2) $\sqrt{y} = -1015,3 + 4373x - 739,2x^2 + 53,595x^3 - 11,438x^4$	(2) 0,9785	6123
Villa 3-2 S	(1) $y = 4,97.10^7 + 98658,6x^2 - 1,48.10^7x^{0,5} - 4,01.10^7e^{-x}$	(1) 0,8034	2614
	(2) $\ln y = 17,232 - 8,593.10^{-5}x^3 - 57,748e^{-x}$	(2) 0,9915	1329
Arôme Plus	$y = 8,636.10^6 - 2,996.10^7x + 5,618.10^5x^2 - 5695x^3 + 1,246.10^8x^{0,5}$	0,9831	4360
Perlage BB	$y = 1,744.10^7 + 1,02.10^9x - 5,033.10^7x^{1,5} + 8,66.10^6x^2 - 5,03.10^5x^{2,5}$	0,9708	4173
Charmat	$y = 6,352.10^6 - 1,948.10^7x + 79829x^{2,5} - 8340,5x^3 + 9,332.10^7x^{0,5}$	0,9725	4585
Cryoaromae	$y = 9,014.10^6 - 2,8.10^7x + 5,143.10^5x^2 - 4605,2x^3 + 1,085.10^8x^{0,5}$	0,9693	4360

Nota: <sup>a</sup> Número da equação no programa TableCurve 5.01

Tabela 11. Equações obtidas pelo ajuste dos dados experimentais de consumo de açúcares redutores totais. A letra A após a identificação do isolado indica cultivo agitado. A letra F indica cultivo fermentativo. Cofermentação (C) indica que a inoculação de ambas as leveduras foi realizada simultaneamente. Fermentação sequencial (S) indica que a inoculação da cepa comercial de *S. bayanus* foi realizada 3 dias após o início do cultivo

Isolado	Equação	r <sup>2</sup>	Equação referência <sup>a</sup>
170-1 A	$\sqrt{y} = 10,55 - 0,165x + 0,009x^2 - 0,0003x^3 + 3,026x^4$	0,9863	6123
170-1 F	$y = 110,892 - 2,729x + 0,144x^2 - 0,0045x^3 + 3,915 \cdot 10^{-5}x^4$	0,9947	6001
173-2 A	$y = 102,94 - 1,32x + 0,095x^{1,5} + 4,81x^{0,5} + 7,59e^{-x}$	0,8959	4288
173-2 F	$y = 98,593 - 1,469x + 0,0098x^{2,5} - 0,0011x^3 + 11,546e^{-x}$	0,9822	4594
151 A	$y = 102,7 - 0,76x^{1,5} + 0,0752x^2 + 8,477e^{-x}$	0,9903	2378
151 F	$y^2 = \frac{11582,4 - 118,47x}{1 - 0,025x + 0,0013x^2}$	0,9867	7122
176 A	$y = 3,95 \cdot 10^6 - 4,205 \cdot 10^8x + 6,712 \cdot 10^7x^{1,5} - 3,803 \cdot 10^6x^2 + 1,287 \cdot 10^9x^{0,5}$	0,9956	4179
176 F	$y = \frac{109,888 - 24,74x^{0,5} + 1,362}{1 - 0,178x^{0,5} + 0,042x}$	0,9975	7933
179-1 A	$\ln y = 4,679 - 2,546 \cdot 10^{-5}x^3 - 0,131x^{0,5}$	0,9937	1320
179-1 F	$y = 104,277 + 1,288x - 0,495x^{1,5} + 0,043x^2 - 13,48x^{0,5}$	0,9981	4179
Villa 3-2 A	$y = 91,777 - 0,0076x^{2,5} + 0,00071x^3 + 18,694e^{-x}$	0,9931	2784
Villa 3-2 F	$y = 101,337 + 0,72x - 0,237x^{1,5} + 0,0179x^2 + 3,89e^{-x}$	0,9251	4188
199 A	$y^{-1} = 0,0091 + 0,0003x^2 + 0,0019x^{0,5}$	0,9963	1485
199 F	$y^{-1} = 0,0091 + 0,003x - 0,0014x^2 + 0,00063x^3$	0,9993	6111
Cryoaromae 14 dias	$y = \frac{110,02 - 0,108x^2}{1 + 0,058x^2 + 0,0109x^4}$	0,9994	7922
173-2 C	$y^{-1} = 0,0091 - 0,00113x + 0,0013x^2 - 0,00024x^3 + 2,348 \cdot 10^{-5}x^4$	0,9998	6112
173-2 S	$y = 110,24 - 1,119x^{1,5} + 0,221x^{2,5} - 0,0584x^3$	0,9975	2395
Villa 3-2 C	$\ln y = 4,707 + 0,038x - 0,0995x^{1,5}$	0,9976	1212
Villa 3-2 S	$y^{-1} = 0,0091 + 3,467x^2 + 1,16 \cdot 10^{-8}e^x$	0,9919	1481
Arôme Plus	$y = \frac{107,06 - 47,52x^{0,5} + 5,4x}{1 - 0,12x^{0,5} + 0,14x}$	0,9937	7503
Perlage BB	$y = 2,077 + \frac{4850,3}{1 + e^{-\frac{x+8,2545}{-2,192}}}$	0,9930	8011
Charmat	$y = 2,166 + \frac{368,63}{1 + e^{-\frac{x+2,022}{-2,255}}}$	0,9967	8011
Cryoaromae	$y = \frac{110,15 + 4,634x}{1 + 1,179x + 0,399x^2}$	0,9904	7902

Nota: <sup>a</sup> Número da equação no programa TableCurve 5.01