

Capacidade fermentativa e análise genética de leveduras de fermentação natural de hidromeis utilizando metodologia de PCR

BENETOLE, Bianca Martins
GOMES, Winston Pinheiro Claro
NASCIMENTO, Daniela Defávares do

Resumo

O hidromel é uma bebida alcoólica obtida a partir da diluição de mel e água em diferentes proporções e que através da levedura se dá o processo fermentativo alcoólico de um corpo orgânico convertendo para álcool etílico, dióxido de carbono e liberação de calor. Assim, o objetivo principal foi realizar a análise genética de leveduras oriundas da fermentação natural de hidromeis e avaliar a sua capacidade fermentativa. A análise de capacidade fermentativa foi baseada na metodologia de Brasil (2012) e Gomes, Yoshinaga & Bortoleto (2020), e a avaliação genética foi realizada conforme o método de Carvalho-Neto *et al.* (2013) com adaptações. Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir que o tipo de hidromel produzido influenciou no tipo de levedura, já que a levedura LA apresentou melhor potencial de capacidade fermentativa para produção de bebidas alcoólicas, diferindo das demais, embora as análises genéticas por PCR não tenham sido conclusivas para a caracterização destas leveduras.

Palavras-chave: Hidromel. Fermentação natural. Leveduras selvagens.

Abstract

Mead is an alcoholic beverage obtained from the dilution of honey and water in different proportions and through yeast occurs the alcoholic fermentative process of an organic body, converting it to ethyl alcohol, carbon dioxide and release of heat. Therefore, the main objective was to carry out the genetic analysis of yeasts from natural mead fermentation and to evaluate their fermentative capacity. The analysis of fermentative capacity was based on the methodology of Brazil (2012) and Gomes, Yoshinaga & Bortoleto (2020), and the genetic evaluation was carried out according to the method of Carvalho-Neto *et al.* (2013) with adaptations. Through the results obtained it was possible to conclude that the type of mead produced influenced the type of yeast and that the LA yeast had a better potential for fermentative capacity for the production of alcoholic beverages, differing from the others, although the genetic analyzes by PCR have not been conclusive for the characterization of these yeasts.

Keywords: Mead. Natural fermentation. Wild yeasts.

Resumen

El hidromiel es una bebida alcohólica obtenida de la dilución de la miel y el agua en diferentes proporciones y que a través de la levadura ocurre un proceso de fermentación alcohólica de un cuerpo orgánico, que lo convierte en alcohol etílico, dióxido de carbono y liberación de calor. Por lo tanto, el objetivo principal era llevar a cabo el análisis genético de levaduras de fermentación natural de hidromiel y evaluar su capacidad fermentativa. El análisis de la capacidad fermentativa se basó en la metodología de Brasil (2012) y Gomes, Yoshinaga & Bortoleto (2020), y la evaluación genética se realizó de acuerdo con el método de Carvalho-Neto *et al.* (2013) con adaptaciones. A través de los resultados obtenidos se pudo concluir que el tipo de hidromiel producido influyó en el tipo de levadura y que la levadura LA tenía un mejor potencial de capacidad fermentativa para la producción de bebidas alcohólicas, diferenciándose de las demás, aunque no se han sido conclusivos los análisis genéticos por PCR. para la caracterización de estas levaduras.

Palabras clave: Hidromiel. Fermentación natural. Levadura salvaje.

INTRODUÇÃO

Originalmente, a produção de hidromel acontecia devido ao crescimento de microrganismos selvagens presentes naturalmente no mel, porém a fermentação alcoólica era imprevisível graças a presença de bactérias e leveduras contaminantes que alteravam as propriedades sensoriais, porém, atualmente com a evolução do processo e da indústria, cepas selecionadas e leveduras comerciais têm sido usadas para reduzir os riscos de contaminação e para se ter maior controle durante o processo fermentativo (MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010; ROLDAN *et al.*, 2011; MILESKI, 2016).

Nas fermentações de bebidas alcoólicas as leveduras mais comumente utilizadas são as *Sacharomyces cerevisiae*, que tem a função de converter o açúcar em álcool etílico e produzir outras substâncias importantes na caracterização da bebida, como compostos aromáticos. As leveduras são eucariontes, unicelulares pertencentes ao reino dos fungos, heterotróficas e se multiplicam por brotamento, aumentando rapidamente a sua população, sobretudo em meio em que esteja presente o açúcar. No caso do hidromel, espera-se que a fermentação seja feita pela *Sacharomyces cerevisiae*, pois, o mel é rico em açúcares como frutose, glicose, maltose e sacarose (FALASCA, MUCHAGATA & BASSAN, 2010; RIBEIRO JUNIOR, CANAVER & BASSAN, 2015).

Navrátil *et al.* (2001 *apud* MILESKI, 2016) descreve a variedade do mel, a estirpe da levedura, os nutrientes disponíveis e o pH do meio como as variáveis importantes que afetam a produção e qualidade do produto final, sendo que a variedade do mel (teor de açúcar) e a estirpe da levedura são responsáveis pelo teor alcoólico.

A técnica molecular da PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) é baseada na amplificação *in vitro* de milhões de cópias de uma determinada sequência da molécula de DNA catalisada por uma enzima DNA polimerase termorresistente, além de requerer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e *primers*, ou iniciadores, como são conhecidos os oligonucleotídeos sintéticos (SILVA FILHO, 2003; TOSTA, 2004; REGITANO, 2001). Dessa forma, sendo possível a consequente comparação com banco de dados existente para identificação da nova espécie (AZEVEDO, SEVERINO; MAGALHÃES, 2004).

Tosta (2004) ressalta que o aperfeiçoamento da PCR nos últimos anos a tem tornado cada vez mais confiável e aplicável na caracterização e identificação de leveduras, sendo que, atualmente, esta técnica possui algumas derivações, como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso), em que a sequência de DNA amplificado não é previamente conhecida ou determinada, portanto, ao acaso.

Desta forma, este estudo teve como objetivo a verificação de amostras isoladas de leveduras obtidas por fermentação natural de hidromeis verificando se o ambiente e os diferentes ingredientes utilizados influenciaram no genótipo de levedura obtida, além de verificar o potencial fermentativo das leveduras selvagens isoladas para produção de bebidas alcoólicas.

2 METODOLOGIA

As análises foram realizadas na Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Deputado Roque Trevisan, na cidade de Piracicaba/SP. Onde as atividades foram desenvolvidas nos Laboratórios de Microbiologia, Biotecnologia e Cromatografia.

2.1 Isolamentos das Leveduras

Os hidromeis Tipo A, B e C foram confeccionados na cidade de Piracicaba/SP e o Tipo D na cidade de Santa Bárbara d'Oeste/SP. Sendo que a água utilizada foi a dos municípios onde eles foram elaborados. O mel utilizado foi o mesmo para todos os hidromeis, constituindo de embalagem comercial adquirido em hipermercado da cidade de Piracicaba. O teor de Brix inicial foi de 17,60; 16,80; 19,60 e 16,10 e final foi de 6,90; 8,00; 8,00 e 9,40 para o hidromel tipo A, B, C e D, respectivamente. Além disso o pH dos hidromeis variam de 2,67 até 4,49, durante todo o processo de confecção da bebida.

As leveduras analisadas são oriundas da fermentação natural de 4 tipos de hidroméis, conforme a Tabela 1, onde as leveduras serão denominadas: LA, para levedura do Tipo A, LB, Tipo B, LC, Tipo C e LD, para levedura oriunda do Tipo D.

Tabela 1 - Tipos de hidromeis

Ingredientes	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Mel	200,00	200,00	200,00	200,00
Água	800,00	800,00	800,00	800,00
Limão	-	92,00	-	-
Uva-Passa	-	-	100,00	-
Maça Gala	-	-	-	146,00

Fonte: Autores. *Valores apresentados em gramas

Ao final do processo fermentativo, realizou-se o isolamento, por estriamento em placas de petri com meio de cultura YPD, para o desenvolvimento de colônias, das leveduras de cada hidromel.

2.2 Análise de Teor Alcoólico

2.2.1 Instrumental

A determinação do teor de álcool etílico foi realizada no cromatógrafo gasoso, marca *PerkinElmer*, modelo Clarus 600, com detector de ionização de chama (*flame ionization detector* - FID). Utilizou-se uma coluna capilar *PerkinElmer* modelo Elite-WAX com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,5 µm. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão de 1,20 mL min⁻¹, do hidrogênio foi 45 mL min⁻¹ e do ar sintético foi 450 mL min⁻¹, todos com alto grau de pureza (99,999%). O volume de injeção da amostra foi de 300 µL a uma velocidade de 250 µL s⁻¹, empregando-se o “split” de 1: 10. A temperatura do forno foi de 100 °C por 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 150 °C e o detector a 300 °C.

O cromatógrafo ainda possui um amostrador automático da marca *Combipal*, modelo *CTC Analytics, Pal System*, com o forno para *Headspace*.

2.2.2 Preparação de soluções padrões

O álcool etílico (C₂H₆O) utilizado para a análise em cromatografia é de grau padrão cromatográfico (Marca LiChrosolv® Merck).

As soluções padrões contendo álcool etílico absoluto, expressas em v/v (volume em mL do analito e 100 mL de solução), foram preparadas com as seguintes concentrações: padrão 1 (0,5% de C₂H₆O), padrão 2 (1,0% de C₂H₆O), padrão 3 (2,0% de C₂H₆O), padrão 4 (3,0% de C₂H₆O), padrão 5 (4,0% de C₂H₆O), padrão 6 (5,0% de C₂H₆O), padrão 7 (6,0% de C₂H₆O), padrão 8 (7,0% de C₂H₆O), padrão 9 (8,0% de C₂H₆O), padrão 10 (9,0% de C₂H₆O), padrão 11 (10,0% de C₂H₆O), padrão 12 (11,0% de C₂H₆O), padrão 13 (12,0% de C₂H₆O) e padrão 14 (14,0% de C₂H₆O). Realizou-se a construção da curva analítica e se obteve o R² o valor de 0,993197, apresentado pela equação $y = (155,812613) + (950,097041)x$.

2.2.3 Análise do teor álcool etílico

Para realizar a análise de teor alcoólico, utilizou-se como base a metodologia de Brasil (2012) e Gomes, Yoshinaga & Bortoleto (2020), foram coletadas 4 amostras, sendo uma de cada hidromel, a cada 7 dias após o preparo do hidromel, sucessivamente até completar 56 dias, totalizando 36 amostras, acrescidas depois de mais quatro amostras no 57º dia.

Todas as amostras foram incubadas no forno do amostrador automático para utilização da extração *Headspace*, a 60 °C pôr 5 min com uma agitação de 500 rpm. Após foram injetadas no cromatógrafo gasoso.

2.3 Reação em cadeia da polimerase (RCP) ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

O DNA total foi extraído das amostras de leveduras (5 amostras de cada hidromel), através do método adaptado de Doyle & Doyle (1987). Com uma alça de platina, uma alçada de amostra das leveduras fora colocada em tubo Eppendorf e macerados, juntamente com 600 µL de tampão de extração (1,4M NaCl; 100mM TrisHCl pH=8; 20mM EDTA pH=8; 1% PVP-40; 1% SDS e água ultrapura). Em seguida foram agitados com o auxílio de um agitador de tubos e mantidos por 20 minutos a 60°C, com homogeneização em intervalos de 5 minutos. Passados os 20 minutos as amostras repousaram em temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente realizou-se a de 600 µL de CIA (24 mL clorofórmio : 1 mL álcool isoamílico), realizando a homogeneização para formação de uma emulsão por inversão dos tubos (25 vezes), por fim, centrifugou (15.000 rpm) as amostras, à temperatura ambiente, por 7 minutos.

Em um novo tubo, transferiu a fase aquosa (superior) e adicionou-se 500 µL isopropanol para a precipitação do DNA em temperatura ambiente. Realizando a homogeneização suave por inversão dos tubos (1 minuto), por fim, centrifugou (15.000 rpm) novamente as amostras, à temperatura de 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado lavado com 500 µL de uma solução de álcool etílico a 70%, mantido sob refrigeração (-20°C) por 20 minutos, antes da centrifugação por 15 minutos, 4°C, a 15.000 rpm.

Realizou-se o descarte do sobrenadante cuidadosamente e deixou o precipitado secando, após a secagem foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura e armazenado em geladeira para completa dissolução do precipitado.

A reação de PCR do DNA das leveduras com 4 pares de primers específicos (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2013) para caracterização molecular, foi feita para um volume final de 10 µL, utilizando-se 9 µL do primer e 1 µL de amostra, utilizando-se *Drem Taq*[®] (Fermentas), conforme recomendações do fabricante.

A amplificação dos segmentos de DNA das leveduras analisadas foi realizada em duas etapas, devido a diferenças na temperatura de anelamento dos pares de *primers*. Para dois pares (P1 e P2) o programa utilizado no termociclador TECHNE, modelo TC-4000, foi 5 minutos iniciais a 94°C, e 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 40 segundos a 54°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; mais 2 minutos a 72°C, para extensão final. Para os outros dois pares de primers (P3 e P4), mudou-se apenas a temperatura de anelamento, ficando, portanto: 5 minutos iniciais a 94°C, e 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; mais 2 minutos a 72°C, para extensão final (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2013).

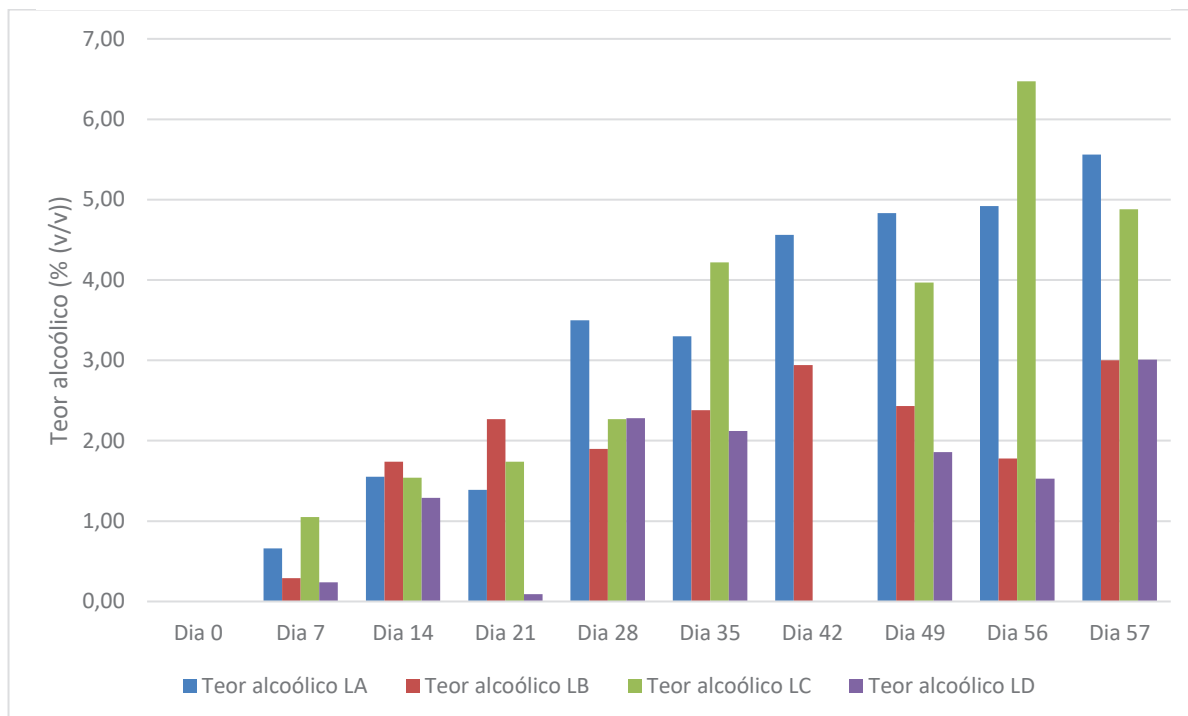
O produto de PCR (10µL de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5x, submetido a corrente de 75V por 20 minutos, tendo como marcador de peso molecular 3 µL DNA *Ladder* (Fermentas), sendo todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio à 0,01 ng/mL sob luz ultravioleta e registradas com o fotodocumentador Gel *Logic 212 Pro* (*Carestream MI SE*).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Gráfico 1, pode-se avaliar a produção de álcool etílico das leveduras selvagens nos 4 hidromeis. Tendo o maior destaque para a produção da amostra LA, que demonstrou maior eficiência, uma vez que a hegemonia e rusticidade das leveduras selvagens presentes, demonstra um ótimo desempenho fermentativo (Moreira *et al.*, 2013), apesar do único substrato presente ser o mel, e nos outros hidromeis tinham outros substratos que poderiam prover maiores quantidades de um corpo orgânico. Visto que, bioquimicamente falando, o processo de fermentação alcoólica ocorre onde a levedura a partir de um corpo orgânico faz a conversão para álcool etílico, dióxido de carbono e liberação de calor (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; SOARES, 2006). Mostrando que as leveduras selvagens presentes têm maior resistência em condições adversas do meio (Moreira *et al.*, 2013), já que as bebidas foram elaboradas de forma caseira, onde não havia controle de alguns parâmetros (temperatura e umidade). Lima, Basso e Amorim (2001), mencionam que as leveduras selvagens possuem habilidades fermentativas, de alta eficiência na produção de etanol, baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes, além de possuírem material genético viável para agregar atributos metabólicos, por meio da biotecnologia. As leveduras selvagens devem ser estudadas devido ao seu potencial tecnológico na produção de bebidas alcoólicas, onde a tendência é o uso de leveduras com características próprias para elaboração de produtos exclusivos (FIORE *et al.*, 2005).

Conforme Brasil (2019), os hidromeis podem variar o teor alcoólico de 4 a 14%, desta forma apenas os hidromeis A e C obtiveram os teores finais preconizado pela legislação vigente. Além disso o hidromel tipo A atingiu o teor mínimo com 42 dias, demonstrando que a levedura LA, tem maior potencial para produção de etanol em bebidas alcoólicas, seguida da levedura LC.

Gráfico 1 - Teores alcoólicos dos hidromeis até o período de 57 dias



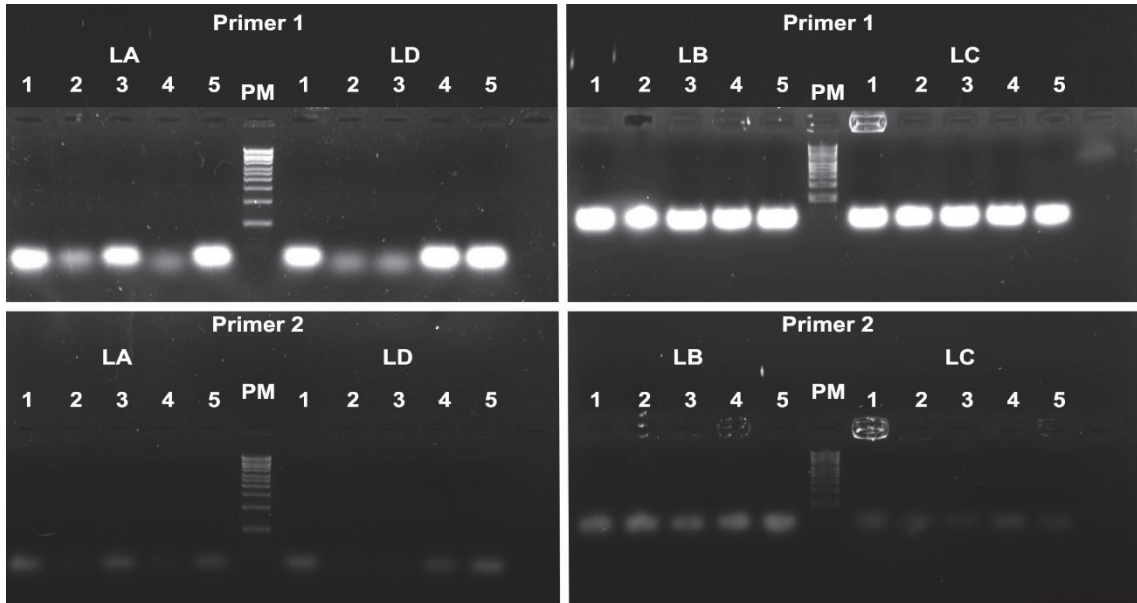
Fonte: Autores. *As amostras do dia 42, da LC e LD, foram perdidas.

As leveduras selvagens isoladas dos hidromeis passaram pela reação de PCR, onde se utilizou de *primers* específicos para caracterização molecular (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2013). Os eletroforetogramas, Figuras 1 e 2, mostram as bandas obtidas em comparação ao marcador de peso molecular DNA *Ladder* (PM).

Na Figura 1, nota-se que o perfil de bandas obtidas a partir dos primers P1 e P2, a 54°C, para leveduras LA e LD foram semelhantes entre si, além de uma possível presença de outro tipo de levedura, pois os produtos de amplificação resultantes apresentam altura e intensidade de banda diferentes após a PCR, porém a análise exclusivamente através destas imagens não é conclusiva. Para as leveduras LB e LC, o padrão de bandas são semelhantes.

BENETOLE, Bianca Martins; GOMES, Winston Pinheiro Claro; NASCIMENTO, Daniela Defávares do

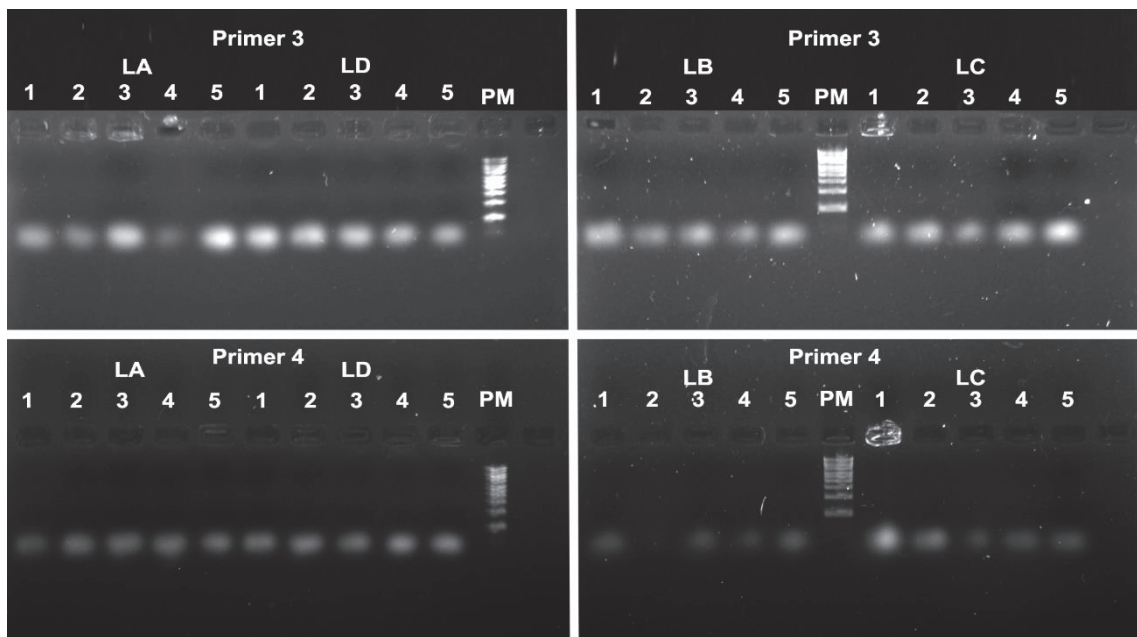
Figura 1 - Eletroforetograma das bandas dos primers P1 e P2, a 54°C, das amostras de levedura dos hidromeis, para caracterização molecular, comparados com o marcador de peso molecular (PM)



Fonte: Autores.

Já na Figura 2, nota-se que o perfil de bandas obtidas a partir dos primers P3 e P4, a 57°C, foram semelhantes entre si para os 4 tipos de hidromeis, demonstrando que para essas amostras não houve especificidade para demonstrar suas diferenças. Pois os *primers* são desenhados de acordo com o código genético que será estudado, logo, o código genético dessas leveduras são semelhantes, na região que os primers atuaram (OLIVEIRA *et al*, 2015).

Figura 2 - Eletroforetograma das bandas dos primers P3 e P4, a 57°C, das amostras de levedura dos hidromeis, para caracterização molecular, comparados com o marcador de peso molecular (PM)



Fonte: Autores.

CONCLUSÃO

Através desse trabalho foi possível observar que o tipo de hidromel utilizado não influenciou no tipo de levedura selvagem que apareceu nos hidromeis, pois pela análise de PCR, esperava-se que todos hidromeis apresentariam leveduras diferentes entre si, porém os pares de primers utilizados nas reações PCR não foram suficientes para detectar diferenças genéticas entre as leveduras, pelo padrão de bandas apresentado. Além disso, a levedura LA apresentou um bom potencial tecnológico para produção de bebidas alcoólicas, diante disso realizar novas pesquisas com essa levedura é importante.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Tecnologia de Piracicaba "Deputado Roque Trevisan", Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, F. M; SEVERINO, P; MAGALHÃES, V. D. Detecção de leveduras clinicamente relevantes no sangue: avaliação de métodos de extração e amplificação de RNA. *Einstein*, v. 2, n. 4, p. 311-313, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. Norma Operacional nº 1, de 24 de janeiro de 2019. Norma interna DIPOV/SDA nº 1, de 24 de janeiro de 2019. Aprova a Consolidação das Normas de bebidas, fermentados acéticos, vinhos e derivados da uva e do vinho, nacionais e importados a ser utilizada pela inspeção e fiscalização agropecuária e pelos administrados, na forma do Anexo desta norma. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 jan. 2019a. ISSN 1111-1111. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/norma-operacional-no-1-de-2019_dipov-versao-15-08-19_anexo.pdf. Acesso em: 22 out. 2020.

BRASIL, Z. de O. L. IT LABV 278 - Análise de Álcoois Superiores, Acetaldeído, Acetato de Etila, Furfural e Contaminantes Orgânicos por Cromatografia Gasosa. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). p. 1-5, 2012.

BRUNELLI, L. T. *Caracterização físico-química, energética e sensorial de hidromel*. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, p. 85. 2015.

BENETOLE, Bianca Martins; GOMES, Winston Pinheiro Claro; NASCIMENTO, Daniela Defávares do

CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; RODRIGUES, A.; BRAGANÇA, W. O.; COSTA, G. G. L.; ARGUESO, J. L.; & PEREIRA, G. A. G., 2013. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, n. 168, n.4, p.701–709. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.025>.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue Focus*, v. 12, p. 13-15, 1987.

FALASCA, M. T.; MUCHAGATA, E. A.; BASSAN, C. F. D. Vinho de Mel (hidromel) a partir do mel de Abelhas produzido pelo açúcar de cana-de-açúcar. Universidade de Marília, fórum de pesquisa e extensão, *anais...* ISSN 2178-2083, p. 84, 2010.

IORE, C. et al. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, n. 6-7, p. 1141-1147, 2005.

GOMES, W. P. C.; YOSHINAGA, F.; BORTOLETO, G. G. Determinação de álcoois em bebidas comerciais por cromatografia gasosa e amostragem por headspace. *Bioenergia em Revista: Diálogos* (ISSN: 2236-9171), v. 10, n. 1, 2020.

LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de. Produção de Etanol. In: LIMA, U. de A. et al. (Coordenadores). *Biocologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, capítulo 1, São Paulo: Editora Blucher, 2001.

MATTIETTO, Rafaella de Andrade et al. Tecnologia para obtenção artesanal de hidromel do tipo doce. *Comunicado Técnico 170*, Embrapa: Belém. 2006.

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

MILESKI, J. P. F. *Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras Saccharomyces*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 72f., 2016.

MOREIRA, B. L. D. et al. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1672-1677, nov. 2013.

OLIVEIRA, E. M. M. et al. *Comunicado Técnico 208 - Desenho de Primers Degenerados através de Bioinformática*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Agroindústria de Alimentos. ISSN 01035231. Rio de Janeiro, RJ, 2015.

REGITANO, L. C. de A. *Introdução à análise de marcadores moleculares*. Embrapa Pecuária Sudeste. 15p., 2001.

RIBEIRO JUNIOR, M. R.; CANAVER, A. B.; BASSAN, C. F. D. Produção de hidromel: análise físico-química e sensorial. Universidade de Marília – *UNIMAR CIÊNCIAS*-ISSN1415-1642, Marília/SP, V. 24, (1-2), pp. 59-63, 2015.

ROLDAN, A., et al. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126 (2), 574–582, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 765p.

SILVA FILHO, E. A. da. *Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação*. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

SOARES, T. L. *Álcoois, ésteres e aldeídos produzidos por diferentes isolados de Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, f. 75, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOSTA, C. D. *Biotipagem de leveduras industriais através de do sistema Killer*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 78 p., 2004.

1 BENETOLE, Bianca Martins é Graduada em Tecnologia em Alimentos na Faculdade de Tecnologia de Piracicaba - Centro Paula Souza, onde é estagiária no Laboratório de Biotecnologia sob a orientação da Professora Dra Daniela Defávares do Nascimento desde 05 de setembro de 2018 e é aluna de Iniciação Científica no projeto "Cultivo *in vitro* de ora-pro-nóbis" no mesmo laboratório desde fevereiro de 2019. Desde agosto de 2019 é estagiária no Laboratório de Cromatografia sob a orientação da Professora Dra Gisele Gonçalves Bortoletto. Graduada em Engenharia Agrônoma na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em dezembro de 2016. Realizou treinamento técnico no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) de 17 de abril de 2013 até 17 de outubro de 2013, onde desenvolveu trabalhos relacionados com a área de Solos e Nutrição de Plantas. Participou de uma parte de uma Iniciação Científica com bolsa concedida pelo CNPq intitulada "Estudo das Relações entre 1-Metilciclopropeno (1-MCP) e Etileno na Qualidade de Mamões 'Golden' durante o período que fez estágio no Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas na ESALQ-USP de 05 de dezembro de 2013 até 02 de fevereiro de 2015. Em dezembro de 2016, apresentou seu Trabalho de Conclusão de Curso, cujo título do projeto é "Avaliação de mudas propagadas *in vitro* de *Heliconia orthotricha* cultivar Eclipse Total conduzidas em cultivo protegido com adubação verde intercalar" realizado no Laboratório de Floricultura e Plantas Ornamentais na ESALQ-USP, onde foi estagiária desde 16 de junho de 2015 até a conclusão do trabalho.

2 GOMES, Winston Pinheiro Claro é Mestrando do programa de Ciências (Energia Nuclear na Agricultura), na área Química na Agricultura e no Ambiente, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), graduando em Tecnologia em Alimentos na Faculdade de Tecnologia de Piracicaba - Centro Paula Souza, onde é estagiário no Laboratório de Cromatografia e Biotecnologia desenvolvendo a Iniciação Científica de "Análise de álcoois superiores em cervejas artesanais por Cromatografia Gasosa empregando Headspace". Graduação em Tecnologia Têxtil pela Faculdade de Tecnologia de Americana - Centro Paula Souza, em dezembro de 2010, onde foi bolsista pelo "Programa de Iniciação Científica e Tecnológica para Micro e Pequenas Empresas - BITEC" na Europa Indústria Têxtil LTDA.

3 NASCIMENTO, Daniela Defávares do. Possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Atualmente cursa MBA em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP. Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares, DNA e RNA. Seleção e identificação molecular de: bactérias envolvidas na produção de biogás; e de leveduras para produção de cervejas artesanais.