



## **Uso de leveduras não convencionais isoladas a partir de pólen de abelhas sem ferrão da Amazônia para aplicação na produção de bebidas**

Hayssa Carolini Alamar Nunes<sup>1</sup>; Lorena Nacif Marçal<sup>2</sup>, Enide Luciana Belmont Montefusco<sup>3</sup>, Carlos Gustavo Nunes da Silva<sup>4</sup>

### **Resumo**

A procura por leveduras não convencionais, principalmente em ambientes fermentativos, vem aumentando devido ao seu uso em grande diversidade de alimentos. As bebidas fermentadas por leveduras selvagens com baixo teor alcoólico e/ou com produção de aromas diferenciados, chamados de *bioflavours*, têm ganhado destaque no mercado e em pesquisas científicas. Os potes de pólen de abelhas nativas sem ferrão podem ser apontados como um local ideal para a prospecção dessas leveduras, uma vez que a diversa massa polínica coletada pelas abelhas passa por processo fermentativo mediado por bactérias e leveduras. Portanto, este estudo tem como objetivo selecionar, a partir de pólenes de abelhas sem ferrão, leveduras com potencial fermentativo em maltose, em fermentações simples ou cofermentações visando a produção de cervejas artesanais. Diferentes meios de cultura foram utilizados para o isolamento das leveduras. Testes qualitativos de fermentação da maltose, do potencial de floculação e de resistência a alta concentração de açúcares foram realizados para selecionar os isolados. Depois de identificados, os isolados foram submetidos a fermentações simples e cofermentações a duas temperaturas, quantificando a concentração de células viáveis e mortas, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico. Duas espécies, *Hanseniaspora opuntiae* e *Wickerhamomyces anomalus* apresentaram melhores resultados na produção de células em fermentação simples do que leveduras comerciais, porém menor consumo de açúcares e produção de álcool. Esses resultados indicam que leveduras isoladas dos pólenes de abelhas sem ferrão podem ser usadas na produção de bebidas com baixo teor alcoólico ou em cofermentação para incrementar a produção de *bioflavours*.

**Palavras-Chave:** Cerveja sem álcool, Cofermentação, Fermentação simples, *bioflavour*.

**Use of non-conventional yeasts isolated from Amazonia stingless bees pollen in fermentative processes.** The demand for non-conventional yeasts, mainly in fermentative environments, has been increasing due to their use in a huge variety of foods. Drinks fermented by wild yeasts and with low alcohol content and/or with the production of differentiated aromas, called *bioflavours*, have gained prominence in the market and in scientific research. Pollen pots from native stingless bees can be appointed as an ideal location for prospecting these yeasts, since the diverse pollen mass collected by these bees undergoes a fermentation process by bacteria and yeasts. Therefore, this study aims to select, from stingless bee pollen, yeasts with maltose fermentation potential,

<sup>1</sup> aluna de doutorado em Biotecnologia, UFAM, [yssa.nunes@gmail.com](mailto:yssa.nunes@gmail.com)

<sup>2</sup> Professora adjunta, Departamento de morfologia – ICB, UFAM, [lorenanacif@ufam.edu.br](mailto:lorenanacif@ufam.edu.br)

<sup>3</sup> Profa, Colegiado de Biomedicina, Faculdade Estácio Amazonas, [lucianabelmont22@gmail.com](mailto:lucianabelmont22@gmail.com)

<sup>4</sup> Professor, Departamento de genética- ICB, UFAM, [cgmanaus@gmail.com](mailto:cgmanaus@gmail.com)



either in simple fermentations or co-fermentations aimed at the production of craft beers. Different culture media were used for the isolation of yeasts. Qualitative tests of maltose fermentation, flocculation potential and resistance to high sugar concentration were performed to select the isolates. Once identified, the isolates were subjected to simple fermentation and co-fermentation at two temperatures, quantifying the concentration of viable and dead cells, the concentration of reducing sugars and the alcohol content. Two species, *Hanseniaspora opuntiae* and *Wickerhamomyces anomalus* showed better results in cell production in simple fermentation than commercial yeasts, but lower sugar consumption and alcohol production. These results indicate that yeasts isolated from stingless bee pollen can be used in the production of low-alcohol beverages or in co-fermentation to increase the production of bioflavours.

**Keywords:** Free-alcohol beer, Co-fermentation, simple fermentation, bioflavours.

## 1. Introdução

As leveduras são um grupo bastante conhecido e usado na indústria de produtos fermentescíveis, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida e utilizada nesse setor (BOTHÁ, 2011; BELLAVER et al., 2004). Todavia, devido a mudança de hábito do consumidor, novos cenários vêm se apresentando no setor fermentativo. A produção de bebidas de baixo teor alcoólico artesanal é uma tendência, impulsionada pelo aumento da consciência do consumidor a respeito da saúde e bem-estar. Assim, as leveduras não convencionais, também conhecidas como não *S. cerevisiae*, são muitas vezes utilizadas devido à sua baixa capacidade fermentativa (YEO e LIU 2014; BELLUT et al., 2018; BELLUT e ARENDT, 2019). Por essas leveduras possuírem a particularidade de produzir aromas e retro-gostos originais, também são empregadas na produção de bebidas fermentadas com perfis aromáticos mais elaborados e diferenciados, o qual representa outro segmento do setor fermentativo em crescimento (BASSO et al., 2016). Para essa finalidade, as leveduras não convencionais são comumente empregadas em cofermentação com *S. cerevisiae* (LI et al., 2017; YE et al., 2014; ZHA et al., 2018). Em consequência a essas diferentes utilizações das leveduras

não convencionais, aumentou consideravelmente a procura por novas cepas (LI et al., 2017). Nesse contexto, muitos estudos estão sendo conduzidos em locais de fermentação espontânea, onde ocorre a sucessão de eventos fermentativos com a atuação de diferentes espécies de leveduras, como na fermentação das cervejas do tipo *Lambic*, na fermentação de frutas, no mel de abelhas, entre outros (SPITAEELS et al., 2014; MATRAXIA et al., 2021). Neste estudo ocorreu a prospecção de leveduras em potes de pólen das abelhas nativas sem ferrão (*Apidae*, *Meliponinae*), nos quais ocorrem processos fermentativos mediados por bactérias e leveduras (MENEZES et al., 2013; MORAIS et al., 2013; MENEZES et al., 2018; VILLEGAS-PLAZAS et al., 2018; CALAÇA et al., 2018).

Esse estudo teve como objetivo isolar e selecionar, a partir de pólenes de quatro espécies de abelhas sem ferrão do Amazonas, leveduras com potencial fermentativo para maltose, para fins de produção de cerveja com baixo teor alcoólico ou em cofermentação com *S. cerevisiae*.

## 2. Material e Método

### 2.1. Coleta do material

A coleta do pólen das quatro espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona interrupta*, *Scaptotrigona*



postica, *Tetragona clavipes* e *Frieseomelitta varia*) foi realizada no meliponário da empresa Amazomel, no município de Iranduba (3°10'55.4"S 60°7'12.5"W). Para cada espécie foi selecionada uma colônia, da qual foi coletado o pólen de três potes com auxílio de ponteiras e espátulas esterilizadas. Esse material foi mantido em caixa de isopor (temperatura ambiente) e transportado para laboratório para o isolamento das leveduras.

## 2.2. Isolamento e purificação

O isolamento foi dividido em três etapas sequenciais. Na primeira etapa foi adicionado aproximadamente 1 g de cada pólen em 5 mL de meio YPD líquido [extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ampicilina (100 µg/ µL)], o qual permaneceu sob agitação (150 rpm) a 30°C por 48 horas. Na segunda etapa, 200 µL do meio YPD líquido cultivado foi transferido para 5 mL de meio YPR líquido (substituindo a glicose por rafinose) e mantido igualmente a 30 °C por 48 horas. Na terceira etapa, 200 µL do meio YPR líquido cultivado foi transferido para 5 mL de meio YPR líquido+ 8% de etanol e mantido novamente a 30 °C por 48 horas. A cada etapa parte do meio cultivado foi diluído por meio de diluição serial até 10<sup>-4</sup> e 100 µL de cada diluição foi espalhada em meios YPD e YPR ágar e mantidas a 30 °C por no máximo 3 dias. As colônias crescidas morfológicamente distintas foram selecionadas e transferidas para uma nova placa com seu respectivo meio para realizar a purificação.

## 2.3. Potencial fermentativo de maltose

Os isolados purificados e selecionados foram pré-cultivados em meios YPD e YPM líquido (substituindo a glicose por maltose) e posteriormente 100 µL foi transferido para tubos de ensaio com rosca contendo YPM líquido

com tubos *Durham* invertidos e mantidos a 30 °C sem agitação por no máximo 14 dias. A cada 24 horas os tubos foram analisados e a presença de bolhas no tubo *Durham* indicava o processo fermentativo da maltose. Cada bolha fermentativa foi medida com auxílio de paquímetro (FIGUEIREDO et al., 2017 modificado). O teste foi realizado em triplicata.

## 2.4. Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Para esse teste, os isolados foram primeiramente cultivados em meio YPD ágar a 30 °C durante o período máximo de 3 dias. Subsequentemente, foram inoculados em meio YPD (glicose) e YPM (maltose), ambos a 2 e 20% de glicose e maltose, e mantidos a 30 °C durante no máximo 3 dias para o acompanhamento do crescimento. Esse teste foi realizado em triplicata.

## 2.5. Teste qualitativo do potencial de floculação

O potencial de floculação foi testado adicionando 100 µL dos isolados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YPM líquido e incubados a 30 °C por 48 horas. Após esse período, os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos por 24 horas sem nenhuma agitação à temperatura ambiente para visualizar a ocorrência dos processos de precipitação e floculação (SUZZI et al., 1984). Esse teste foi realizado em triplicata.

## 2.6. Extração de DNA

Os isolados com melhores desempenhos nos testes qualitativos foram selecionados para a extração de DNA utilizando o método de CTAB (RUSTERHOLZ et al., 2015). Para tal, após crescimento em meio YPM líquido sob agitação (150 rpm) a 30 °C por 2 dias, 1 mL dos isolados foi centrifugado (17000 x g) por 1 minuto a temperatura ambiente.



Posteriormente foi adicionado 100  $\mu$ L de TE nos *pellets*. Os *pellets* diluídos foram transferidos para microtubos de criopreservação com *beats* e agitados em Fastprep-24. Subsequentemente, 525  $\mu$ L de tampão CTAB (100 mM Tris; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 2 % CTAB e 0,2 %  $\beta$ -mercaptoetanol), 15  $\mu$ L Proteinase K (10 mg/mL) e 10  $\mu$ L RNase (10 mg/mL) foram adicionados. Essa solução foi agitada e incubada por 90 minutos a 56 °C. Em seguida, 500  $\mu$ L de clorofórmio/ álcool isoamílico (25:1) foi adicionado e a nova mistura foi centrifugada (12000 x g) por 10 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos contendo 450  $\mu$ L de isopropanol e incubados em gelo por 30 minutos. Após uma nova centrifugação (12000 x g por 10 minutos) a 4 °C foi adicionado 300  $\mu$ L de etanol 70% aos precipitados. Posteriormente à última centrifugação com as mesmas configurações, os precipitados foram secos a 40 °C e ressuspensos em 30  $\mu$ L de água deionizada autoclavada. Por fim, os DNAs obtidos foram quantificados em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 2.7. PCR, sequenciamento e identificação molecular

Foram amplificadas duas diferentes regiões do genoma das leveduras: a subunidade 28S do rRNA usando os *primers* LR0R e LR6, e a região ITS usando os *primers* ITS1 e ITS4. A amplificação por PCR foi realizada em uma reação de mistura de 25  $\mu$ L contendo 2,5  $\mu$ L de Tampão otimizador de *DreamTaq*, 2,5  $\mu$ L dNTPs (2mM); 0,5  $\mu$ L de cada iniciador (10  $\mu$ M); 0,125  $\mu$ L de *DreamTaq* Polimerase e 17,875  $\mu$ L de água deionizada ultrapura. A reação de PCR foi conduzida em termociclador (*Mastercycler pro vapo protect, Eppendorf*) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de: 94 °C 2 min, 58 °C 15 s, 72 °C 30s e um ciclo transferase

terminal a 72 °C por 1 min. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (1%) revelado por *Gelred* 100x e foto documentados em transiluminador ultravioleta *InGenius LHR* (Syngene). Os produtos amplificados foram purificados usando o kit *MinElute PCR Purification* (QIAGEN) e quantificados usando o *Qubit 2.0* (Invitrogen).

O sequenciamento foi realizado pela empresa *Microsynth* (Stuttgart, Alemanha) usando o protocolo da mesma. As sequências foram processadas usando o *Bioedit* e comparadas com os bancos de dados *Genbank* e *Mycobank* configurados na opção BLASTn.

### 2.8. Fermentações e co-fermentações

Os isolados para essa etapa foram selecionados após sua identificação molecular e baseados no seu uso para processos fermentativos de acordo com a literatura.

Primeiramente foi realizada uma curva de crescimento para cada isolado adicionando 200  $\mu$ L de cada em *Erlenmeyer* (500 mL) contendo 200 mL de meio YPM líquido. Os *Erlenmeyer* foram incubados a 30 °C sob agitação. Foram retiradas amostras a cada 3 horas para a medição de crescimento microbiano usando espectrofotômetro (O.D 600 nm) e a contagem de células em câmara de *Neubauer* até atingir a fase estacionária. Todo o processo foi realizado em triplicata.

Para avaliar a habilidade dos isolados em fermentar o extrato de malte foram empregados três tipos de fermentações a 12 °C e 20 °C: fermentação simples, cofermentação simultânea (ambas com 5 dias de fermentação) e cofermentação tardia (com 8 dias de fermentação). Para cada tipo de fermentação, 200 mL de extrato de malte autoclavado (9°P) foi adicionado em *Erlenmeyer* (500 mL) com *airlock*. Nas fermentações simples foram inoculados a este meio  $5 \times 10^6$



células. mL<sup>-1</sup> de cada isolado ou do controle positivo (*Saccharomyces pastorianus* a 12°C e *Saccharomyces cerevisiae* a 20°C). Nas cofermentações simultâneas, foi adicionado no início da fermentação 2,5x10<sup>6</sup> células. mL<sup>-1</sup> do isolado e 2,5x10<sup>6</sup> células. mL<sup>-1</sup> do respectivo controle positivo. Na cofermentações tardias, foi adicionado no início da fermentação 2,5x10<sup>6</sup> células. mL<sup>-1</sup> do isolado e no 3º dia de fermentação 2,5x10<sup>6</sup> células. mL<sup>-1</sup> do respectivo controle positivo. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata e contra um controle negativo sem nenhum microrganismo possuindo as mesmas condições.

A cada 24 horas, foi retirada uma amostra para a contagem de células viáveis e células mortas usando 10 µL desta amostra diluída com azul de metileno. A cada 48 horas foi retirada uma amostra adicional, a qual foi centrifugada (4000 rpm por 5 minutos) a 4 °C e o com o sobrenadante foram quantificados os açúcares redutores pelo método de DNS de acordo com Miller (1959 modificado). No fim de cada fermentação o teor alcoólico foi quantificado usando picnômetros de 5 mL (GÜLUM et al., 2019) e usando a Eq 1: % etanol = (OG-FG)\* 131,25, em que OG: gravidade original ou densidade inicial e FG: Gravidade final ou densidade final

### 3. Resultados

#### 3.1. Isolamento e purificação

Dez morfotipos foram isolados a partir dos pólenes das quatro espécies de abelhas sem ferrão. A maioria dos morfotipos ocorreram no pólen da *M. interrupta* (morfotipos A, B, C, G, I e L) seguida pelo pólen da espécie *T. clavipes* (morfotipos A, C, K e L), *S. postica* (morfotipos B, E e F) e finalmente pelo pólen da *F. varia* (E e H). Os

morfotipos F, G, H I e K ocorreram somente em uma das quatro espécies estudadas.

#### 3.2. Potencial fermentativo de maltose

Dentre os 15 isolados testados (alguns morfotipos foram testados em duplicata pois foram isolados a partir de diferentes meios de cultivo), 6 destacaram-se e apresentaram bolha fermentativa nos meios de pré-cultivo utilizados: 32L, 4I, 18F, 13H, 51L e 48E. Metade dos isolados apresentou maiores bolhas fermentativas ao ser pré-inoculados em YPD (32L, 4I e 13H) e outra metade quando pré-inoculados em YPM (18F, 51L e 48E). Adicionalmente, os isolados 32L, 4I e 13H destacaram-se quanto ao tamanho da bolha fermentativa quando pré-inoculados em YPD.

Além dos isolados mencionados anteriormente, é válido mencionar os isolados 27K, 40B e 55C (pré-inoculados em YPM) e o isolado 53C (pré-inoculado em ambos os meios) que se destacaram no tamanho da bolha fermentativa (Tabela 1).

#### 3.3. Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Cinco dos isolados testados apresentaram ótimo crescimento tanto em glicose quanto em maltose, em ambas as concentrações testadas (6G, 10C, 51L, 53C e 50M). Os isolados 42F e 13H demonstraram menor crescimento na maior concentração de glicose e o isolado 4I apresentou baixo crescimento na maior concentração de ambos os açúcares. Contudo, esse último isolado destacou-se no quesito odor, pois exalou um aroma de pera durante seu crescimento, principalmente quando inoculado em glicose.

Tabela 1 - Resultados do teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose, relacionando os isolados testados com o tempo que exibiram as bolhas fermentativas e o tamanho das mesmas em seu respectivo meio pré inoculado (YPM e YPD)

Isolado	Meio pré inoculado	Presença de bolha fermentativa (média em dias)	Tamanho bolha fermentativa (Média em mm)
32L	YMP	1	6,625 ± 2,43
	YPD	1	12,125 ± 4,21
3A	YMP	1	4,5 ± 0,58
	YPD	2	5,875 ± 0,63
10C	YMP	4	2,5 ± 1
	YPD	2	7,125 ± 1,60
6G	YMP	4	2 ± 0
	YPD	1	9,625 ± 1,70
4I	YMP	1	3,875 ± 1,25
	YPD	1	17,25 ± 9,61
18F	YMP	1	5,75 ± 1,50
	YPD	1	3,875 ± 0,63
27K	YMP	1	46 ± 0
	YPD	-	-
40B	YMP	-	-
	YPD	1	23,5 ± 3,00
13H	YMP	1	20 ± 5,80
	YPD	1	10 ± 3,14
16E	YMP	1	16,125 ± 4,66
	YPD	2	21,375 ± 1,38
42F	YMP	2	4,375 ± 2,75
	YPD	2	3 ± 0
50M	YMP	12	9,375 ± 0,75
	YPD	12	3,5 ± 3,58
51L	YMP	1	6,125 ± 0,85
	YPD	1	5,75 ± 0,29
48E	YMP	1	9,25 ± 3,52
	YPD	1	4 ± 2,27
55C	YMP	7	19,5 ± 10,10
	YPD	12	6,25 ± 0,96
53C	YMP	3	18,5 ± 6,66
	YPD	5	22,25 ± 10,21

### 3.4. Teste qualitativo do potencial de floculação

Dentre os isolados testados, nenhum exibiu o fenômeno de floculação que é observado pela formação de flocos. Mesmo não

apresentando floculação, alguns isolados demonstraram rápida precipitação 24 horas depois de serem agitados em vórtex, resultando em meios mais límpidos (4I, 24K, 13H, 10C e 53C).

### 3.5. Identificação molecular dos isolados

Com base nos resultados dos testes qualitativos foram selecionados para a identificação taxonômica molecular os isolados 10C, 13H, 6G, 50M, 4I, 53C e 27K e o isolado 4I por exalar um aroma de pêra como mencionado anteriormente.

A partir do gel contendo os *amplicons* da subunidade 28S do rRNA foi possível observar três diferentes massas moleculares: 900 bp aproximadamente (10C, 13H, 6G, e 50M), 950 bp (4I e 53C) e 925 bp (27K). A partir do gel contendo os *amplicons* da região ITS foi possível observar igualmente três diferentes massas moleculares: 400 bp (10C, 13H, 6G e 50M), 750 bp (4I) e 600 bp (53C). Não foi possível amplificar o isolado 27K nesta

região mesmo após o uso de diferentes diluições.

Baseado na identificação das sequências resultantes da comparação com os bancos de dados *GenBank* e *Mycobank*, as amostras correspondem a três diferentes espécies de leveduras, *Hanseniaspora opuntiae* (4I), *Wickerhamomyces anomalus* (53C) e *Kodamaea ohmeri* (6G, 50M, 10C e 13H). As sequências das subunidades 28S do rRNA dos isolados 6G, 50M, 10C e 13H resultaram igualmente na espécie *Kodamaea ohmeri*. Todavia, as sequências dos isolados 4I e 53C que apresentaram *amplicons* com mesma massa molecular na subunidade 28S do rRNA se diferenciaram na identificação molecular (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Identificação das leveduras a partir da amplificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS e comparação com sequências depositadas no *GenBank*

Isolado	Acesso	Espécie identificada	Similaridade %	Chave de acesso
<b>Subunidade 28S rRNA</b>				
<b>4I</b>	AAMFMZZX016	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,72	KC111446.1
<b>53C</b>	AAMSF55G013	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99,62	EU057562.1
<b>6G</b>	AAN6D8RS016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY397951.1
<b>50M</b>	AAMZUPCJ013	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY397951.1
<b>10C</b>	AANCSHTS016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY397951.1
<b>13H</b>	AANJNXCU016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY397951.1
<b>Região ITS</b>				
<b>4I</b>	AAHMR049013	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,73	MN268780.1
<b>53C</b>	AAJSZ3SD016	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	KX253664.1
<b>6G</b>	AAPJHRDZ016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	98,79	MK394144.1
<b>50M</b>	AAP0XY5J013	<i>Kodamaea ohmeri</i>	98,79	MK394144.1
<b>10C</b>	**	**	**	**
<b>13H</b>	**	**	**	**

\*\* dados de sequência encontrado somente para a subunidade 28S do rRNA

### 3.6. Fermentações e cofermentações

Os isolados 53C e 4I foram selecionados para os testes de fermentações e cofermentações baseados nos resultados obtidos pela identificação molecular, aliados a pesquisas de literatura voltadas para o potencial fermentativo e de produção de *bioflavours*.

Com as curvas padrões de crescimento foi possível observar que o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) atingiu a fase estacionária com 15 horas e o isolado da espécie *W. anomalus*

(53C) somente com 27 horas. No entanto, mesmo o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) atingindo esta fase primeiro, ele produziu seis vezes menos células do que o isolado da espécie *W. anomalus* (53C). Também foi possível observar que até 12 horas, ambas as espécies produziram aproximadamente a mesma quantidade de células, porém com 15 horas o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (13,18 células/ mLx10<sup>6</sup>) produziu três vezes mais células que o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (4,89 células/ mLx10<sup>6</sup>) (Figura 1).

Tabela 3 - Identificação das leveduras a partir da amplificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS e comparação com sequências depositadas no Mycobank.

Isolado	Espécie identificada	Similaridade %	Chave de acesso
Subunidade 28S rRNA			
4I	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	100	SH1547319.08FUKC111446
53C	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	CNRMA8.316
6G	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932 -
50M	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932
10C	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932
13H	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932
Região ITS			
4I	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,73	SH1547319.08FUFM199951
53C	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	PMM10-516L PMM10-516L ITS
6G	**	**	**
50M	**	**	**
10C	**	**	**
13H	**	**	**

\*\* dados de sequência encontrado somente para a subunidade 28S do rRNA

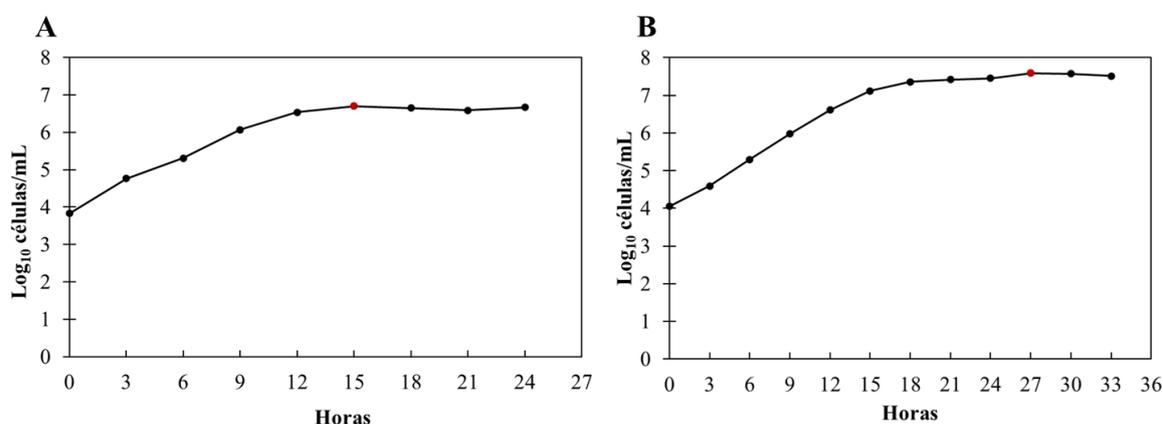


Figura 1 - Curva padrão de crescimento dos isolados das espécies *H. opuntiae* (4I) (A) e *W. anomalus* (53C) (B) apontando o tempo de início da fase estacionária de cada isolado com o marcador em vermelho.

### 3.7. Influência do tipo de isolado usado em cada tipo de fermentação

A partir dos resultados do último dia de fermentação é possível verificar que para as fermentações simples, o tipo de isolado resultou em diferença significativa na viabilidade celular somente na menor temperatura testada

( $p=0$  a  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $p=0,11$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na qual o isolado da espécie *H.opuntiae* (4I) e o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) apresentaram os melhores resultados (Tabela 4). O tipo de isolado também apresentou resultados com diferenças significativas para a concentração de açúcares redutores em ambas as temperaturas ( $p=0$  para ambas). Neste



caso, o controle positivo apresentou o maior consumo de açúcares, seguido pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12 °C e por ambas as leveduras não convencionais a 20 °C. Quanto ao teor alcoólico, os controles positivos

apresentaram maior produção de álcool em ambas as temperaturas e as leveduras não convencionais não apresentaram diferença entre elas ( $p=0$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do teste Tukey de cada variável resposta estudada, comparando o tipo de isolado nas fermentações simples a 12 °C e 20 °C.

Variáveis resposta				
Temperatura	Isolado	Viabilidade celular (%)	Açúcares redutores residual (g/L)	Teor alcoólico (%)
12°C	4I	93 ± 0,03 A	40,74±1,91 B	0,65±0,09 B
	53C	96 ± 2,67 A	53,04±3,88 A	0,83±0,19 B
	C1	67 ± 1,12 B	7,07±0,64 C	4,16±0,38 A
	4I	99 ± 0,77 A	53,75±1,44 A	0,84±0,20 B
20°C	53C	99 ± 0,58 A	53,04±3,88 A	0,82±0,10 B
	C2	97 ± 1,09 A	22,74±0,76 B	4,09±0,14 A

4I = *H. opuntiae*; 53C = *W. anomalus*; C1 = *S. pastorianus*; C2 = *S. cerevisiae*.

Letras maiúsculas comparam o tipo de isolado na mesma variável resposta e tempe-

Os resultados do último dia de fermentação das cofermentações simultâneas indicam que o tipo de isolado interferiu na viabilidade celular em ambas as temperaturas ( $p=0$  para ambas). Neste caso o controle positivo (em fermentação simples) apresentou a maior viabilidade celular em ambas as temperaturas. Na cofermentação simultânea a 20 °C a co-cultura com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) foi responsável pela segunda maior viabilidade celular, enquanto não houve diferença entre as co-culturas usando as leveduras não convencionais na cofermentação simultânea a 12 °C

(Tabela 5). A concentração de açúcares redutores também foi afetada pelo tipo de isolado usado em ambas as temperaturas ( $p=0$ ). Na menor temperatura o controle positivo (em fermentação simples) apresentou o melhor consumo de açúcares e na maior temperatura as co-culturas usando as leveduras convencionais obtiveram melhores resultados. Assim como para as demais variáveis, o tipo de isolado foi significativo para a produção de álcool em ambas as temperaturas ( $p=0$ ), na qual os maiores teores foram obtidos utilizando os controles positivos (em fermentação simples) (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do teste Tukey de cada variável resposta estudada, comparando o tipo de isolado nas cofermentações simultâneas a 12 °C e 20 °C.

Variáveis resposta				
Temperatura	Isolado	Viabilidade celular (%)	Açúcares redutores residual (g/L)	Teor alcoólico (%)
12°C	4I	52 ± 0,63 B	26,83±0,97 A	2,98±0,13 B
	53C	53 ± 1,03 B	28,01±4,36 A	3,31±0,18 B
	C1	67 ± 1,12 A	7,07±0,64 B	4,16±0,38 A
20°C	4I	81 ± 0,34 B	10,85±0,95 B	3,99±0,04 A
	53C	64 ± 6,24 C	13,56±2,84 B	3,99±0,04 A
	C2	97 ± 1,09 A	22,74±0,76 A	4,09±0,14 A

4I = *H. opuntiae*; 53C = *W. anomalus*; C1 = *S. pastorianus*; C2 = *S. cerevisiae*

Letras maiúsculas comparam o tipo de isolado na mesma variável resposta e temperatura de fermentação

Com relação ao último dia de fermentação das cofermentações tardias, o tipo de isolado usado foi significativo para a viabilidade celular em ambas as temperaturas ( $p=0$  a  $12^{\circ}\text{C}$  e  $p=0,01$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Na menor temperatura, as co-culturas usando as leveduras não-convencionais foram responsáveis pelas maiores viabilidade celular, não diferenciando entre si. Na maior temperatura o controle positivo (em fermentações simples) apresentou a maior viabilidade celular (Tabela 6). Neste tipo de cofermentação o consumo de açúcares redutores foi afetado pelo tipo de isolado usado em ambas as temperaturas ( $p=0$ ). O con-

trole positivo (em fermentação simples) apresentou melhor resultado com  $12^{\circ}\text{C}$  e as co-culturas usando as leveduras não convencionais consumiram mais açúcares com  $20^{\circ}\text{C}$ . Para a produção de álcool, o tipo de isolado foi significativo em ambas as temperaturas, todavia teve maior relevância na menor temperatura ( $p=0$  a  $12^{\circ}\text{C}$  e  $p=0,05$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Os controles positivos (em fermentação simples) apresentaram maior produção de álcool nas duas temperaturas. Contudo, a  $20^{\circ}\text{C}$  a co-cultura usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) produziu um teor alcoólico similar ao do controle positivo (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados do teste Tukey de cada variável resposta estudada, comparando o tipo de isolado nas cofermentações tardias a  $12^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$ .

Temperatura	Isolado	Variáveis resposta		
		Viabilidade celular (%)	Açúcares redutores residual (g/L)	Teor alcoólico (%)
$12^{\circ}\text{C}$	4I	$86 \pm 0,76$ A	$47,31 \pm 0,39$ A	$1,65 \pm 0,11$ B
	53C	$87 \pm 2,04$ A	$45,29 \pm 2,02$ A	$1,69 \pm 0,07$ B
	C1	$81 \pm 0,62$ B	$12,14 \pm 2,13$ B	$4,29 \pm 0,04$ A
$20^{\circ}\text{C}$	4I	$74 \pm 3,59$ B	$20,73 \pm 1,27$ B	$3,88 \pm 0,78$ B
	53C	$78 \pm 6,58$ B	$21,54 \pm 1,77$ B	$4,00 \pm 0,24$ AB
	C2	$90 \pm 0,32$ A	$52,37 \pm 2,16$ A	$4,27 \pm 0,07$ A

4I = *H. opuntiae*; 53C = *W. anomalus*; C1 = *S. pastorianus*; C2 = *S. cerevisiae*.

Letras maiúsculas comparam o tipo de isolado na mesma variável resposta e temperatura de fermentação

### 3.8. Comparando a influência do tipo de fermentação usada com o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) e o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I)

No último dia de fermentação de ambas as espécies, o tipo de fermentação interferiu em todas as variáveis respostas estudadas ( $p=0$  para todas as variáveis e em ambas as espécies).

A fermentação simples apresentou maior viabilidade celular em ambas as espécies e para ambas as temperaturas. Para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C), a cofermentação simultânea apresentou a menor viabilidade celular em ambas as temperaturas usadas. Para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), a cofermentação simultânea apresentou menor viabilidade celular somente na menor temperatura. Na maior

temperatura, a cofermentação tardia foi responsável pela menor viabilidade celular para este isolado (Tabela 7). No que diz respeito ao consumo de açúcares redutores, a cofermentação simultânea apresentou o maior consumo em ambas as temperaturas para ambas as espécies. A cofermentação tardia usando as leveduras não convencionais apresentou menor consumo de açúcares a  $12^{\circ}\text{C}$  e a fermentação simples dessas leveduras não convencionais resultou no menor consumo a  $20^{\circ}\text{C}$ . Para a produção de álcool, na maior temperatura, as duas cofermentações usando as co-culturas de ambas as leveduras não convencionais apresentaram maior teor alcoólico. Na menor temperatura, o maior teor alcoólico foi produzido pela cofermentação tardia quando usada a co-cultura com o isolado da espécie *H. opuntiae*

(4I) e pela cofermentação simultânea quando usada a co-cultura do isolado

da espécie *W. anomalus* (53C) (Tabela 7)

Tabela 7 - Resultados do teste Tukey de cada variável resposta estudada, comparando o tipo de fermentação usado a 12 °C e 20 °C em ambas as espécies de leveduras não convencionais.

Isolado e temperatura usados	Tipo de fermentação	Variáveis resposta		
		Viabilidade celular (%)	Açúcares redutores residual (g/L)	Teor alcoólico (%)
<i>H. opuntiae</i> (4I) - 12°C	CS	52 ± 0,63 C	26,83±0,97 C	0,65 ± 0,09 C
	CT	86 ± 0,76 B	47,31±0,39 A	2,98 ± 0,13 A
	FS	93 ± 0,03 A	40,74±1,91 B	1,65 ± 0,11 B
<i>H. opuntiae</i> (4I) - 20°C	CS	81 ± 0,34 B	10,85±0,95 C	3,99 ± 0,4 A
	CT	74 ± 3,59 C	20,73±1,27 B	3,88 ± 0,08 A
	FS	99 ± 0,77 A	53,75±1,44 A	0,84 ± 0,20 B
<i>W. anomalus</i> (53C) - 12°C	CS	53 ± 1,03 C	28,01±4,36 C	3,31 ± 0,18 A
	CT	87 ± 2,04 B	45,29±2,02 A	1,69 ± 0,07 B
	FS	96 ± 2,67 A	36,05±1,58 B	0,85 ± 0,19 C
<i>W. anomalus</i> (53C) - 20°C	CS	64 ± 6,24 C	13,56±2,84 C	3,99 ± 0,04 A
	CT	78 ± 6,58 B	21,54±1,77 B	4 ± 0,24 A
	FS	99 ± 0,58 A	53,04±3,88 A	0,82 ± 0,10 B

CS= Cofermentação simultânea; CT = Cofermentação tardia; FS = fermentação simples  
 Letras maiúsculas comparam o tipo de fermentação na mesma variável resposta, mesmo isolado e temperatura de fermentação

### 3.9. Comparando a influência da temperatura em cada tipo de fermentação usada para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) e o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I)

Nas fermentações simples, a temperatura geralmente influenciou a viabilidade celular e o consumo de açúcares redutores em ambas as espécies (p=0 para ambas as variáveis respostas nas duas espécies). A maior temperatura apresentou maior viabilidade celular para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (99% a 20 °C contra 95% a 12 °C) e para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (99% a 20 °C contra 97% a 12 °C). A menor temperatura resultou na menor concentração de açúcares residuais para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (35,97 g/L a 12 °C e 53,75 g/L a 20 °C) e para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (36,04 g/L a 12°C e 53,04 g/L a 20°C). Nesta temperatura ambas as espécies apresentaram consumo de açúcares até 72 horas de fermentação, enquanto com 20 °C esse consumo ocorreu até o

fim das fermentações (Figura 2). As fermentações simples do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (0,42% a 12 °C e 0,34% a 20 °C) e do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (0,84% a 12°C e 0,82% a 20 °C) mantiveram o teor alcoólico abaixo de 1% em ambas as temperaturas.

Na cofermentação simultânea, a temperatura não influenciou significativamente a viabilidade celular nem da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (p= 0,63) nem da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (p= 0,38). No que se refere a concentração de açúcares redutores e a produção de álcool, a temperatura foi significativa para ambas as espécies (p=0 para ambas as variáveis nas duas espécies). A maior temperatura promoveu a menor concentração de açúcares residuais na co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (10,85 g/L a 20°C e 26,83 g/L a 12°C) e na co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (13,56 g/L a 20°C e 28,01 g/L a 12°C), as-

sim como os maiores teores alcoólicos para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (3,99% a 20°C e 2,98% a

12°C) e para a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (3,99% a 20°C e 3,31% a 12°C) (Figura 3).

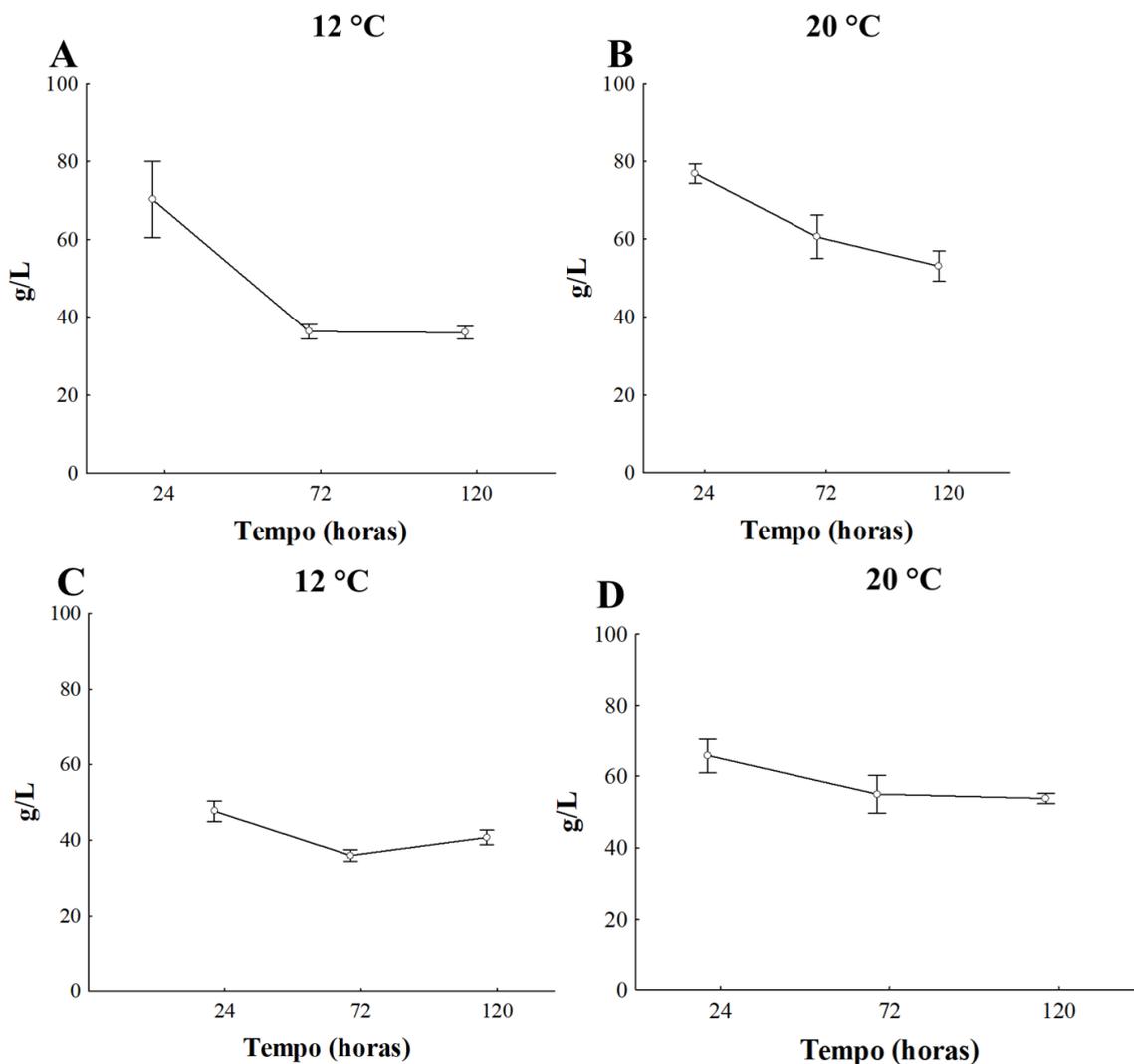


Figura 2 - Relação entre a concentração de açúcares residuais (g/L) e o tempo de fermentação durante as fermentações simples dos isolados da espécie *W. anomalus* (53C) a 12 °C (A) e 20°C (B) e da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12 °C (C) e 20°C (D).

No que diz respeito às cofermentações tardias, a temperatura afetou a viabilidade celular da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) ( $p= 0,03$ ) e não afetou a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) ( $p= 0,11$ ). Na co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a menor temperatura foi responsável pela maior viabilidade celular (93% a 12 °C contra 88% a 20 °C). Além disto, a partir das tabelas 8 e 9 é possível verificar que

na menor temperatura, tanto a co-cultura com o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) quanto a co-cultura com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) mantiveram a viabilidade celular após a adição da levedura convencional, apresentando queda somente com 120 horas de fermentação. Quando usado a maior temperatura, as co-culturas das duas leveduras não convencionais apresentaram queda imediatamente após a adição da

levedura convencional.

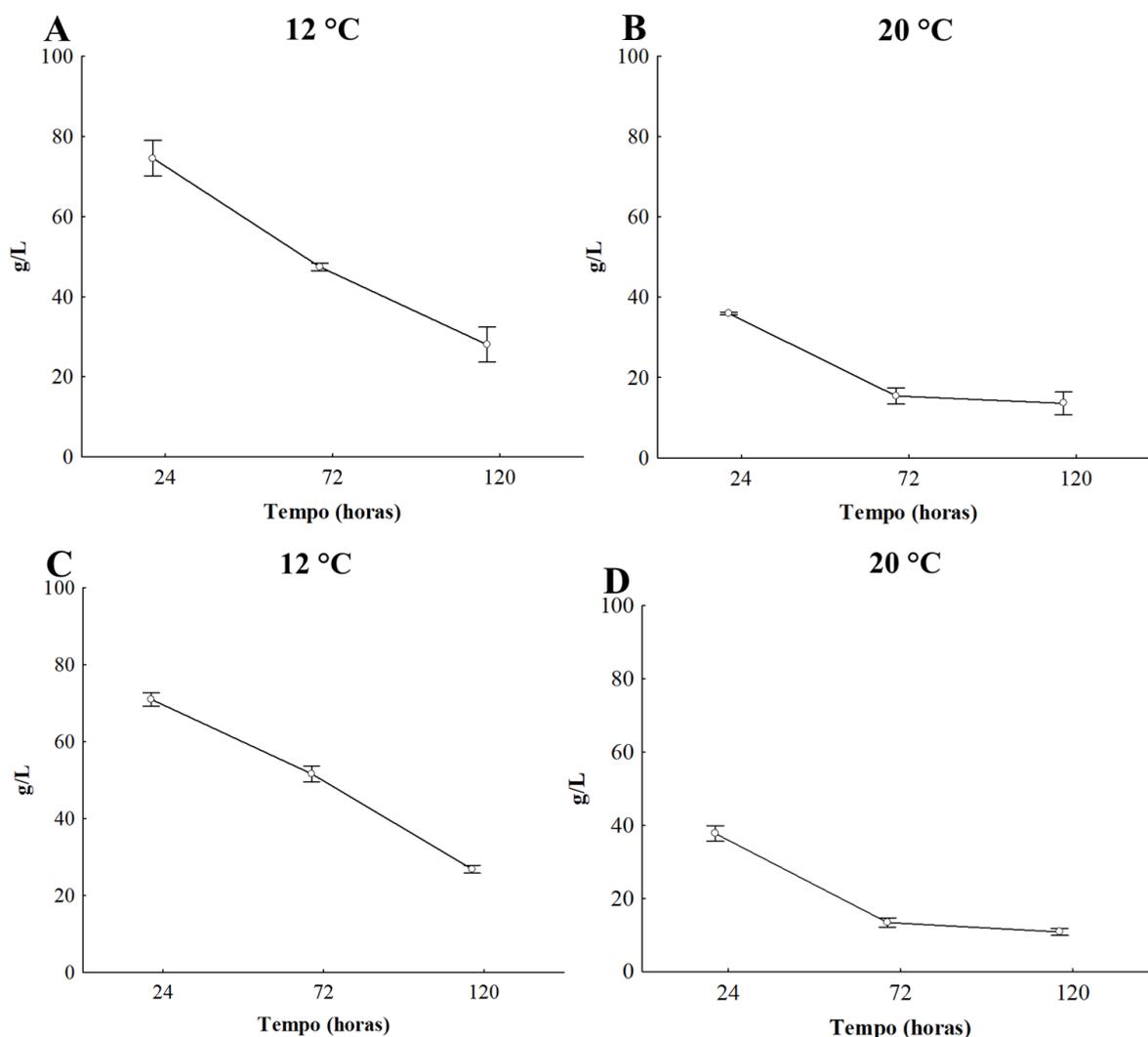


Figura 3 - Relação entre a concentração de açúcares residuais (g/L) e o tempo de fermentação durante as cofermentações simultâneas das co-culturas do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 12 °C (A) e 20°C (B) e do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12 °C (C) e 20°C (D).

Tabela 8 - Resultados do teste Tukey para a cofermentação tardia a 12 °C comparando os tempos de fermentação para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C).

Tempo (horas)	Viabilidade celular (%)	
	Co-cultura da <i>H. opuntiae</i> (4I)	Co-cultura da <i>W. anomalus</i> (53C)
24	99 ± 0,73 <b>A</b>	99 ± 1,52 <b>a</b>
48	97 ± 1,20 <b>A</b>	99 ± 0,30 <b>a</b>
72	94 ± 0,82 <b>B</b>	94 ± 0,94 <b>bc</b>
96	93 ± 1,30 <b>BC</b>	94 ± 2,40 <b>b</b>
120	88 ± 0,47 <b>DE</b>	88 ± 0,81 <b>d</b>
144	90 ± 1,66 <b>CD</b>	90 ± 0,31 <b>cd</b>
168	87 ± 0,99 <b>DE</b>	89 ± 1,70 <b>cd</b>
192	86 ± 0,76 <b>E</b>	87 ± 2,04 <b>d</b>

Letras maiúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e letras minúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C)

Tabela 9 - Resultados do teste Tukey para a cofermentação tardia a 20 °C comparando os tempos de fermentação para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C).

Tempo (horas)	Viabilidade celular (%)	
	Co-cultura da <i>H. opuntiae</i> (4I)	Co-cultura da <i>W. anomalus</i> (53C)
24	100 ± 0,19 <b>A</b>	100 ± 0,07 <b>a</b>
48	99 ± 0,54 <b>A</b>	99 ± 0,08 <b>a</b>
72	95 ± 2,84 <b>AB</b>	96 ± 1,26 <b>a</b>
96	89 ± 2,40 <b>BC</b>	86 ± 1,28 <b>b</b>
120	79 ± 0,20 <b>DE</b>	81 ± 0,46 <b>bc</b>
144	86 ± 4,26 <b>CD</b>	85 ± 4,40 <b>bc</b>
168	85 ± 0,15 <b>CD</b>	77 ± 1,41 <b>c</b>
192	74 ± 3,59 <b>DE</b>	78 ± 6,58 <b>bc</b>

Letras maiúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e letras minúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C)

Voltado para a concentração de açúcares redutores e do teor alcoólico, a temperatura foi significativa nas duas espécies ( $p=0$  para ambas as variáveis respostas nas duas espécies). A maior temperatura apresentou menor concentração de açúcares residuais na co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (41,22 g/L a 20°C e 58,27 g/L a 12°C) e na co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (35,77 g/L a 20°C contra 60,39 g/L a 12°C). Além disso, observou-se também que a adição das *Saccharomyces* impactou de forma diferente no consumo de açúcares dependendo da espécie de levedura não convencional. Enquanto a adição da *Saccharomyces* resultou no aumento da concentração de açúcares na co-cultura com a espécie *W. anomalus* (53C), para a co-cultura com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) ocorreu o contrário (Figura 4). A maior temperatura também resultou nos maiores teores alcoólicos para a co-cultura com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (3,88% a 20°C e 1,65% a 12°C) e para a co-cultura com o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (4,00% a 20°C e 1,69% a 12°C).

## 4. Discussão

### 4.1. Isolamento

Sabe-se que as abelhas sem ferrão são generalistas contudo, existem alguns

graus de "preferência" de acordo com a sazonalidade (MICHENER, 2007), que pode explicar o fato deste estudo ter observado a presença de alguns morfotipos exclusivos no pólen de uma ou outra espécie dentre as espécies de abelha sem ferrão estudadas. A presença compartilhada de alguns morfotipos de leveduras entre duas das espécies de abelhas sem ferrão pode ser explicada pela associação que essas leveduras devem possuir com os ninhos dessas abelhas sem ferrão, assim como pelos comuns recursos de forrageamento entre as mesmas na área estudada. Neto e Morais (2020) em seu estudo demonstraram em uma rede de relacionamento entre espécies de abelhas sem ferrão criada pelas leveduras presentes nos ninhos das abelhas. Nessa rede, assim como no presente estudo é possível verificar a relação entre as espécies *Scaptotrigona postica* e *Frieseomelitta varia* que possuem algumas espécies de leveduras em comum e outras exclusivas.

A existência de leveduras no pólen das abelhas sem ferrão é validada neste estudo, e contribui para a reduzir a lacuna de conhecimento a respeito da microbiota de leveduras presentes nas abelhas sem ferrão, a qual necessita ser catalogada (MENEZES et al., 2013).

### 4.2. Potencial fermentativo de maltose

Foi observado que as leveduras isoladas a partir do pólen das abelhas sem ferrão são capazes de fermentar a maltose mesmo que em uma velocidade e em uma quantidade menor do que uma *S. cerevisiae*. É conhecido que a maior parte dessas leveduras não convencionais, apresentam metabolismo fraco para o processo fermentativo ou não completam o processo de fermentação alcoólica (CIANI e COMITINI 2011; YE et al., 2014; WALKER e WALKER, 2018).

Todavia, as leveduras não convencionais, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomycopsis fibuligera*, estudadas por Liu et al. (2018) demonstraram fer-

mentar a maltose, mas não apresentam a produção de gás e sim de ácido. No que se refere ao fato de alguns morfotipos terem apresentado maiores bolhas de fermentação quando inoculados previamente em YPD e outros em YPM, o mesmo pode estar relacionado com a preferência da fonte de açúcar de cada morfotipo, o qual pode ter potencializado o funcionamento do seu metabolismo antes do processo fermentativo, ou ao fato de que o isolado que está em um meio que possui maltose torna-se predisposto a consumir este açúcar, facilitando o uso do mesmo na fermentação (JOSEPH e BACHHAWAT, 2014).

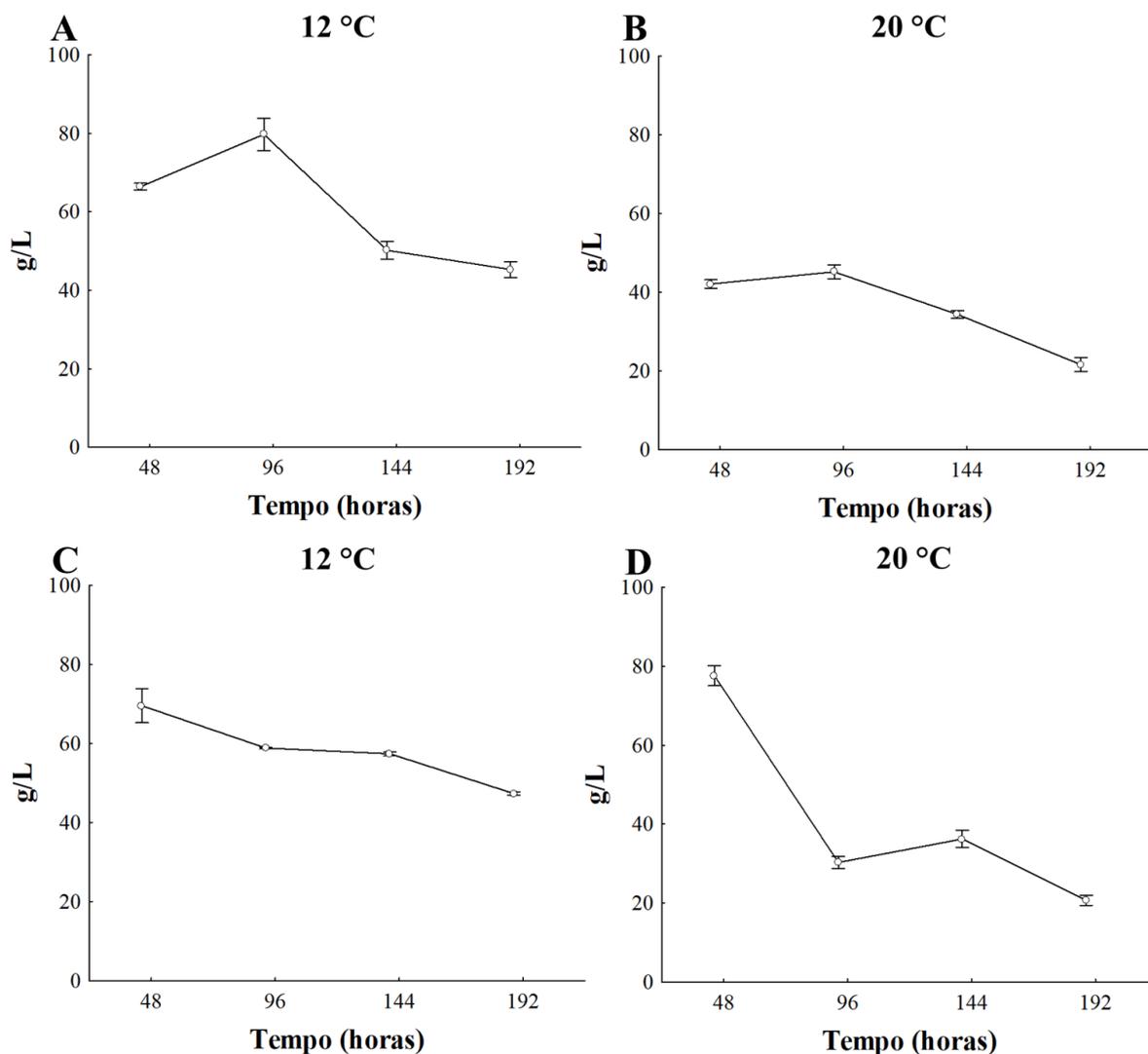


Figura 4 - Relação entre a concentração de açúcares residuais (g/L) e o tempo de fermentação durante as cofermentações tardias das co-culturas do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 12 °C (A) e 20°C (B) e do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) também a 12 °C (C) e 20°C (D).



#### 4.3. Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Usualmente as leveduras não convencionais são conhecidas por sobreviverem a altos teores de açúcares, ou seja, são osmotolerantes como afirma Mukherjee et al. (2017). Esse cenário corrobora somente em parte com o que foi observado no presente. De dezesseis isolados, somente seis apresentaram bom crescimento nas menores e maiores concentrações de ambos os açúcares utilizados. O menor crescimento que alguns isolados apresentaram na maior concentração de glicose pode estar relacionado com a composição do pólen das abelhas sem ferrão do qual foram isolados, pois mesmo que a maioria dos estudos indicam que essas abelhas possuem alta concentrações de açúcares no seu pólen (REBELO et al., 2016; CHUT-TONG et al., 2018), existem algumas pesquisas que obtiveram baixa quantidade de carboidratos na composição do pólen de algumas espécies dessas abelhas. Um exemplo deste fato é a espécie *Tetragonisca angustula*, que no estudo de Vit et al. (2016) apresentou de 27,62 a 31,03 g/100g de carboidrato total no seu pólen.

A dificuldade de crescimento de alguns isolados nas maiores concentrações de maltose observado nesse estudo também foi constatada por Ravasio et al. (2018) em seu trabalho com leveduras não convencionais. O perfil físico-químico do pólen das abelhas sem ferrão depende muito da sua origem floral (que não foi avaliada neste estudo) e pode haver a presença de maltose na composição do seu pólen, mesmo que em menor concentração (DUARTE et al., 2018), o que explicaria a habilidade de certos isolados em metabolizar esse açúcar.

#### 4.4. Teste qualitativo do potencial de floculação

A floculação, a habilidade que as células possuem de se manterem aderidas umas às outras e formando flocos que podem permanecer suspensos no meio de cultivo ou podem se depositar rapidamente no fundo do recipiente é uma das características mais importantes nas leveduras cervejeiras (LI et al., 201). Esta característica pode classificar o tipo de cerveja produzida, em Lager ou Ale, principalmente na primeira, que normalmente utiliza leveduras com floculação que resulta na presença de células no fundo do tanque de fermentação sedimentação (GIBSON et al., 2020). Contudo, como visto nos resultados, no presente estudo não foi verificada essa característica em nenhum dos isolados testados. Esse contexto também foi notado por Matraxia et al. (2021) em seu trabalho com cepas da espécie *Hanseniaspora uvarum*, as quais não apresentaram formação de flocos. A ausência desta característica nas leveduras não convencionais pode estar relacionada com a falta de expressão, principalmente, dos genes FLO e a fatores ambientais, visto que a floculação é uma característica influenciada por fatores como temperatura, nutrientes, aeração, entre outros (SOARES 2010; PANTELOGLOU e SMART 2012, LI et al. 2017).

#### 4.5. Identificação molecular dos isolados

A espécie *Hanseniaspora opuntiae*, identificada neste trabalho, é geralmente apontada por grande parte dos estudos, como presente em fases iniciais de fermentações espontâneas de frutas e na produção do vinho (BASTO et al., 2018). Além disso, geralmente as espécies de leveduras do gênero *Hanseniaspora* possuem como característica a colonização de ambientes ricos em açúcares (LIBKIND et al., 2020), o que explicaria sua presença nas fases iniciais das fermentações, uma vez que essas fases



possuem maior concentração de açúcares.

A espécie de levedura não convencional *Wickerhamomyces anomalus*, a qual corresponde ao isolado 53C, conhecida também pelo nome de *Pichia anomala* e *Hansenula anomala* é considerada uma espécie bem difundida na natureza e presente em diferentes materiais de plantas e no solo Kurtzman et al. (2008). Basso et al. (2016) em seu trabalho pontuou alguns locais onde *W. anomalus* pode ser encontrada, sendo esses, na cerveja, na massa fermentada, em frutas, no saquê e na madeira de carvalho. Portanto, essa variedade de ambientes reforça a afirmação da *W. anomalus* ter vasta disseminação na natureza. Além do mais, muitos estudos relacionam a *W. anomalus* com o ambiente fermentativo (SPITAEIS et al. 2014; PORRU et al. 2017; XIE et al. 2018)

A espécie *Kodamaea ohmeri* correspondente aos demais isolados submetidos a identificação molecular já foi isolada em estudos anteriores na cerveja indígena conhecida como chicha (PILÓ et al., 2018), em vinho de palmeira, o qual é confeccionado a partir da fermentação da seiva de palmeiras (OUBA et al., 2012), na fermentação da pimenta Jalapenõ (GONZÁLEZ-QUIJANO et al., 2014) e no "pão de abelha" fresco da *Apis mellifera* (DETRY et al., 2018). Contudo, mesmo que o quadro apresentado acima demonstre uma forte ligação entre essa espécie e os ambientes fermentativos, alguns estudos vêm relacionando essa mesma espécie a infecções em humanos, que apesar de ocorrer raramente, tem capacidade de provocar severas infecções generalizadas em pacientes com fatores de risco, com queimaduras profundas ou imunocomprometidos (TASHIRO et al., 2018; MTIBAA et al., 2019). Além disso, o fato da *K. ohmeri* pertencer à mesma família que a *Candida* faz com que na hora de ser diagnosticada ela seja muito comumen-

te confundida com espécies de *Candida*. Todavia, o antifúngico geralmente usado contra a *Candida*, o *fluconazol*, é menos eficiente contra a *K. ohmeri*, tornando-a mais infecciosa (HITAM et al., 2021).

Como foi possível notar, as três espécies identificadas no presente estudo estão intimamente ligadas a processos fermentativos, o que pode explicar o fato das mesmas estarem presentes no pólen das abelhas sem ferrão, o qual é conhecido por passar por um processo fermentativo depois de estocado nos potes (MENEZES et al., 2018). Dentre as espécies de leveduras não convencionais isoladas e com base em todo o cenário apresentado anteriormente, a *Hanseniaspora opuntiae* e a *Wickerhamomyces anomalus* são as que possuem maior potencial para serem usadas na indústria alimentícia.

#### **4.6. Fermentações e cofermentações**

Foi possível observar que o acumulado de 15 horas apresentou a maior diferença na quantidade de células produzidas pelas duas espécies de leveduras não convencionais, o que deve estar diretamente relacionado às fases exponenciais e estacionárias do isolado de cada espécie. Enquanto o isolado da espécie *H. opuntiae* atinge a sua fase estacionária com 15 horas, o isolado da espécie *W. anomalus* nesse mesmo momento está iniciando a sua fase exponencial. A partir desses resultados dois cenários distintos podem ser considerados no contexto biotecnológico. O primeiro apontaria o isolado da espécie *W. anomalus* como uma ótima candidata para uso em processos fermentativos, pois a mesma atinge a fase estacionária com pouco mais de 12 horas de fermentação, o que aceleraria os processos realizados, pois normalmente essa fase é atingida com 24 horas ou mais (TORRELLAS et al., 2020). Em contrapartida, o se-



gundo cenário apontaria o isolado da espécie *H. opuntiae* como a melhor candidata para fins biotecnológicos, pois mesmo atingindo a fase estacionária um pouco após 24 horas de fermentação, a mesma possui um ótimo rendimento celular.

A maior viabilidade celular observada nas fermentações simples dos isolados da espécie *H. opuntiae* e da espécie *W. anomalus* quando comparada com os controles positivos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*), pode estar relacionada a utilização dos nutrientes por ambas as leveduras. Enquanto as leveduras não convencionais estão direcionando a utilização desses nutrientes para a reprodução celular e de outras substâncias como por exemplo o glicerol (o qual não foi analisado neste estudo), as espécies de *Saccharomyces* comerciais são conhecidas pela eficiência em converter açúcares em álcool e CO<sup>2</sup>. O fato da cofermentação simultânea de forma geral ter afetado mais a viabilidade celular deve estar relacionado a rápida produção desses metabólitos pelas *Saccharomyces*, os quais afetam desde o início o crescimento das leveduras não convencionais enquanto a cofermentação tardia deve proporcionar nos primeiros três dias sem as *Saccharomyces* uma população razoável das células dos isolados da espécie *W. anomalus* e da espécie *H. opuntiae*.

O pouco consumo dos açúcares observados pelas espécies de leveduras não convencionais em fermentação simples corrobora com os resultados obtidos nos testes qualitativos de fermentação da maltose, que demonstram que tanto o isolado da espécie *W. anomalus* quanto o isolado da espécie *H. opuntiae* fermentam sim a maltose, contudo muito menos do que uma *Saccharomyces*, o que pode estar relacionado a pouca presença dos locus independentes MAL, responsáveis pela fermentação desse

açúcar, nos seus genomas (NOVAK et al., 2004). Esse baixo consumo dos açúcares por essas espécies de leveduras não convencionais também explica o baixo teor alcoólico obtido nas suas fermentações simples, nas quais mesmo o isolado da espécie *W. anomalus* apresentando o dobro do teor alcoólico do isolado da espécie *H. opuntiae*, ainda assim apresentou menos de 1% de álcool, não podendo ser comparado com o teor alcoólico alcançado pelo controle positivo. O fato dos isolados da espécie *W. anomalus* e da espécie *H. opuntiae* terem consumido mais rápido e melhor os açúcares na menor temperatura pode demonstrar que são leveduras mais indicadas para serem usadas na produção de cervejas do tipo Lager, fermentadas a temperaturas mais baixas que a Ale (LI et al., 2017).

O aumento do consumo de açúcares observado na co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* e na co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* com as *Saccharomyces* quando comparado a cultura simples dessas leveduras não convencionais, deve estar relacionado com o uso da maltose pelas *Saccharomyces*, associado ao consumo de glicose pelos isolados da espécie *W. anomalus* e da espécie *H. opuntiae*. O aumento no teor alcoólico constatado nas cofermentações deve estar diretamente relacionado com essa melhora no consumo dos açúcares.

Além disso, a maior temperatura ter apresentado maior consumo dos açúcares redutores e maiores teores alcoólicos nos dois tipos de cofermentações pode estar diretamente relacionado ao tipo de *Saccharomyces* usada, pois a *S. cerevisiae*, usada na maior temperatura, apresenta uma fermentação mais rápida e eficiente do que a *S. pastorianus* usada na temperatura mais baixa. Enquanto a *S. pastorianus*, apresenta uma fermentação de 7 a 10 dias, a *S. cerevisiae*, apresenta uma fermentação



de 3 a 5 dias (LIBKIND et al., 2011). Essa característica pode explicar por que a cofermentação simultânea, na menor temperatura, converteu mais açúcares em álcool do que a cofermentação tardia e a 20 °C não haver diferença entre o teor alcoólico dessas duas cofermentações. Ou seja, enquanto adicionar a *S. cerevisiae* três dias depois da fermentação ou no início da fermentação pode não afetar tanto seu resultado com oito dias de fermentação, esse intervalo de tempo deve afetar o rendimento da *S. pastorianus* em uma fermentação com a mesma duração.

## 5. Conclusão

O pólen de abelhas sem ferrão mostrou possuir grande potencial para o isolamento de leveduras com potencial para uso em cofermentação ou na produção de bebidas de baixo teor alcoólico na indústria de bebidas.

Os isolados da espécie *W. anomalus* e da espécie *H. opuntiae* apresentaram maiores consumo de açúcares redutores quando empregados em temperatura mais baixa, indicando seu potencial uso na produção de bebidas com baixo teor alcoólico produzidas em temperaturas mais amenas. A cofermentação dessas duas leveduras não convencionais com leveduras convencionais mostrou possuir potencial para a produção de bebidas alcoólicas à base de malte.

## Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad-Amazônia), assim como ao Centro de apoio Multidisciplinar / UFAM e ao Departamento de Genômica da População pecuária da Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha.

## Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

## Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BÁRBARA, M. S.; MACHADO, C. S.; SODRÉ, G. S.; DIAS, L. G.; ESTEVINHO, L. M.; CARVALHO, C. A. L. Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12525-12544, 2015.
- BASSO, D. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.
- BASTOS, V. S.; SANTOS, M. F.S.; GOMES, L. P.; LEITE, A. M.O.; PASCHOALIN, V.M.F.; AGUILA, E. M. D. Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in southern Brazil. **Research Article**, v. 98, n. 13, p. 4963-4970, 2018.
- BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 691-698, 2004.
- BELLUT, K. *et al.* Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 1-19, 2018.



BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p.39-51, 1993.

BOYNTON, J. P.; GREIG, D. Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. **Fungal Ecology**, v. 22, p. 61–72, 2016.

CALAÇA P.; SIMEÃO C.; BASTOS E. M.; ROSA C. A.; ANTONINI Y. On the Trophic Niche of Bees in Cerrado Areas of Brazil and Yeasts in Their Stored Pollen. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Cham: Springer, 2018. p. 241-252.

CHUTTONG, B.; PHONGPHISUTTHINANT, R.; SRINGARM, K.; BURGETT, M.; BARTH, O. M. Nutritional Composition of Pot-Pollen from Four Species of Stingless Bees (Meliponini) in Southeast Asia. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**, Cham: Springer, 2018. p. 313-324.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**. v. 61, p. 25-32, 2011.

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

DETRY, R.; SIMON-DELISO, N.; BRUNEAU, E.; DANIEL, H. Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, 1789, 2020.

DUARTE, A. W. F.; VASCONCELOS, M. R. S.; ODA-SOUZA, M.; OLIVERIA, F. F.; LÓPEZ, A. M. Q. Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 493-503, 2018.

FIGUEIREDO, B. I. C.; SARAIVA, M. A. F.; PIMENTA, P. P. S.; TESTASICCA, M. C. S.; SAMPAIO, G. M. S.; CUNHA, A. C.; AFONSO, L. C. C.; QUEIROZ,

M. V.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. New Lager Brewery Strains Obtained by Crossing Techniques Using Cachaça (Brazilian Spirit) Yeasts. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 20, e01582-17, 2017.

FIGUEROA-HERNANDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ, J.; FERROCINO, I.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; COCOLIN, L.; SUÁREZ-QUIROZ, M. L. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 41-50, 2019.

GIBSON, B.; DAHABIEH, M.; KROGERUS, K.; JOUHTEN, P.; MAGALHÃES, F.; PEREIRA, R.; SIEWERS, V.; VIDGREN, V. Adaptive Laboratory Evolution of Ale and Lager Yeasts for Improved Brewing Efficiency and Beer Quality. **Annual Review of Food and Technology**, v. 11, p. 23-44, 2020.

GONZÁLEZ-QUIJANO, G. K.; DORANTES-ALVAREZ, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; PEREA-FLORES, M. J.; LEÓN, A. V.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Halotolerance and Survival Kinetics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Jalapeño Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fermentation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 8, M1545, 2014.

HENRIQUES, D.; ALONSO-DEL-REAL, J.; QUEROL, A.; BALSACANTO, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 88, 2018.

HITAM, S. A. S. A case report of *Kodamaea ohmeri* infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101(S1), p. 384, 2021.

JOSEPH, R.; BACHHAWAT, A. K. Yeast: Production and commercial uses. In: Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello (2 eds) **Encyclopedia of food microbiology**. Cambridge, Massachusetts Academic Press, 2014. p. 823-830.

KURTZMAN, ROBNETT and BASEHOAR-POWERS. Diagnosis of the genus. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W and TEUN BOEKHOUT (5 eds) **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 2008. p. 899-917.

LI, H.; LIU, Y.; ZHANG, W. Method for Manufacturing Alcohol-Free Beer through *Candida shehatae*. **China Patent CN102220198**, 6 Feb, 2014.



LI, Q.; WANG, J; LIU, C. Beers. In: PANDEY, A., SANROMÁN, M. A., DU, G., SOCCOL, C. R. and DUSSAP, C. (eds) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering- Food and Beverages Industry**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. p. 305-351.

LI, Z.; LI, H.; SONG, K.; CUI, M. Performance of non-Saccharomyces yeasts isolated from Jiaozi in dough fermentation and steamed bread making. **LWT – Food Science and Technology**, v. 111, p. 46-54, 2019.

LIBKIND, D.; HITTINGER, C. T.; VALÉRIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011.

LIBKIND, D.; PERIS, D.; CUBILLOS, F. A.; STEENWYK, J.L.; OPUNLENTE, D. A.; LANGDON, Q. K.; ROKAS, A.; HITTINGER, T. Into the wild: new yeast genomes from natural environments and new tools for their analysis. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 2, foaa008, 2020.

LIU, T.; LI, Y.; SADIQ, F. A.; YANG, H.; GU, J.; YUAN, L.; LEE, Y, K.; HE, G. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 242, p. 404-411, 2018.

MATRAXIA, M.; ALFONZO, A.; PRESTIANNI, R.; FRANCESCA, N.; GAGLIO, R.; TODARO, A.; ALFEO, V.; PERRETTI, G.; COLUMBA, P.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. **Food Microbiology**, v. 99, 103806, 2021.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. F. L.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In: VIT. P., R. M. PEDRO, P. S. R. M and ROUBIK, 1 eds. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. New York: Springer-Verlag, 2013. p. 153-171.

MENEZES, C.; PALUDO, C. R.; PUPO, M.T. A Review of the Artificial Diets Used as Pot-Pollen Sub-

stitutes. In: VIT. P., R. M. PEDRO, P. S. R. M and ROUBIK, 1 eds. **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Switzerland: Springer, Cham, 2018. p. 253-262.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. 2. Ed. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press, 2007.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426- 428, 1959.

MORAIS P. B.; CALAÇA P. S. S. T.; ROSA C. A. Microorganisms Associated with Stingless Bees. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds) **Pot-Honey**. Springer. New York: Springer, 2013. p. 173 – 186.

MTIBAA, L.; SOULD, H.; JEMLI, B.; HAJJEJ, Z.; HALWENI, C.; REBAL, A.; MHAMED, R. B.; AKKARA, K.; FERJANI, M. *Kodamaea ohmeri*, An Emerging Yeast in Tunisia: First Identification in Three Case Reports and Literature Review. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 8, n. 2, 1000299, 2019.

MUKHERJEE, V.; RADECKA, D.; AERTS, G.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B.; THEVELEIN, M. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 216, p. 2-19, 2017.

NETO, D. J. C.; MORAIS, P.B. The vectoring of Starmerella species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, v. 47, 100973, 2020.

NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, NOVAK, V. Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 213-218, 2004.

OUOBA, L. I .I., KANDO, C.; PARKOUDA, C.; SAWADOGO-LINGANI, H.; DIAWARA, B.; SUTHERLAND, J. P. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 6, p. 1428-1441, 2012.



PADILHA, B., GIL, J. V.; MANZANARES, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. **Fermentation**, v. 4, n. 68, 2018.

PANTELOGLOU, A. G.; SMART, K. A.; COOK, D. Malt-induced premature yeast flocculation: current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 813-822, 2012.

PILÓ, F. B.; CARVAJAL-BARRIGA, E. J.; GUAMÁN-BURNEO, M.C.; PORTERO-BARAHONA, P.; DIAS, A. M. M.; FREITAS, L. F.D.; GOMES, F. C. O.; ROSA, C. A. *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. **Biotechnology and Industrial Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 808-815, 2018.

PORRU, C.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.; BENÍTEZ-CABELLO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; ZARA, G.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I.; ARROYO-LÓPEZ, F. Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. **Food microbiology**, v. 69, p. 33-42, 2018.

RAVASIO, D.; CARLIN, S.; BOEKHOUT, T.; GROENEWALD, M.; VRHOVSEK, U.; WALTHER, A.; WENDLAND, J. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. **Fermentation**, v. 4, n. 15, 2018.

REBELO, K. S.; FERREIRA, A. G.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 46, n. 5, p. 927-932, 2016.

RIJSWIJCK, I. M. H. V.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J. C. M.; ABEE, T.; SMID, E. J. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1591-1602, 2017.

RUSTERHOLZ, H. P.; URSENBACHER, S.; CORAY, A.; WEIBEL, U.; BAUR, B.; URBAN, J. DNA quantity and quality in remnants of traffic-killed specimens of an endangered longhorn beetle: comparison of different methods. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 120, 2015.

SARENS, S.; SWIEGERS, J. H. **Enhancement of Beer flavor by a combination of Pichia and different hop varieties**. WO 2013/030398, 07 de mar de 2013.

SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; LINS, A.C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA, E.M.S.; FREITAS, B.M.; SANTOS, F.A.R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 507-511, 2006.

SILVA, G. R.; NATIVIDADE, T. B.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1015-1021, 2014.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-47, 2010.

SUZZI, G.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation Of Wine Yeasts - Frequency, Differences, And Stability Of The Character. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 36-39, 1984.

SPITAELS, F.; WIEME, A.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.; LANDSCHOOT, A. V.; VUYST, L. D.; VANDAMME, P. The Microbial Diversity of Tradicional Spontaneously Fermented Lambic Beer. **PLoS one** 9, v.9, n.4, e95384, 2014.

TAHEUR, F. B.; MANSOUR, C.; JEDDOU, K. B.; MACHREKI, Y.; KOUIDHI, B.; ABDULHAKIM, J. A.; CHAIEB, K. Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. **Toxicology**, v. 179, p. 76-83, 2020.

TASHIRO, A.; NEI, T.; SUGIMOTO, R.; WATANABE, A.; HAGIWARA, J. TAKIGUCHI, T.; YOKOTA, H.; KAMEI, K. *Kodamaea ohmeri* fungemia in severe burn: Case study and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 22, p. 21-23, 2018.

VANNETTE, L. R.; FUKAMI, T. Historical contingency in species interactions: towards niche-based predictions. **Ecology Letters**, v.17, n. 1, p. 115-124, 2014.

Villegas-Plazas, M.; Figueroa-Ramírez, J.; Portillo, C.; Monserrate, P.; Tibatá, V.; Sánchez, O.



Biotechnologia

**Scientia Amazonia, v. 11, n.1, B1-B23, 2022**

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

A.; Junca, H. Yeast and Bacterial Composition in Pot-Pollen Recovered from Meliponini in Colombia: Prospects for a Promising Biological Resource. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Cham: Springer, 2018. p. 263 – 279.

VIT, P.; SANTIAGO, B.; SILVIA, P.; RUIZ, J.; MAZA, F.; PENA-VERA, M.; PEREZ-PEREZ, E. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by Melipona and Scaptotrigona stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.28, n. 2, p. 78-84, 2016.

WALKER, M. G. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Springer Science+Business**, v. 99, n.1, p. 25-34, 2011.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-43, 2018.

XIE, C.; ZENG, H.; WANG, C.; XU, Z.; QIN, L. Volatile flavour components, microbiota and their correlations in different sufu, a Chinese fermented soybean food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1761-1773, 2018.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation. **FEMS Yeast Research**, v, 14, n. 6, p. 873-882, 2014.

YEO, H. Q.; LIU S.-Q. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects, **Int. J. Food Sci. Technol**, v. 49, n. 7, p. 1607–1618, 2014.

ZHA, M.; SU, B.; WU, Y.; YIN, S.; WANG, C. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Wickerhamomyces anomalus* for Chinese Baijiu making. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 2018.