

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**HIDROMEL: SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL, EFEITO DE
LEVEDURAS E CARACTERIZAÇÃO DE “MOSCATO-PYMENT”**

LUISA VIVIAN SCHWARZ

Caxias do Sul

2018

LUISA VIVIAN SCHWARZ

**HIDROMEL: SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL, EFEITO DE
LEVEDURAS E CARACTERIZAÇÃO DE “MOSCATO-PYMENT”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

**Caxias do Sul
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S411h Schwarz, Luisa Vivian

Hidromel : suplementação nutricional, efeito de leveduras e
caracterização de "moscato-pyment" / Luisa Vivian Schwarz. – 2018.
95 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Sergio Echeverrigaray.

Coorientação: Ana Paula Longaray Delamare.

1. Hidromel. 2. Bebidas alcoólicas. 3. Fermentação. 4. Leveduras. I.
Echeverrigaray, Sergio, orient. II. Delamare, Ana Paula Longaray,
coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 663.393

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o) Paula
Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

LUISA VIVIAN SCHWARZ

**HIDROMEL: SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL, EFEITO DE
LEVEDURAS E CARACTERIZAÇÃO DE “MOSCATO-PYMENT”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE NOVEMBRO DE 2018.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

Prof. Dr. Vitor Manfro

Prof. Dr. Marli Camassola

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

“Par Toutatis!”

Albert Uderzo & René Goscinny

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais Mônica e Ricardo, pelo carinho, apoio e palavras de incentivo.

À Camila pelo incentivo, consideração, trocas de conhecimentos e por estar ao meu lado.

Aos professores Dr. Sergio Echeverrigaray e Dra. Ana Paula Longaray Delamare, que acreditaram na minha capacidade e que aceitaram me orientar nesta etapa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, que de alguma forma auxiliaram na realização do trabalho, seja de forma direta na bancada ou auxiliando nas discussões.

Gostaria de agradecer especialmente Dra Angela Rossi Marcon que me ensinou e me auxiliou na realização da maioria dos experimentos.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de acompanhamento, Dra Marli Camassola e Dr Mauricio Moura da Silveira, pelas correções e sugestões realizadas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que de forma direta contribuíram na minha formação intelectual.

Aos funcionários, pelo auxílio prestado.

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Mel	16
3.1.1 Composição do mel	16
3.1.2 Compostos aromáticos e fenólicos	21
3.2 Hidromel.....	22
3.2.1 Processo fermentativo de produção de hidromel	23
3.2.2 Leveduras.....	25
3.2.3 Composição aromática	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 ARTIGO 1.....	29
OPTIMIZATION OF NITROGEN, MINERALS AND VITAMINS SUPPLEMENTATION FOR MEAD PRODUCTION: A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY APPROACH	29
4.2 ARTIGO 2.....	48
SELEÇÃO DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COM BAIXA DEMANDA DE NITROGÊNIO PARA A FABRICAÇÃO DE HIDROMEIS	48
4.3 ARTIGO 3.....	69
CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA DE FERMENTADO “MOSCATO-PYMENT”: UMA OPÇÃO TECNOLÓGICA	69
5. DISCUSSÃO GERAL	87
6. CONCLUSÕES.....	90
7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	92

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Macroelementos, microelementos e metais pesados no mel.

Tabela 2. Elementos essenciais no mel no Brasil (Batista *et al.*, 2012).

Quadro 1. Classificação de diferentes tipos de hidromel quanto às matérias primas utilizadas.

CAPÍTULO 1

Table 1. Box-Behnken design with un-coded and coded values.

Table 2. Regression coefficients (R^2) and significant level (P) of the models determined for the analyzed parameters.

Table 3. Analyses of variance (ANOVA) for the model and the analyzed parameters.

Table 4. Effect of single minerals on mead fermentation.

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos (médias e desvios padrão) dos hidromeis.

Tabela 2. Concentração dos compostos aromáticos (mg/L) identificados nos hidromeis, limiar de percepção e descritor aromático.

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos dos diferentes fermentados.

Tabela 2. Concentração dos compostos aromáticos (mg/L) identificados no hidromel, nos “pyments”, com as diferentes concentrações de mosto de Moscato, e no vinho Moscato, limiar de percepção e descritor aromático.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Response surface plots as function of mineral and nitrogen supplementation for (A) fermentation rate (g CO₂ / L/ Day), (C) Biomass (g dw/L), (D) Total reducing sugar (g/L), (E) Final YAN (mg/L), (F) Ethanol (% v/v), (G) Glycerol/Ethanol ratio and (I) Total acidity (meq/L); Response surface plots as function of vitamin and nitrogen supplementation for (B) Fermentation rate (g CO₂ / L/ Day) and (H) Volatile acidity (meq/L).

CAPÍTULO 2

Figura 1. Comportamento fermentativo representativo, determinado pelo desprendimento de CO₂, em dependência do teor inicial de nitrogênio assimilável, onde: (A) alta, (B) média e (C) baixa demanda bioquímica de nitrogênio. (●) 60 mg/L, (◐) 75 mg/L e (○) 90 mg/L de nitrogênio assimilável.

Figura 2. Cinética fermentativa determinada pelo desprendimento de CO₂ (g/100mL) para os hidromeis elaborados com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* var *bayanus* QA23® (■), AWRI-R2® (□), SPARK® (▣) e *Saccharomyces cerevisiae* var *cerevisiae* ROUGE® (○) e VL3® (●)

Figura 3. (A) Análise de componentes principais (PC) baseado nos valores de atividade odorífera dos compostos voláteis nos hidromeis fermentados com as leveduras *S. cerevisiae* var *bayanus* QA23, AWRI-R2 e SPARK, e *S. cerevisiae* var *cerevisiae* ROUGE e VL3. (B) Contribuição das variáveis para a análise multivariada de componentes principais: 2-feniletanol (A), ácido hexanoico (B), ácido octanoico (C), ácido n-decanoico (D), ácido 9-decenoico (E), acetato de isoamila (F), acetato de feniletila (G), butirato de etila (H), hexanoato de etila (I), heptanoato de etila (J), octanoato de etila (K), nonanoato de etila (L), decanoato de etila (M), fenilacetato de etila (N), 9-decenoato de etila (O), linalol (P), citrônolol (Q), nerolidol (R), terpineol (S), limoneno (T), acetaldeído (U), 3-etoxi-1-propanol (V), 3-metil-1-propanol (W), eugenol (X) e 2-metoxi-4-vinilfenol (Y).

CAPÍTULO 3

Figura 1. Comparação da cinética fermentativa determinada pelo desprendimento de CO₂ (g/L) entre os diferentes tratamentos: hidromeis (○), “pymment” com 10% de Moscato (●), “pymment” com 20% de Moscato (●), “pymment” com 30% de Moscato (●) e vinho Moscato (●).

Figura 2. (a) Análise de componentes principais (PC) com base nos compostos voláteis com OAV >1 para o hidromel (○), “pymments” com 10% (●), 20% (●) e 30% de mosto Moscato (●) e vinho Moscato (●), e (b) Contribuição das variáveis: 2-feniletanol (A); 1-dodecanol (B); ácido hexanoico (C); ácido octanoico (D); ácido decanoico (E); ácido dodecanoico (F); acetato de isoamila (G); acetato de hexila (H); acetato de feniletila (I); hexanoato de etila (J); octanoato de etila (K); decanoato de etila (L); dodecanoato de etila (M); 9-decenoato de etila (N); linalol (O); hotrienol (P); citronelol (Q); terpineol (R); limoneno (S); geraniol (T); acetaldeído (U) e vinilguaiacol (V).

RESUMO

O hidromel é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel e água ou sucos, que nos últimos anos tem tido um aumento na sua demanda, assim como nos seus produtos derivados. Porém, a elaboração dessa bebida enfrenta vários problemas que incluem fermentações lentas, paradas fermentativas e falta de uniformidade do produto final, causados principalmente pelo desequilíbrio de nutrientes do mosto de mel e pela inadequação das leveduras utilizadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar, através da metodologia de superfície de resposta, o processo de fermentação do hidromel, baseando-se em fatores nutricionais, seleção de leveduras enológicas para a elaboração de hidromel e caracterização de fermentados com mosto de mel e distintas concentrações de mosto de uvas Moscato. Os resultados mostraram que a suplementação com nitrogênio e minerais, principalmente potássio, influenciam significativamente a taxa fermentativa e a produção de biomassa, aumentando a concentração de etanol, a relação glicerol/etanol, a acidez total e a acidez volátil, enquanto que a suplementação com nitrogênio e vitaminas influencia a taxa fermentativa e a acidez volátil. Considerando todas as variáveis analisadas, as condições ótimas para a fermentação do hidromel incluem uma suplementação com nitrogênio assimilável para atingir 150mg/L, a adição de minerais para obter pelo menos 600 mg/L de potássio e uma suplementação com um complexo vitamínico. A seleção de leveduras em distintas concentrações de nitrogênio permitiu selecionar cinco leveduras com baixa demanda: QA23, AWRI-R2, SPARK (*S. cerevisiae* var. *bayanus*) e ROUGE, VL3 (*S. cerevisiae* var. *cerevisiae*). A levedura ROUGE destacou-se por maior taxa fermentativa (0,51 gCO₂/100ml/dia), biomassa (1,42 g/L), gerando hidromeis com maior conteúdo de etanol (11,23% v/v), menor concentração de açúcares residuais (14,35 g/L) e concentrações intermediárias de compostos voláteis. Por outro lado, a levedura SPARK destacou-se por produzir hidromeis com maiores concentrações de álcoois superiores (189,52 mg/L), ácidos graxos (62,44 mg/L) e ésteres etílicos (38,97 mg/L) e a levedura AWRI-R2 por hidromeis com maiores concentrações de ésteres acetatos (13,22 mg/L) e terpenos (10,09 mg/L), contribuindo para o aroma do hidromel. A elaboração de “Moscato-pyments” com diferentes percentagens de adição de suco de uva Moscato mostrou contribuição positiva do suco no vigor fermentativo. Os “pyments” exibiram composição e concentração de compostos voláteis intermediárias entre o vinho Moscato e o hidromel, gerando fermentados com aromas florais e frutados equilibrados e complexidade aromática.

ABSTRACT

Mead is an alcoholic beverage produced by the fermentation of a diluted solution of honey and water or juices, which in recent years has seen a great increase in its demand as well as its derivatives. However, the elaboration of this beverage faces several problems that include slow fermentations, fermentative stops and lack of uniformity of the final product, caused mainly by the nutrient imbalance of the honey wort and by the inadequacy of the yeasts used. Thus, the objective of this work was to optimize, through surface response methodology, the mead fermentation process, based on nutritional factors, selection of oenological yeasts for the preparation of mead and characterization of fermented with honey must and different concentrations of Muscat grape must. The results showed that nitrogen and mineral supplementation, mainly potassium, significantly influence fermentation rate and biomass production, increasing ethanol concentration, glycerol / ethanol ratio, total acidity and volatile acidity, while supplementation with nitrogen and vitamins influenced the fermentative rate and volatile acidity. Considering all the analyzed variables, the optimal conditions for the fermentation of mead include an assimilable nitrogen supplementation to reach 150mg / L, the addition of minerals to obtain at least 600 mg / L of potassium and supplementation with a vitamin complex. The selection of yeasts at different concentrations of nitrogen allowed to select five yeasts with low demand: QA23, AWRI-R2, SPARK (*S. cerevisiae* var. *bayanus*) and ROUGE, VL3 (*S. cerevisiae* var. *cerevisiae*). ROUGE yeast was characterized by higher fermentation rate (0.51 gCO₂ / 100 ml / day), biomass (1.42 g / L), generating hydromiles with higher ethanol content (11.23% v / v), lower concentration of residual sugars (14.35 g / L), and intermediate concentrations of volatile compounds. On the other hand, SPARK yeast was distinguished by producing hydromiles with higher concentrations of higher alcohols (189.52 mg / L), fatty acids (62.44 mg / L), and ethyl esters (38.97 mg / L), and AWRI-R2 yeast by hydromelts with higher concentrations of acetates (13.22 mg / L) and terpenes (10.09 mg / L), contributing to the aroma of the mead. The elaboration of "muscat-pyments" with different percentages of moscato grape juice addition showed positive contribution of the juice in the fermentative vigor. The "pyments" exhibited composition and concentration of volatile intermaterial compounds between Muscat wine and mead, generating fermented with balanced floral and fruity aromas, and important aromatic complexity.

1. INTRODUÇÃO

O hidromel ou “vinho mel” é uma bebida alcoólica tradicional produzida através da fermentação alcoólica de uma solução de mel mediada por leveduras, podendo sua graduação alcoólica variar de 4 a 22 % (v/v) dependendo da maneira como é elaborado e da legislação vigente de cada país. Considerado como uma das bebidas alcoólicas mais antigas do mundo, o hidromel foi popularmente produzido e consumido nos tempos antigos na Europa, África e Ásia, sendo um importante componente dos rituais dos celtas, anglo-saxões e escandinavos. Porém, com o desenvolvimento de recursos agrícolas e civilizações, o hidromel foi progressivamente sendo substituído pelo vinho e a cerveja. Hoje, o aumento de demanda por “novos” produtos tem propiciado um importante aumento da produção de hidromel em várias regiões do mundo, surgindo como uma alternativa para produtores de mel que buscam derivados com maior valor agregado e opções mercadológicas.

O mel é um produto natural consumido em larga escala mundial, tendo um importante papel na dieta humana e sendo empregado nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de mel do mundo e possui um grande potencial apícola, especialmente por possuir grande extensão territorial, ampla variedade de flora e climas subtropicais e tropicais que favorecem floradas múltiplas. Considerando a sua alta produção e diversidade de meis, o Brasil possui alto potencial para a elaboração de hidromeis com qualidade sensorial e características particulares.

Pires *et al.* (2013), ao analisarem os índices mundiais de documentos de patentes relacionadas ao hidromel e tecnologias correlatas, constataram um aumento a partir do ano de 2011, enquanto a “American Mead Makers Association”, uma organização não governamental que reúne fabricantes de hidromel, lista quase 240 empresas de produção de hidromel nos Estados Unidos da America e 40 nos demais países. Além disso, um estudo realizado por Herbert (2015) mostrou que a indústria de hidromel nos Estados Unidos da America cresceu aproximadamente 130% entre 2012 e 2013, com um aumento de 84% nas vendas no período de 2012 a 2014.

Apesar dos dados, das expectativas de expansão e da sua longa história, o processo de produção do hidromel é pouco conhecido quando comparado com o de produção de outros fermentados, como vinhos e cervejas. Embora se adotem metodologias semelhantes às empregadas em vinificação, diversos problemas têm sido relatados durante a fermentação de hidromel como, por exemplo, baixa taxa fermentativa, frequente parada de fermentação,

produção de aromas desagradáveis de origem leveduriana e a falta de uniformidade do produto final. Estes problemas têm sido associados a vários fatores, incluindo a alta variabilidade da composição do mel, a falta ou limitação de nutrientes essenciais para o desenvolvimento da levedura e capacidade tampão do mel e o uso de leveduras inapropriadas, entre outros. Se por um lado a grande variação na composição do mel representa um problema, ela também abre oportunidade para a produção de hidromeis com características próprias. Além disso, como ocorre no caso de cervejas, os hidromeis podem ser acrescidos de sucos, frutas e extratos vegetais, ampliando a gama de produtos.

Assim sendo, há uma grande demanda por estudos que levem à caracterização da matéria-prima, elucidação dos problemas fermentativos, potencial de novos produtos e outorgem soluções tecnológicas.

Existe uma grande variedade de tipos de hidromeis classificados, entre outros fatores, com base nas matérias-primas adicionais na sua elaboração. Entre essas variedades, destaca-se o “pyment”, nome utilizado para descrever um tipo de hidromel fermentado junto com uvas tintas, brancas ou seus sucos. Frutas e sucos têm sido usados, desde tempos imemoriais, como uma forma de corrigir problemas relacionados ao vigor fermentativo e, principalmente, aumentar a qualidade e a complexidade sensorial do produto fermentado (Gupta & Sharma, 2009).

A Serra Gaúcha, localizada no nordeste do estado do Rio Grande do Sul, detém 90% da produção de vinhos do Brasil. Entre as distintas variedades cultivadas na região, sobressaem aquelas denominadas de Moscatos, nome atribuído a um grupo de variedades *Vitis vinifera* caracterizadas como aromáticas com acidez equilibrada e atributos florais e frutados, como Moscato Branco, Moscato Giallo, Moscato Bianco, Malvasia de Candia, entre outras. Dadas as suas propriedades aromáticas, estas uvas e/ou seu mostos podem trazer características interessantes, peculiares e regionais para hidromeis (melhor descritos como “pyments”). Além disso, na Serra Gaúcha, a produção de hidromel ser favorecida através de parcerias com vinícolas, sendo o possível uso associado dos equipamentos e a colheita oposto uma vantagem econômica para produtores de vinho e hidromel.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação da adição de nutrientes na fermentação de hidromel, a seleção de leveduras enológicas com potencial para a produção de hidromel e a caracterização da composição aromática e físico-química de “Moscato-pyments”, como uma alternativa para a indústria apícola e vinícola da Serra Gaúcha.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com a eficiência do processo de elaboração de hidromeis brasileiros com base na otimização de parâmetros fermentativos fundamentais e seleção de leveduras.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação nutricional (nitrogênio, minerais e vitaminas) sobre o mosto de mel sobre diversos parâmetros fermentativos e físico-químicos do hidromel.

- Selecionar leveduras com características adequadas para a produção de hidromel e determinar sua influência sobre a fermentação e a qualidade aromática de hidromeis.

- Caracterizar e analisar a composição aromática e físico-química de hidromeis obtidos com suplementação de mosto de uva Moscato (“pyments”) em diferentes concentrações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mel

De acordo com a Legislação brasileira, o mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir, principalmente, do néctar das flores que as abelhas recolhem, transformam e combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar (Brasil, 2000).

O mel tem sido usado desde a antiguidade, principalmente como um agente adoçante, sendo este produto também altamente apreciado pela sua riqueza de sabores e aromas (González Lorente *et al.*, 2008). Além disso, dados empíricos mostraram, ao longo da história, a sua eficácia na cicatrização de feridas e queimaduras, em lesões gástricas agudas e crônicas, e no tratamento de infecções (Al-Mamary *et al.*, 2002; Mulu *et al.*, 2004). As propriedades terapêuticas do mel parecem estar relacionadas com suas propriedades físicas e químicas (Basualdo *et al.*, 2007), não tendo sido, até o momento, associadas a nenhum componente específico.

O Brasil se tornou um dos maiores exportadores mundiais de mel num curto espaço de tempo (de Paula *et al.*, 2016). Segundo a Associação Brasileira de Exportadores de Mel (Abemel, 2014), o Brasil é o oitavo maior exportador de mel “in natura”, com mais de 25 mil toneladas exportados em 2014. Além disso, segundo Andrade (2005), o potencial apícola ainda não foi totalmente explorado e possui grande possibilidade para aumentar sua produção, incrementando o agronegócio apícola.

3.1.1 Composição do mel

O mel é um alimento que contém cerca de 200 substâncias (Escuredo *et al.*, 2013). Em termos quantitativos, os principais componentes do mel são açúcares, água, proteínas, ácidos orgânicos, vitaminas (especialmente piridoxina, tiamina, niacina, riboflavina e ácido pantotênico), minerais (incluindo cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco), pigmentos, compostos fenólicos, além de uma grande variedade de compostos voláteis (Alqarni *et al.*, 2014, Ciulu *et al.*, 2011, Pontes *et al.*, 2007).

A composição física e química do mel pode ser variável naturalmente, tendo em vista a interferência de fatores como estagio de maturação do produto, condições climáticas predominantes, espécies de abelhas, tipo de flora, processamento e armazenamento (Silva *et*

al., 2004, da Azeredo *et al.*, 2003). De acordo com Silva *et al.* (2009), a dependência destes fatores é refletida na cor, no sabor, no odor e nas características físico-químicas dos meis, sendo a diversidade tão ampla quanto as condições nas quais ele é produzido. Esta variabilidade pode ser considerada uma vantagem ou uma desvantagem na produção de mel e seus derivados, já que se por um lado amplia as opções de produtos, por outro reduz a padronização dos mesmos.

Os requisitos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle de qualidade do mel são a maturidade do mel (umidade, açúcares redutores e sacarose aparente) e a pureza (sólidos solúveis em água, cinzas e grãos de pólen).

Apesar da sua ampla diversidade, o mel apresenta algumas características básicas descritas a seguir.

- **Carboidratos**

Os carboidratos são os principais constituintes do mel e correspondem a 95-99% da matéria seca (Olaitan *et al.*, 2007). Em média, os méis são compostos principalmente por frutose (38,2 % m/m), glicose (31,3% m/m) e sacarose (0,7 % m/m). Os outros carboidratos no mel constituem cerca de 12% em massa (Iurlina e Fritz, 2005), incluindo dissacarídeos, tais como maltose e isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos (Anklam, 1998).

Estudo realizado por Solayman *et al.* (2016) comparando aproximadamente 1000 amostras de méis de todo o mundo constatou uma grande variação nos valores de frutose (2,65-37,07% m/m), glicose (18,20-32,10 % m/m) e sacarose (0,36–16,57% m/m). Desta forma, fica evidente que a composição de açúcares no mel depende principalmente da sua origem botânica, geográfica, do clima, do processamento e do armazenamento (Escuredo *et al.*, 2014; Tornuk *et al.*, 2013).

- **Água**

A água é o segundo constituinte mais importante do mel, variando entre 13,21 e 26,50 % (m/m), com um valor médio de 17,90 % (Solayman *et al.*, 2016). De acordo com Yücel e Sultanoglu (2013), o teor de água (umidade) pode variar dependendo da origem botânica do mel, o nível de maturidade alcançado na colmeia, as técnicas de processamento e as condições de armazenamento.

O teor de água (umidade) é uma das características mais importantes, influenciando as propriedades físicas do mel, como viscosidade e cristalização e outros parâmetros, como cor, sabor, gravidade específica, solubilidade e capacidade de conservação (Escuredo *et al.*, 2013).

El Sohaimy *et al.* (2015) coletaram e analisaram amostras de mel de diferentes mercados em Alexandria (Egito), representando o mel iemenita (Iémen), saudita (Arábia Saudita) e caxemira (Índia/Paquistão), constatando teores de água entre de 14,70 % a 18,32% (m/m). Já Damasia-Gomes *et al.* (2015) analisaram méis de diferentes estados do Brasil, incluindo Ceará, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Tocantins, e constataram uma variação de 9,42% a 19,91% (m/m), sendo que de acordo com a legislação brasileira o teor de umidade não deve ser inferior a 16,80 % e nem superior a 20% (BRASIL, 2000).

- **Nitrogênio total, proteínas e aminoácidos**

É bem conhecido que o mel contém uma pequena quantidade de proteínas. A presença de proteínas no mel é atribuída às secreções das glândulas salivares da faringe de abelhas e de fontes vegetais (néctar e pólen) (da Silva *et al.*, 2016).

A quantidade de proteínas no mel pode variar, aproximadamente, entre 0,2 a 2,93% (m/m) (Solayman *et al.*, 2016). Uma análise de 34 méis de São Paulo (Brasil) detectou uma variação entre 0,07 e 0,49% (m/m) de proteínas, com um valor médio de 0,23% (m/m) (Marchini e Anacleto, 2004).

Davies (1976) constatou que as proporções entre alguns aminoácidos do mel podem variar dependendo da origem geográfica, mas que estas podem ser ainda maiores quando se comparam méis da mesma região, mas de diferentes origens florais, indicando que a “florada” é mais relevante do que a própria origem geográfica.

Dados mostram que os principais componentes aminados do mel são aminoácidos, tendo sido constatada a presença de 23 aminoácidos em méis de distintas regiões do mundo: histidina, arginina, asparagina, glutamina, serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina, glicina, alanina, ácido beta-aminobutírico, alanina, prolina, tirosina, metionina, valina, cisteína, triptofano, ornitina, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina (Rebane e Herodes, 2010).

Dentre os aminoácidos encontrados no mel, a prolina é o que está presente em maior quantidade, representando entre de 50-85% (m/m) do total (de Almeida Anacleto e Marchini, 2004). Este aminoácido é utilizado pelas leveduras, mas não representa uma fonte de nitrogênio assimilável (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Por outro lado, a maioria dos aminoácidos no mel está na forma ligada e o conteúdo de aminoácidos livres pode ser tão baixo quanto um quinto do total (Paramáset *et al.*, 2006), restringindo, assim, a quantidade de nitrogênio assimilável pelas leveduras durante o processo fermentativo.

- **Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,57% (m/m) do mel, influenciando o pH e a acidez. O mel é geralmente ácido devido à presença de ácidos como o cítrico, málico, succínico, fórmico, acético, láctico e piroglutâmico. Além destes, outros ácidos orgânicos específicos têm sido constatados em méis: aspártico, butírico, fumárico, galacturônico, glucônico, glutâmico, glutárico, glioxílico, 2-hidroxibutírico, α -hidroxi-glutárico, isocítrico, α -cetoglutárico, malônico, metilmalônico, 2-oxopentanoico, propanóico, pirúvico, quínico, xiquímico, tartárico, entre outros (Cherchi *et al.*, 1994, Nozal *et al.*, 2003; Mato *et al.*, 2006).

O pH do mel pode variar entre 3,4 e 6,1, com um valor médio de 3,9 (Iurtina e Fritz, 2005). Entretanto este parâmetro não está diretamente relacionado com a acidez livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (de Rodríguez *et al.*, 2004).

- **Vitaminas e minerais**

O teor de vitaminas é geralmente baixo no mel e varia, assim como outros parâmetros, em decorrência da origem floral (Valbuena, 1992). As vitaminas encontradas no mel incluem tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8H) e ácido fólico (B9). Segundo Bonté e Desmoulière (2013), a vitamina C (ácido ascórbico) também está presente. Estas vitaminas são preservadas devido ao baixo pH do mel.

A filtragem do mel pode causar uma redução no conteúdo de vitaminas devido à remoção quase completa do pólen. Outro fator que causa perda de vitaminas no mel é a oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio produzido pela glicose-oxidase (Ciulu *et al.*, 2011).

O teor de minerais no mel varia de 0,11 a 0,72% (m/m) (Solayman *et al.*, 2016). O mel reflete os componentes químicos das plantas das quais as abelhas coletam seus alimentos, de modo que o conteúdo de oligoelementos presentes no mel depende do tipo de solo, planta e o néctar encontrado (Madejczyk e Baralkiewicz, 2008), podendo indicar a origem botânica de um mel específico (Alqarni *et al.*, 2014). Por outro lado, o processo de coleta, extração e produção por parte do apicultor também podem ter efeito sobre o teor de minerais (Carvalho *et al.*, 2000)

O pólen é rico em minerais (Donadieu, 1983; Lengler, 2002; Moreti, 2004), podendo seu conteúdo também ser reduzido através do processo de filtragem. Porém, o mel, pode ser relativamente pobre em minerais totais e específicos. Uma revisão realizada por Solayman *et al.* (2016) reuniram informações científicas de aproximadamente mil amostras de méis de diversos países e constataram uma ampla variação na concentração de minerais (Tabela 1).

Tabela 1. Macroelementos, microelementos e metais pesados presentes no mel (adaptado de Solayman *et al.*, 2016).

Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
Sódio	3,23 - 236,80 mg/kg	Selênio	0,01- 0,01 mg/kg
Potássio	39,66 - 1349,34 mg/kg	Alumínio	1,39 - 11,36 mg/kg
Cálcio	4,85 - 218,00 mg/kg	Silício	8,70 - 40,70 mg/kg
Magnésio	2,18 - 563,72 mg/kg	Boro	4,42 - 6,30 mg/kg
Fósforo	28,80 - 118,50 mg/kg	Molibdênio	0,01 - 0,44 mg/kg
Enxofre	15,39 - 72,20 mg/kg	Estrôncio	0,90 - 2,36 mg/kg
Cloro	181,30 - 427,2 mg/kg	Cádmio	0,17 - 373,00 µg/kg
Ferro	0,41 - 224,00 mg/kg	Chumbo	0,63 - 3232,00 µg/kg
Cobre	0,05 - 17,30 mg/kg	Cobalto	0,01 - 800,00 µg/kg
Zinco	0,23 - 73,60 mg/kg	Mercurio	0,27 - 9,91 µg/kg
Arsênio	ND - 0,10 mg/kg	Crômio	ND - 370,00 µg/kg
Niquel	ND - 9,00 mg/kg	Prata	3,21 - 596,00 µg/kg
Manganês	0,00 - 4,35 mg/kg	Berílio	9,83 - 10,00 µg/kg

Da mesma forma, Batista *et al.* (2012), analisando 57 méis de diferentes regiões do Brasil, constataram uma ampla variação no conteúdo de elementos minerais (Tabela 2).

Cabe ressaltar que elementos minerais, ao contrário de vitaminas e aminoácidos, não estão sujeitos a degradação por exposição ao calor, luz, agentes oxidantes, pH extremo ou outros fatores que afetam nutrientes orgânicos. Em essência, os minerais são indestrutíveis (Damodaran *et al.*, 2010), um fato muito importante, porque esses minerais são cofatores de enzimas essenciais para uma série de reações metabólicas na levedura e no corpo humano (Pohl *et al.*, 2012).

Tabela 2 Elementos minerais em méis brasileiros (adaptado de Batista *et al.*, 2012)

Elemento	Variação (mg/Kg)
Cobre	0,01 - 0,7
Zinco	0,01 - 7,1
Manganês	0,08 - 18,8
Ferro	0,4 - 14,1
Molibdênio	0,001 - 0,01
Fósforo	8 - 486
Cobalto	0,001 - 0,03
Magnésio	12,4 - 360

3.1.2 Compostos aromáticos e fenólicos

O aroma e o sabor do mel são determinados por misturas complexas de compostos voláteis e não voláteis, que podem diferir dependendo do néctar, condições de processamento, origem e armazenamento (Castro-Vazquez *et al.*, 2007).

No mel, foram identificados mais de 300 compostos voláteis, incluindo ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres e terpenos (Castro-Vásquez *et al.*, 2009). A presença destes compostos pode fornecer informações sobre a origem botânica do mel (Escriche *et al.*, 2009). Os principais componentes com atividade biológica do mel são os flavonoides. Eles podem contribuir significativamente para a atividade antioxidante total do mel, trazendo efeitos benéficos para a saúde humana (Alvarez-Suarez *et al.*, 2012).

O comprimento das cadeias de carbono dos ácidos carboxílicos proporciona sabores diferentes que podem variar de picante a ranço (Barra *et al.*, 2010). Os álcoois são uma grande e importante classe de compostos presentes no mel. Os álcoois metilados, tais como 3-metil-3-buten-1-ol e 2-metil-2-buten-1-ol, proporcionam frescor ao mel (Castro-Vazquez *et al.*, 2007). Conforme estudo realizado por Moreira *et al.* (2010), pode haver modificações no perfil dos compostos voláteis durante o armazenamento de mel.

Quanto a compostos fenólicos, o mel contém uma grande diversidade como constituintes secundários, notadamente flavonoides e ácidos fenólicos (Arráez-Román *et al.*, 2006; Baltrusaityte *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008). O teor de flavonoides pode atingir até 6000 mg/kg, consistindo principalmente de flavanonas e flavonas (Anklam, 1998). Estes compostos têm um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila na sua estrutura, que podem variar de um polímero fenólico simples a uma molécula complexa de elevada massa molecular (Pyrzynska e Biesaga, 2009).

3.2 Hidromel

De acordo com a definição de Navrátil *et al.* (2001), o hidromel é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel, podendo sua graduação alcoólica variar de 4 a 22% (v/v) dependendo da maneira como é elaborado e da legislação vigente de cada país (Navrátil *et al.*, 2001; Gupta e Sharma, 2009; Decreto n. 6871, 4 de julho de 2009).

A elaboração de hidromel tradicional se baseia na diluição do mel em água (Iglesias *et al.*, 2014), podendo ser diluído em diferentes proporções, por exemplo, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:3 (mel:água), cada um produzindo diferentes tipos de hidromel quanto ao teor alcoólico e doçura (Ramalhosa *et al.*, 2011).

Para melhorar seu caráter e complexidade, uma variedade de frutas, legumes, ervas ou especiarias podem ser adicionados durante ou após a fermentação (McConnell e Schramm, 1995). Desta forma, a denominação dos diferentes tipos de hidromeis pode variar em decorrência da matéria-prima utilizada em sua elaboração (Quadro 1).

Quadro 1 Classificação de diferentes tipos de hidromel quanto às matérias-primas utilizadas.

Denominação	Matéria-prima
Mead (hidromel tradicional)	Mel e Água
Great Mead	Hidromel envelhecido (em geral em barricas)
Melomel	Hidromel com adição de frutas (exceto uvas e maçã)
Pyment	Hidromel com adição de uva ou suco de uva
Cyser	Hidromel com adição de maçã ou suco de maçã
Metheglin	Hidromel com adição ervas e temperos
Braggot ou Bracket	Hidromel com adição de malte
Hippocras	Pyment temperado
Tej	Hidromel com cascas de arvores, raízes e ervas
Sack	Hidromel doce com alta concentração de mel

Adaptado de Miller, 1994; Berry, 2007.

O hidromel é uma bebida com progressiva importância econômica devido ao aumento da demanda de produtos fermentados (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). É uma bebida alcoólica conhecida em todo mundo com muitos relatos etnológicos publicados (Teramoto *et al.*, 2005), porém, ainda são raras as pesquisas científicas sobre o mesmo (Mendes-Ferreira *et al.* 2010).

Segundo o Relatório Anual da Indústria de Hidromel (EUA), houve um crescimento de produção de 130% nesta indústria entre 2012 e 2013, e um aumento de 84% nas vendas no período de 2012 a 2014 (Herbert, 2015).

Acredita-se que a origem do hidromel seja anterior à do vinho. De acordo com McGovern *et al.* (2004), as primeiras evidências arqueológicas da produção de hidromel datam de cerca de 7000 a.C, em uma aldeia no norte da China.

Existem registros da produção de hidromel na China, Grécia antiga, no Egito e no Império Romano, sendo a tradição do consumo na Europa associado a áreas menos adequadas ao cultivo de uva (Inglaterra, Escandinávia e Europa Oriental).

Atualmente, o hidromel é uma bebida popular no leste europeu (Polônia, Eslovênia) e nos estados bálticos (Lituânia, Letônia e a Estônia), sendo também muito consumida na Inglaterra, Alemanha e nos países africanos, principalmente na Etiópia e na África do Sul (Berry, 2007).

3.2.1 Processo fermentativo de produção de hidromel

A produção de hidromel envolve basicamente quatro etapas: (1) preparação do mosto, (2) fermentação alcoólica, (3) estabilização e (4) engarrafamento. O primeiro passo consiste na preparação do mosto e, dependendo do estilo desejado, o mel é diluído com água, suco, ou acrescentado de chás ou extratos. Após a diluição do mel, o mosto recebe geralmente uma mistura de nutrientes (nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e minerais) para estimular o crescimento da levedura e a fermentação.

Na maioria dos processos, o mosto de mel deve começar com °Brix (sólidos solúveis totais) entre 20 e 23 (Pereira *et al.*, 2013; 2014a, 2104b e 2015; Roldán *et al.*, 2011, Wintersteen *et al.*, 2005), que resultará em teores alcoólicos de 8 a 12% (v/v). Especiarias ou ervas, na forma de extrato ou diretamente, podem ser adicionados antes ou durante o processo (National Honey Board, 2001).

O ajuste da acidez também pode ser realizado para obter um melhor equilíbrio entre doçura e acidez. Em geral, os ácidos utilizados para o ajuste do hidromel são o cítrico (Sroka e Tuszyński, 2007), o málico (Pereira *et al.*, 2013, 2014a, 2104b e 2015) ou o tartárico (Pereira *et al.*, 2009; Roldán *et al.*, 2011).

Após diluição e ajustes, o mosto é geralmente pasteurizado reduzindo ou eliminando microrganismos (bactérias e leveduras) que eventualmente estavam presentes no mel (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2013, 2014a, 2104b e 2015, Wintersteen *et al.*, 2005). Assim

sendo, a fermentação de hidromel requer, quase que obrigatoriamente, a inoculação com leveduras oriundas de fermentações anteriores ou cepas selecionadas.

Em sistemas convencionais, o mosto já pronto é inoculado com estirpes selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, em geral leveduras secas ativas disponíveis no mercado de leveduras para vinhos ou cervejas. Entretanto, como estas cepas foram selecionadas para outras bebidas, e não são disponíveis dados quanto a sua adequação para a fermentação de hidromel, não é rara a ocorrência de fermentações lentas, paradas fermentativas e/ou geração de aromas e sabores desagradáveis (Ramalhosa *et al.*, 2011). As fermentações são conduzidas a temperaturas variando de 22 a 25°C e são monitoradas diariamente para reduzir o risco de parada prematura da fermentação

A duração da fermentação depende do tipo de mel, da proporção mel/água, dos nutrientes adicionados, da levedura empregada, da quantidade do inóculo e das condições de fermentação. Após completar a fermentação alcoólica, o hidromel deve ser clarificado e filtrado antes de ser engarrafado (Mendes-Faia, 2015).

Uma comparação entre o mel e o suco de uva mostra que eles têm composições diferentes em relação ao teor de açúcar (quase três vezes mais elevados em méis) e concentrações de nitrogênio (cerca de 100 vezes maior no suco de uva) (Ramalhosa *et al.*, 2011). No caso de hidromel, grande parte dos problemas de fermentação são considerados como decorrentes de deficiência de nitrogênio, minerais e outros fatores de crescimento (Gupta e Sharma, 2009; Ramalhosa *et al.*, 2011), que, como visto no item anterior, encontram-se em concentrações muito baixas ou desequilibradas na maior parte dos méis.

A correção das deficiências nutricionais pode reduzir o estresse da levedura, melhorando o desempenho de fermentação (Gibson, 2011). A deficiência de nitrogênio foi reportada como a maior causa de fermentações lentas ou parada fermentativa em vinificações (Beltran *et al.*, 2005; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011), já que o nitrogênio é um macroelemento essencial na síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares influenciando assim o crescimento da levedura, a taxa de fermentação e a duração da fermentação (Bely *et al.*, 1994). A concentração de nitrogênio também regula a formação de subprodutos, tais como H₂S, ácidos graxos, álcoois superiores e seus ésteres, entre outros, que afetam as propriedades sensoriais das bebidas alcoólicas (Crépin *et al.*, 2012; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011; Torrea *et al.*, 2011).

3.2.2 Leveduras

A microbiota encontrada no mel é composta, principalmente, por bactérias e leveduras provenientes das abelhas, da matéria-prima (néctar) ou de fontes externas (Lee e Kime, 1984). Por outro lado, estes microrganismos são pouco representativos na produção de hidromeis, já que a maior parte deles é eliminada durante os processos térmicos envolvidos na produção dos mostos.

Assim sendo, as leveduras usadas na produção de hidromel são normalmente as linhagens utilizadas na produção de vinho, cerveja e espumante (Pereira, 2008). Estas cepas são selecionadas para características adequadas à produção dos seus produtos específicos (vinhos ou cervejas), tais como: atividade fermentativa vigorosa, alta tolerância ao etanol, tolerância às variações de temperatura e capacidade de decantação, que não são necessariamente aquelas características ideais para hidromel. Mesmo assim, leveduras comerciais enológicas ou cervejeiras são a norma na produção de hidromeis e podem levar à produção de fermentados com boas características (Ramalhosa *et al.*, 2011). Por outro lado, o hidromel é um produto muito particular e, conseqüentemente, requer leveduras específicas ou selecionadas para maximizar as propriedades organolépticas e os processos fermentativos.

Para maior conhecimento sobre o tema, Pereira (2008) e Pereira *et al.* (2009) usaram isolados de leveduras presentes no mel para estudar sua resistência ao estresse, sendo este um critério para a seleção de leveduras, uma vez que o desempenho da fermentação por leveduras e a resistência ao estresse estão relacionados (Zuzuarregui e del Olmo, 2004).

Sete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram caracterizadas para a elaboração de hidromel quanto à sua resistência ao dióxido de enxofre, etanol (para o qual a tolerância é uma propriedade indispensável devido às altas concentrações atingidas no final da fermentação) e estresse osmótico (devido ao alto potencial osmótico do mosto de hidromel no início da fermentação). Pereira (2008) e Pereira *et al.* (2009) verificaram que não existiam diferenças significativas entre as cepas.

No vinho, a fermentação com culturas mistas tem sido explorada para melhorar o aroma e sabor e para obter diferentes tipos e estilos (Fleet, 2003). Esta prática foi recentemente testada em produção de hidromel por Chen *et al.* (2013), que utilizou com êxito várias inoculações de diferentes estirpes e/ou espécies de leveduras.

Existem diferenças na demanda de nitrogênio de acordo com a estirpe de levedura, a qualidade e quantidade da fonte de nitrogênio ou a concentração de açúcar (Manginot *et al.*, 1998; Martinez-Moreno *et al.*, 2012). Desta forma, estudos são necessários para isolar estirpes

com baixa demanda nitrogenada adequadas para a produção de hidromel, considerando a sua deficiência neste grupo de compostos, e com elevada tolerância osmótica, especialmente para a produção de hidromeis semidoces ou doces (Ramalhosa *et al.*, 2011).

3.2.3 Composição aromática

Assim como em outras bebidas alcoólicas, o aroma geral do hidromel provém dos compostos aromáticos originários da matéria-prima e das biotransformações durante o processo fermentativo, pré-fermentativo e pós-fermentativo.

Tendo em vista os compostos aromáticos do hidromel, Vidrih e Hribar (2007) estudaram a síntese dos álcoois superiores, enquanto Wintersteen *et al.* (2005) investigaram a influência do tratamento térmico do mosto sobre os compostos aromáticos. Os álcoois superiores são predominantemente aromas voláteis e sua síntese depende da fonte de mel, da levedura utilizada, do teor de nitrogênio e da temperatura de fermentação (Vidrih e Hribar, 2007; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010).

Na medida em que estes álcoois superiores podem conferir um aroma desagradável ao hidromel (descrito como pastagem), a sua síntese deve ser limitada. O limite máximo amplamente aceito para o teor total de álcoois superiores é de 300 mg/L, sendo que teores mais elevados são prejudiciais para a qualidade (Rapp e Mandery, 1987). Por outro lado, os álcoois superiores são substratos adequados para a síntese de seus ésteres correspondentes, que são formados durante a maturação do hidromel e acrescentam aromas favoráveis.

Em estudos realizados por Wintersteen *et al.* (2005) e Vidrih e Hribar (2007), concluiu-se que os álcoois superiores e ésteres analisados variaram consideravelmente dependendo da fonte floral do mel e do tratamento térmico aplicado ao mosto de mel. A análise global dos perfis de aromas revelou diferenças quantitativas entre os diferentes hidromeis, confirmando a contribuição do metabolismo de levedura e da composição de mosto para a diversidade de "bouquet" (Mendes-Faia, 2015).

As características sensoriais (aroma e sabor) do hidromel, em analogia ao que ocorre em vinhos e cervejas, são decorrentes de compostos presentes na matéria-prima (mel), mas principalmente de compostos gerados durante o processo fermentativo, seja no metabolismo primário ou como produtos de biotransformação de precursores aromáticos (Lambrecht e Pretorius, 2000; Gonzalez e Morales, 2017). A carência de informações sobre a composição química e as características sensoriais de hidromeis, assim como estudos científicos

relacionados com a sua produção, dificultam o desenvolvimento industrial e a consolidação do mercado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigos, em que cada capítulo corresponde a um artigo.

ARTIGO 1

- Optimization of nitrogen, minerals and vitamins supplementation for mead production: a response surface methodology approach.

ARTIGO 2

- Seleção de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* para a fabricação de hidromeis.

ARTIGO 3

- Caracterização aromática de fermentado com mosto de mel/mosto de Moscato, “Moscato-pyment”: uma opção tecnológica.

4.1 ARTIGO 1

OPTIMIZATION OF NITROGEN, MINERALS AND VITAMINS SUPPLEMENTATION FOR MEAD PRODUCTION: A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY APPROACH

Artigo submetido ao periódico **LWT- Food Science and Technology**

Luisa Vivian Schwarz^a; Angela Rossi Marcon^b; Ana Paula Longaray Delamare^a; Sergio Echeverrigaray^{a,*}

ABSTRACT

Mead is an alcoholic beverage traditionally produced by the fermentation of a mixture of honey and water. Mead fermentation faces several problems that include sluggish and stuck fermentations, mainly caused by nutrient disequilibrium. In this context, the present study aimed at optimizing the mead fermentation process based on three nutritional factors: nitrogen, minerals, and vitamins evaluating their effect on several fermentation parameters. The experiments included a response surface methodology (RSM) experiment, and the evaluation of specific minerals on mead parameters: fermentation rate, biomass, final reducing sugars, ethanol, glycerol/ethanol ratio, volatile acidity, total acidity, and residual nitrogen. The results showed that the models established by the RSM were adequate for predicting mead fermentation and physicochemical parameters. Mead fermentation rate, ethanol, glycerol/ethanol ratio, total acidity, and residual nitrogen were significantly influenced by nitrogen and minerals supplementation, while fermentation rate and volatile acidity were influenced by nitrogen and vitamins supplementation. An “all minus one” experiment showed that potassium addition is essential for healthy mead fermentation. Considering all the variables analyzed, the optimal conditions for mead fermentation include nitrogen supplementation to achieve 150 mg/L YAN, the addition of minerals in order to obtain at least 600 mg/L potassium, and supplementation with a vitamin complex.

Keywords: mead; RSM; nutrient supplementation; fermentation parameters

INTRODUCTION

Mead or “honey wine” is a traditional alcoholic beverage with 8 to 18% (v/v) ethanol, obtained by the alcoholic fermentation of a diluted solution of honey mediated by yeasts. Considered as one of the world’s oldest alcoholic beverages, mead was produced in ancient times throughout Europe, Africa and Asia, but was progressively substituted by wine and beer (Toussaint-Samat, 2009; Ramalhosa, Gomes, Pereira, Dias, e Estevinho, 2011). The production and economic relevance of mead experienced a constant increase in the last decades due to the demand for “new” fermented products (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010), and as an alternative for honey producers that intend to obtain honey derivatives with high aggregate value (Ramalhosa *et al.*, 2011).

Honey is a natural sweet food produced by bees from the nectar of flowering plant, and its composition varies depending on the bee species, floral origin, climate, season, region, among other factors (Ramalhosa *et al.*, 2011; Machado De-Melo, Almeida-Muradian, Sancho, e Pascual-Maté, 2018). In general, natural honey contains a high concentration of carbohydrates (80-85%), mainly glucose and fructose, and low concentrations of minerals, amino acids, proteins, vitamins, phenolic compounds, and volatile substances (Machado De-Melo *et al.*, 2018). Despite the quality and composition of honey, the fermentation of honey musts for the production of mead is a difficult and time-consuming process. The main problems on mead production are the lack of uniformity of the final products, sluggish and stuck fermentations, and the production of off-flavors (Pereira, Dias, Andrade, Ramalhosa, e Estevinho, 2009). These problems have been associated to several factors including: the variability of honey composition (Vidrih e Hribar, 2007), the lack or limitation of essential nutrients for yeast development (Pereira, Mendes-Ferreira, Oliveira, Estevinho, e Mendes-Faia, 2015a), the low pH and buffer activity of honey (Sroka e Tuszynski, 2007), and the use of inappropriate yeast strains (Pereira *et al.*, 2009).

Among these factors, deficiency of nitrogen, minerals and other growth factors has been pointed out as the most serious problem on mead production (Gupta e Sharma, 2009). Nitrogen influences yeast growth, and fermentation kinetics (Bely, Salmon, e Barre, 1994), and its deficiency lead to slow or stuck fermentations in winemaking (Beltran, Esteve-Zarzoso, Rozès, Mas, e Guillamón, 2005; Mendes-Ferreira, Barbosa, Lage, e Mendes-Faia, 2011) and mead (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). Moreover, nitrogen concentration can also regulate the production of aroma compounds like higher alcohols and their esters (Lambrechts e Pretorius, 2000), and affect yeast viability and autophagy/autolysis (Reggiori e Klionsky, 2013), with

influence on the sensory properties of alcoholic beverages. Besides that, nutritional deficiencies in minerals and vitamins may also affect the metabolism and the stress sensitivity of yeast, modifying the fermentation performance and sensory properties of the final product (Gibson, 2011).

The application of statistical experimental design techniques in fermentation process development can result in improvement of product yield, uniformity, efficiency and quality. The classical “one factor at a time” approach is time consuming, requires a number of experiments, and neglects the interaction between factor. These limitations can be minimized by analyzing at the same time several parameters that affect a process using a response surface methodology (RSM). RSM has been successfully used to optimize media and cultural conditions in several fermentation processes to produce primary and secondary metabolites (Parra, Aldred, e Magan, 2005; Naveena, Altaf, Bhadriah, e Reddy, 2005; Zhuang, Chen, Chu, e Zhang, 2006), and alcoholic beverages (Cui, Wang, Zhang, e Speers, 2014; Puerari *et al.*, 2015). Gomes *et al.* (2013) used RSM to stud the effects of temperature and nutrients concentration on mead fermentation and quality, while Srimeena, Gunasekaran, e Murugesan (2014) used this approach to optimize temperature, fermentation time and total soluble solids for the production of low-ethanol mead.

In this context, the objective of the present study was to evaluate the effect of nutritional supplementation (nitrogen, minerals, and vitamins) on honey-must on several fermentation and physicochemical parameters of mead, using a RSM approach.

MATERIALS AND METHODS

Honey-must preparation

The experiments were conducted with a multifloral commercial light honey collected at the end of summer 2017 in the highlands of Rio Grande do Sul State, Brazil. Honey was characterized based on Brazilian legislation (Normative instruction n°11/2000,20 october) using the Brazilian official analytical methods (Brasil, 1981) and showed: total acidity (23.94 meq/kg), ash content (0.15g/100g), solids (0.036g/100g), moister content (17.9%), total sugar (79.8 g/100g), and assimilable nitrogen (48.2 mg/kg).

Honey-must was prepared by mixing honey with distilled water to a final total soluble concentration of 20° Brix, followed by the addition of nutrients (nitrogen, minerals, and vitamins) according with the experimental designs. The must was heated at 70°C for 10 min, cooled to room temperature, and the pH adjusted to 3.6 with tartaric acid.

The treatments were supplemented with different combinations of nitrogen, minerals and vitamins. Nitrogen was added as diammonium phosphate (DAP). The concentrated mineral (250 g/L-MgSO₄·7H₂O, 210 g/L-FeSO₄, 150 g/L-NaCl, 150 g/L-CaCl₂, 750 g/L-K₂HPO₄, 1 g/L- CuCl₂, 15 g/L- ZnSO₄, 2 g/L- KI, 1 g/L-H₃BO₃, 0.4 g/L- (NH₄)₆Mo₇O₂₄, and 0,8 mg/L- CoCl₂) and vitamin (2 g/L- inositol, 0,2 g/L- nicotinic acid, 0,15 g/L- calcium pantothenate, 0,025 g/L - thiamine, 0,025 g/L - pyridoxine, 0,005 g/L - biotin) solutions were based on those described by Salmon and Barre (1998).

Fermentation conditions

All experiments were conducted with *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23[®] (Lallemand, Montreal, Canada). Starter culture was prepared by growing the yeast in YEPD (yeast extract 1%, Peptone 1%, glucose 2%) for 24 h at 28°C under constant orbital shaking, 150 rpm). Yeast were collected by centrifugation, washed with sterile saline solution (0.9% NaCl, wt/vol), and adjusted to 10⁸ cells/ml. Washed yeast suspension was added to honey must in order to obtain an initial population of 10⁶ cells/ml. Experiments were conducted in 250 ml Duran flasks with 200ml of honey must, closed with a Muller valves. The fermentations developed in the dark at a temperature of 22 ± 2°C and were monitored daily by weight loss (CO₂ evolution).

Experimental designs

Response surface methodology

To investigate the interaction and effect of nitrogen, minerals and vitamin concentration in mead fermentations a response surface methodology was applied using a Box-Behenken design that allows estimating and interpreting the interactions between several independent variables a time during an optimization process. The RSM design involved a 15-run experiment with three factors and three levels. A second-order polynomial model was fitted to correlate relationship between independent variables and responses. For the three factors, the equation is:

$$Y = \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_i \sum_{<j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + e^i$$

(1)

where Y is the response; X_i and X_j are variables (i and j range from 1 to k); β₀ is the model intercept coefficient; β_j, β_{jj} and β_{ij} are interaction coefficients of linear, quadratic and the second-order terms, respectively; k is the number of independent parameters (k = 3 in this

study); and e_i is the error (Maran, Manikandan, Priya, e Gurumoorthi 2015).

The assay consisted of three independent variables with three different ranges of supplementation: Nitrogen (0, 357.4, and 724.3 mg/L of diammonium phosphate, that correspond to 15, 75, and 150 mg/L of yeast assimilable nitrogen YAN, respectively), minerals (0 mL/L, 0.25 mL/L and 0.50 mL/L of a concentrated mineral solution), and vitamins (0 mL/L, 10 mL/L and 20 mL/L of a concentrated vitamin solution).

Experimental design (Table 1), data analysis, and quadratic/linear 2 -way model building was conducted using the software Statistica (Statsoft version 13.2). Fermentations were monitored by CO₂ release, and after 30 days of alcoholic fermentation, samples were collected for analysis.

Table 1. Box-Behnken design with un-coded and coded values.

Runs	DAP supplementation (as YAN mg/L) */ Levels	Mineral supplementation (mL/L) / Levels	Vitamin supplementation (mL/L) / Levels
1	0 (-1)	0 (-1)	10 (0)
2	150 (1)	0 (-1)	10 (0)
3	0 (-1)	0,5 (1)	10 (0)
4	150 (1)	0,5 (1)	10 (0)
5	0 (-1)	0,25 (0)	0 (-1)
6	150 (1)	0,25 (0)	0 (-1)
7	0 (-1)	0,25 (0)	20 (1)
8	150 (1)	0,25 (0)	20 (1)
9	75 (0)	0 (-1)	0 (-1)
10	75 (0)	0,5 (1)	0 (-1)
11	75 (0)	0 (-1)	20 (1)
12	75 (0)	0,5 (1)	20 (1)
13	75 (0)	0,25 (0)	10 (0)
14	75 (0)	0,25 (0)	10 (0)
15	75 (0)	0,25 (0)	10 (0)

* Initial (control) not supplemented honey must had 15 mg/L YAN.

Evaluation of mineral deficiency in honey-musts

To evaluate the individual effect of macronutrients (Mg^{++} , Fe^{++} , Na^+ , Ca^{++} and K^+) on mead fermentation a basic honey must with 20°Brix, 150 mg/L YAN supplementation, 0.5 mL/L of a solution of micronutrients, 10 mL/L of vitamin solution and pH 3.6, was supplemented with the macronutrients using a “all minus one” system. All the treatments were conducted in triplicate. As in the RSM the fermentations were monitored daily by CO_2 release, and the samples were collected at the end of the experiment (30 days) for to determine ethanol and biomass concentrations.

Analytical methods

To evaluate the effect of nitrogen, minerals and vitamins on mead fermentation, we analyzed several parameters of the fermentation products obtained after 30 days of fermentation: soluble solids, density, pH, total reducing sugars, color intensity, reducing sugars, ethanol, volatile acidity, total acidity, glycerol, yeast assimilable nitrogen (YAN), yeast biomass, and fermentation rate.

Density and soluble solids (°Brix) of meads was directly measured with a densimeter (Densito®). pH was determined by the potentiometric method using a pHmeter (Digimed®) at a temperature of 20°C. Total residual sugar (g/L) and reducing sugar (g/L) were evaluated by a colorimetric method using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) according to Santos *et al.* (2017). Color intensity was determined as the absorbance at 420nm using a spectrophotometer (Model 2800, Hitachi, Japan). Ethanol (% v/v) was measured by densitometry after steam distillation of mead samples following the OIV method (<http://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf>). Total acidity and volatile acidity (meq/L) were determined by titration with 0.1 N sodium hydroxide solution using phenolphthalein as indicator, and by steam distillation followed by titration, respectively (Antonelli, Castellari, Zambonelli, e Carnacini, 1999).

Glycerol (g/L) concentration was quantified by enzymatic assay using the Megazyme® Glycerol kit following Megazyme instructions. Yeast assimilable nitrogen, YAN (mg/L) was determined by the formol titration technique described by Gump, Zoecklein, Fugelsang, e Whiton (2002). Yeast biomass (g dry weight/L) was determined by the gravimetric method after centrifugation and drying at 50°C. Fermentation rate was calculated by the linear regression of the linear section of the CO_2 weight loss according to Ciani e Maccarelli, (1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Previous experiments showed that nitrogen, minerals and vitamins supplementation positively affect mead fermentation (data not shown). The experimental results showed that fermentation

rate, ethanol concentration, and yeast biomass concentration were related with nitrogen availability exhibiting a linear relation between 15 and 135 mg/L YAN. Above this concentration, non-significant differences were detected. Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, e Lonvaud (2006) established that 150 mg/L YAN is a minimal nitrogen concentration for a proper white wine fermentation. Moreover, the treatments without minerals supplementation were not able to complete fermentation at the end of the experiment (30 days), exhibiting the lowest fermentation rate, final ethanol concentration, and yeast biomass production. Vitamins supplementation showed limited influence on the fermentation parameters, but effect on mead quality. Previous reports showed that nitrogen deficiency indirectly affects the fermentation rate through cellular activity and biomass yield, being nitrogen the most important growth-limiting factor on wine (Varela, Pizarro, e Agosin, 2004), and mead fermentations (Pereira *et al.*, 2015a). Moreover, minerals can affect cell homeostasis, intracellular pH, enzymatic activities, and may be responsible for unexpected slow and eventually stuck fermentations (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2015a).

Considering the individual effect of nitrogen, minerals, and vitamins addition on mead fermentation, we designed a response surface experiment based on the Box-Behnken design. This experimental design allowed evaluating the effect of different concentrations of nitrogen, minerals and vitamins, as well as their interaction on several basic parameters of the mead fermentation generating second-order polynomial models for each dependent variable (Table 2): fermentation rate, yeast biomass, residual sugars, ethanol, glycerol/ethanol ratio, volatile acidity, total acidity, and residual YAN. Analysis of variance (ANOVA) was conducted to examine the statistical significance of the factors, and the results are shown in Table 3. The ANOVA analysis confirmed significant effects of the independent variables with linear, quadratic and/or second-order interactions for the different dependent variables evaluated.

The regression coefficients ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{13}$) were used to generate response surface 3D plots that illustrate the effects of nitrogen, minerals, and vitamins supplementation on the responses (Figure 1). In general, regression coefficients (R^2) that represent the goodness of fit of the models, showed that the models explained 93.9 to 99.0% of the behaviors (Table 2).

Table 2. Regression coefficients, R² and significant level (P) of the models determined for the analyzed parameters.

Parameter	Fermentation Rate (g CO ₂ / L/ Day)		Biomass (g dw/L)		Total Reducing Sugar (g/L)		Final YAN (mg/L)	
	Coef.	P -value	Coef.	P -value	Coef.	P -value	Coef.	P -value
β_0	0.66	0.000*	1.71	0.000*	14.46	0.204	14.07	0.092
β_1	0.23	0.000*	0.31	0.003*	-67.15	0.000*	26.38	0.001*
β_2	0.20	0.000*	0.45	0.001*	-28.17	0.006*	-19.93	0.005*
β_3	0.08	0.009*	0.00	0.967	-3.41	0.598	-5.28	0.259
$\beta_1^{\wedge} \beta_1$	-0.22	0.000*	-0.43	0.004*	65.00	0.001*	22.28	0.015*
$\beta_2^{\wedge} \beta_2$	-0.16	0.002*	-0.44	0.003*	26.39	0.032	9.38	0.185
$\beta_3^{\wedge} \beta_3$	-0.13	0.004*	0.12	0.219	12.80	0.211	-1.17	0.855
$\beta_1 * \beta_2$	0.24	0.000*	0.41	0.004*	-13.90	0.166	-24.63	0.008*
$\beta_1 * \beta_3$	0.07	0.036*	0.02	0.793	3.85	0.672	-2.34	0.706
$\beta_2 * \beta_3$	0.06	0.065	0.10	0.284	3.36	0.711	10.55	0.132
R ²	0.990		0.972		0.976		0.953	

Parameter	Ethanol (% v/ v)		Glicerol/Ethanol Ratio		Volatile Acidity (meq/L)		Total Acidity (meq/L)	
	Coef.	P -value	Coef.	P -value	Coef.	P -value	Coef.	P -value
β_0	10.10	0.000*	0.25	0.000*	10.00	0.000*	34.00	0.000*
β_1	3.53	0.001*	-0.14	0.001*	2.50	0.000*	7.25	0.000*
β_2	1.40	0.028*	-0.02	0.42	0.13	0.630	2.50	0.028*
β_3	0.08	0.876	0.01	0.555	1.13	0.006*	-0.75	0.399
$\beta_1^{\wedge} \beta_1$	-3.40	0.004*	0.13	0.006*	-2.13	0.002*	-1.00	0.442
$\beta_2^{\wedge} \beta_2$	-0.85	0.261	0.03	0.354	-0.88	0.059	4.50	0.013*
$\beta_3^{\wedge} \beta_3$	0.20	0.777	0.01	0.780	-1.88	0.003*	1.00	0.442
$\beta_1 * \beta_2$	0.40	0.562	0.02	0.415	0.00	1.000	-1.50	0.249
$\beta_1 * \beta_3$	-0.25	0.714	-0.02	0.461	1.00	0.034*	0.00	1.000
$\beta_2 * \beta_3$	-0.05	0.941	-0.01	0.859	0.25	0.501	0.50	0.682
R ²	0.951		0.939		0.975		0.956	

β_0 = intercept coefficient; β_1 = nitrogen (linear); β_2 = mineral supplementation (linear); β_3 = vitamin supplementation (linear); $\beta_1^{\wedge} \beta_1$ = nitrogen² (quadratic); $\beta_2^{\wedge} \beta_2$ = mineral supplementation² (quadratic); $\beta_3^{\wedge} \beta_3$ = vitamin supplementation² (quadratic); $\beta_1 * \beta_2$ = nitrogen X mineral supplementation (interaction); $\beta_1 * \beta_3$ = nitrogen X vitamin supplementation (interaction); $\beta_2 * \beta_3$ = mineral supplementation X vitamin supplementation (interaction).

*Significant (P<0.05)

Table 3. Analyses of variance (ANOVA) for the model and the analyzed parameters.

	Fermentation Rate (g Co2 / L/ Day)			Biomass (g dw/L)		Total Reducing Sugar (g/L)		Final YAN (mg/L)	
	df	F	P -value	F	P -value	F	P -value	F	P -value
Model	9	54.82	0.000*	18.93	0.002*	22.97	0.002*	11.28	0.008*
X_1	1	149.30	0.000*	28.68	0.003*	122.59	0.000*	40.49	0.001*
X_2	1	123.32	0.000*	60.75	0.001*	21.57	0.006*	23.11	0.005*
X_3	1	17.08	0.009*	0.00	0.967	0.32	0.598	1.62	0.259
$X_1^{\wedge} X_1$	1	65.45	0.000*	25.44	0.004*	53.01	0.001*	13.32	0.015*
$X_2^{\wedge} X_2$	1	33.53	0.002*	27.26	0.003*	8.74	0.032*	2.36	0.185
$X_3^{\wedge} X_3$	1	24.45	0.004*	1.97	0.219	2.06	0.211	0.04	0.855
$X_1 * X_2$	1	81.89	0.000*	25.81	0.004*	2.63	0.166	17.64	0.008*
$X_1 * X_3$	1	8.12	0.036*	0.08	0.793	0.20	0.672	0.16	0.706
$X_2 * X_3$	1	5.56	0.065	1.44	0.284	0.15	0.711	3.24	0.132

	Ethanol (% v/ v)			Glycerol/Ethanol Ratio		Volatile Acidity (meq/L)		Total Acidity (meq/L)	
	df	F	P -value	F	P -value	F	P -value	F	P -value
Model	9	10.78	0.009*	8.50	0.015*	21.84	0.002*	11.95	0.007*
X_1	1	59.90	0.001*	51.86	0.001*	105.26	0.000*	79.50	0.000*
X_2	1	9.45	0.028*	0.77	0.420	0.26	0.630	9.45	0.028*
X_3	1	0.03	0.876	0.40	0.555	21.32	0.006*	0.85	0.399
$X_1^{\wedge} X_1$	1	25.72	0.004*	21.57	0.006*	35.10	0.002*	0.70	0.442
$X_2^{\wedge} X_2$	1	1.61	0.261	1.04	0.354	5.95	0.059	14.14	0.013
$X_3^{\wedge} X_3$	1	0.09	0.777	0.09	0.780	27.33	0.003*	0.70	0.442
$X_1 * X_2$	1	0.39	0.562	0.79	0.415	0.00	1.000	1.70	0.249
$X_1 * X_3$	1	0.15	0.714	0.64	0.461	8.42	0.034*	0.00	1.000
$X_2 * X_3$	1	0.01	0.941	0.03	0.859	0.53	0.501	0.19	0.682

X_1 = nitrogen (linear); X_2 = mineral supplementation (linear); X_3 = vitamin supplementation (linear); $X_1^{\wedge} X_1$ = nitrogen² (quadratic); $X_2^{\wedge} X_2$ = mineral supplementation² (quadratic); $X_3^{\wedge} X_3$ = vitamin supplementation² (quadratic); $X_1 * X_2$ = nitrogen X mineral supplementation (interaction); $X_1 * X_3$ = nitrogen X vitamin supplementation (interaction); $X_2 * X_3$ = mineral supplementation X vitamin supplementation (interaction).

*Significant (P<0.05)

Regarding the fermentation rate, the model revealed significant influence of nitrogen and minerals supplementation and to a lesser extent by vitamins concentration with interaction between nitrogen and minerals, and nitrogen and vitamins (Table 2 and 3). The maximum

fermentation rate was obtained with the highest mineral and nitrogen supplementation, 0.6 ml/L and 150 mg/L, respectively (Figure 1A). Treatments without nitrogen supplementation were not able to complete fermentation after 30 days, and resulted in total residual sugar above 160 g/L.

Nitrogen deficiency has been pointed out as the major cause of stuck or slow fermentation of grape and honey musts (Beltran *et al.*, 2005; Ramalhosa *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015a), because nitrogen affects yeast growth, yeast fermentation rate, and fermentation length (Bely *et al.*, 1994). In this sense, the major limiting factor of enological fermentation occurring upon low quantities of nitrogen is the inactivation of sugar transporters associated with protein synthesis arrest and their degradation, even when glucose concentration is still high (Palma, Madeira, Mendes-Ferreira, e Sá-Correia, 2012). However, nitrogen alone did not guarantee the completeness of mead fermentation, indicating that other factors, like mineral deficiencies could account for the reduced yeast activity (Gupta e Sharma, 2009; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). Thus, the adjustment of these nutritional deficiencies may reduce stress sensitivity of the yeast, improving fermentation performance (Gibson, 2011).

As expected, biomass production (g dw/L) was positively correlated with the fermentation rate ($R=0.804$) and was significantly influenced by both nitrogen and minerals supplementation, but not by the addition of vitamins (Table 2 and 3). As can be observed in Figure 1C, the highest yeast biomass (2,02 g dw/L) was achieved with the highest supplementations of both nitrogen and minerals. Nitrogen availability is directly related to exponential yeast cell growth during the early stages of alcoholic fermentation (Varela *et al.*, 2004; Hernández-Orte, Ibarz, Cacho, e Ferreira, 2005; Bell e Henschke, 2005), but the quantitative relationship depends on many factors, including yeast strain demand for nitrogen, nitrogen source, fermentation temperature, and oxygen availability (Cramer, Vlassides, e Block, 2002).

The final total residual sugar (TRS) were highly negatively correlated with biomass yield ($R=-0.811$), ethanol concentration ($R=-0.980$) and glycerol/ethanol ratio ($R=0.884$), and significantly dependent on the concentration of nitrogen (Table 2 and 3). Final TRS concentration was less dependent on mineral concentration, even when minerals are required as cofactors for several metabolic pathways influencing the rate of sugar conversion (Pereira, Guimarães, Teixeira, e Domingues, 2010). However, while treatments without nitrogen supplementations were not able to complete fermentation, those with nitrogen addition but without minerals also exhibited high amounts of total residual sugar (>78 g/L).

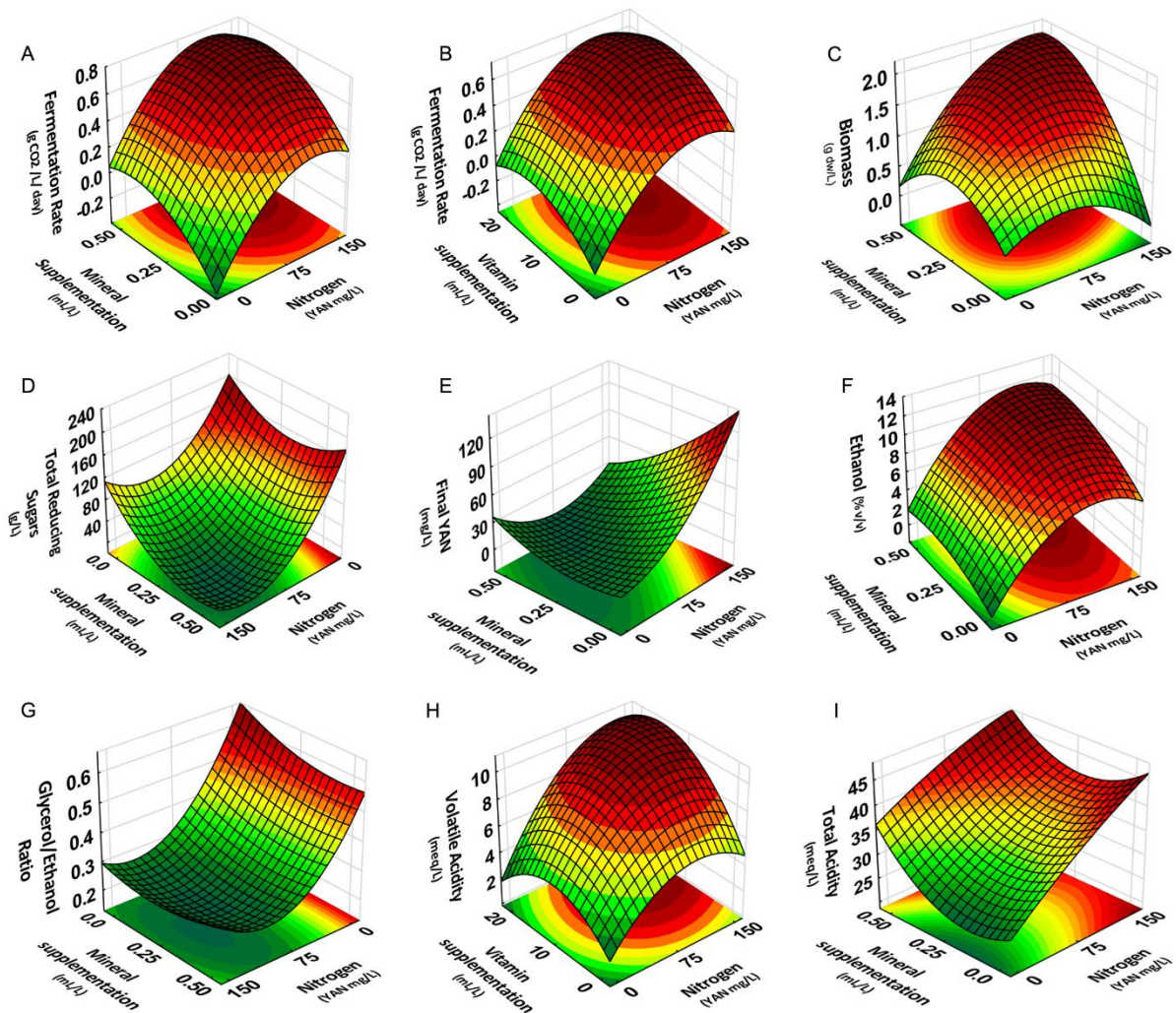


Figure 1. Response surface plots as function of mineral and nitrogen supplementation for (A) fermentation rate (g CO₂ / L/ Day), (C) Biomass (g dw/L), (D) Total reducing sugar (g/L), (E) Final YAN (mg/L), (F) Ethanol (% v/v), (G) Glycerol/Ethanol ratio and (I) Total acidity (mEq/L); Response surface plots as function of vitamin and nitrogen supplementation for (B) Fermentation rate (g Co₂ / L/ Day) and (H) Volatile acidity (mEq/L).

According to Pereira, Oliveira, Mendes-Ferreira, Estevinho, e Mendes-Faia, (2017), even under nitrogen supplementation the available sugars were not completely consumed, and some amount of residual YAN remained in all the meads, suggesting that other factors could account for the reduced yeast activity in honey must fermentation. In this sense, it is interesting to observe that residual YAN was particularly high in the treatments with high nitrogen and low mineral supplementation (Figure 1E), showing a significant interaction between these independent factors (Table 2). These results indicate that the concentration of one or several minerals can affect nitrogen utilization by yeasts during fermentation, corroborating the data obtained by Slininger, Dien, Gorsich, e Liu (2006), which showed that low concentration of

some minerals (iron, manganese, and magnesium) limited yeast biomass production during mead fermentation.

Final ethanol concentration ranged from 2.7 % (v/v) to 11.9 % (v/v). The treatments that exhibited low ethanol concentrations (<5 % v/v) did not finished the fermentation showing the highest residual sugar contents. Ethanol showed significant relation with nitrogen and mineral supplementation but was not influenced by the addition of vitamins (Table 2 and 3). The ethanol 3D plot (Figure 1F) shows that, even without significant interaction between nitrogen and minerals supplementation, higher productions of ethanol can be achieved with median nitrogen addition and high or median minerals supplementation. Culture nutrition is expected to impact ethanol yield by influencing the efficiency of biosynthesis, yeast growth, cell preservation and maintenance, and the redox balance involving NAD/NADH and NADP/NADPH cofactors (Slininger *et al.*, 2006).

Interestingly, the glycerol/ethanol ratio was affected just by the nitrogen supplementation, with non-significant influence of minerals and vitamins (Table 2 and 3, Figure 1G). The highest glycerol/ethanol ratios (>0.5) were evidenced in treatments without nitrogen supplementation that did not finish fermentation, which is expected considering that glycerol is mainly produced at the beginning of alcoholic fermentation (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Belajová, e Suhaj, 2012). Glycerol positively contributes to the sensory quality of wine in terms of fullness, sweetness and smoothness (Remize, Sablayrolles, e Dequin, 2000), and can be an important compound on the sensorial characteristics of a fermentation product.

Another important parameter in fermented beverages is the volatile acidity. Acetic acid is the most important volatile acid produced during alcoholic fermentation (Bartowsky e Pretorius, 2009). In high concentrations (> 1 g/L) acetic acid can negatively affect alcoholic beverages giving in a vinegar-like character (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). The acetic acid concentrations in the RSM experiment varied between 0.24 and 0.63 g/L. These values are within those observed by Šmogrovičová, Nádaský, Tandlich, Wilhelmi, e Cambray (2012) in Slovak and South African meads, and Pereira *et al.* (2017) in mead fermentation experiments developed with Portuguese honey. Although lower than the odor threshold, volatile acidity was significantly influenced by nitrogen and vitamin supplementation (Table 2, Figure 1H). Nitrogen influence on volatile acidity is related to fermentation efficiency, been higher in the treatments that complete fermentation. According to Bell e Henschke (2005), high YAN supplementation leads to increased biomass and increased formation of ethyl acetate, acetic acid and volatile acidity. On the other hand, the influence of vitamins supplementation can be

attributed to low alcoholic dehydrogenase activity and fatty acids biosynthesis under vitamin depletion (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Total acidity ranged between 26 meq/L and 46 meq/L, and was influenced by nitrogen and minerals supplementation with non-significant interaction between these independent parameters (Table 2 and 3). These results were not consistent with previously work, that showed no effect or increase in titratable acidity in wine (Bell e Henschke, 2005), and meads (Pereira, Mendes-Ferreira, Estevinho, e Mendes-Faia, 2015b). However, the differences observed are probably not related to the fermentation process but can be explained by chemical interactions between fixed acids of honey, diammonium phosphate and positively charged mineral ions in the low buffer activity environment of honey-must.

As previous and RSM experiments showed an important effect of minerals supplementation on mead parameters (Table 2 and 3), we developed an “all minus one” experiment in order to evaluate the individual effect of macronutrients (potassium, magnesium, iron, calcium, and sodium), on the fermentation rate, ethanol and yeast biomass on mead production. The results (Table 4) showed that potassium addition significantly increase all the parameters, while the other ions show just very low and non-significant effect on the mead fermentation parameters evaluated. Minor effect of magnesium, calcium, and iron supplementation on mead fermentation was reported by Pereira *et al.* (2015^b). These authors used potassium tartrate to adjust pH and were not able to evaluate its effect on mead fermentations.

Table 4. Effect of single minerals on mead fermentation.

Macronutrient and micronutrients	Fermentation Rate (g CO ₂ / L/ Day)	Ethanol (% v/v)	Biomass (g dw/L)
(-) Mg ⁺⁺	1.37 ± 0.03 ^a	11.19 ± 0.23 ^a	2.15 ± 0.03 ^b
(-) Fe ⁺⁺	1.47 ± 0.1 ^a	10.87 ± 0.06 ^a	2.47 ± 0.11 ^a
(-) Na ⁺	1.39 ± 0.02 ^a	11.29 ± 0.12 ^a	2.26 ± 0.1 ^{ab}
(-) Ca ⁺⁺	1.37 ± 0.03 ^a	11.19 ± 0.31 ^a	2.26 ± 0.04 ^{ab}
(-) K ⁺	0.88 ± 0.1 ^b	9.40 ± 0.44 ^b	1.7 ± 0.05 ^c
Positive control (macronutrient + micronutrients)	1.41 ± 0.03 ^a	11.5 ± 0.29 ^a	2.43 ± 0.16 ^a
Negative control (without micronutrientsupplements)	1.43 ± 0.03 ^a	11.5 ± 0.12 ^a	2.06± 0.06 ^{ab}
Negative control (without macronutrient supplements)	0.62 ± 0.01 ^c	6.87 ± 0.15 ^c	1.17 ± 0.1 ^d

The analysis of the honey used in our experiments showed a potassium concentration of 637.7 mg/kg, which is within the range (100 to 4500 mg/L) reported by da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, e Fett, (2016). Based on this concentration, the honey-must used in our experiments had 129 mg/L of K⁺, and at the highest mineral supplementation reached 465 mg/L. Kudo, Vagnoli, e Bisson, (1998) showed that potassium levels above 300 ppm are critical to support a healthy alcoholic fermentation and prevent stuck and sluggish fermentations. Low potassium concentrations interfere with intracellular and extracellular pH, sugar metabolism (Kudo *et al.*, 1998) and influence ethanol tolerance (Singh, Jedhe, Diwanay, e Shede, 2017).

CONCLUSION

In summary, the results obtained in the present study confirmed the important role of nitrogen, minerals, and in a lesser extent, vitamins supplementation in mead production. Experimental data showed that to optimize honey-must fermentation and mead production, honey-must should be supplemented with nitrogen in order to obtain at least 150 mg/L YAN, associated to a mineral supplementation to attain 465 mg/L potassium (K⁺). Moreover, vitamin addition can significantly affect fermentation rate and volatile acidity, and influence mead fermentation and quality.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the University of Caxias do Sul and the authors thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowship support.

REFERENCES

- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., e Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1139-1144. <https://doi.org/10.1021/jf9807317>.
- Bartowsky E. J., Pretorius I. S. (2009). Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine. In: König H., Uden G., Fröhlich J. (eds) *Biology of*

Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine (pp. 209-231). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Belajová, E., e Suhaj, M. (2012). Compositional profiling of Slovakian wines from distinct production systems by analysis of main saccharides and glycerol. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51, 173-183.
- Bell, S. J., e Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., e Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 996-1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>.
- Bely, M., Salmon, J. M., e Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, 279-282. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00824.x>.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal – Lanara. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos Físicos e Químicos. Brasília, DF. 1981. p. XXV 3 – XXV 10.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 20 de abril de 2005.
- Ciani, M., e Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 199-203. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>.
- Cramer, A. C., Vlassides, S., e Block, D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 49-60. <https://doi.org/10.1002/bit.10133>.
- Cui, Y., Wang, A., Zhang, Z., e Speers, R. A. (2015). Enhancing the levels of 4-vinylguaiacol and 4-vinilfenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 129-136. <https://doi.org/10.1002/jib.189>.

- da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., e Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.
- Gibson, B. R. (2011). 125th Anniversary Review: Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 268-284. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00472.x>.
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2013). Optimization of mead production using response surface methodology. *Food and chemical toxicology*, 59, 680-686. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.034>.
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., e Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 325-329.
- Gupta, J. K., e Sharma, R. (2009). Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *NOPR* 8, 345-355. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5987>.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., e Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89, 163-174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.021>.
- Kudo, M., Vagnoli, P., e Bisson, L. F. (1998). Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 295-301.
- Lambrechts, M. G., e Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 21, 97-129.
- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., e Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Priya, B., e Gurumoorthi, P. (2015). Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 92-104. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0985-z>.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., e Mendes-Faia, A. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 26, 17– 32.

- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., e Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International journal of food microbiology*, 144, 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016>.
- Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadriah, K., e Reddy, G. (2005). Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource technology*, 96, 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.020>.
- Palma, M., Madeira, S. C., Mendes-Ferreira, A., e Sá-Correia, I. (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Microbial cell factories*, 11, 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-99>.
- Parra, R., Aldred, D., e Magan, N. (2005). Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalenolone S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 704-711. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.04.009>.
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2057-2063. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.028>.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L. M., e Mendes-Faia, A. (2015b). Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 405-410. <https://doi.org/10.1002/jib.239>.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., e Mendes-Faia, A. (2015a). Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 122-128. <https://doi.org/10.1002/jib.184>.
- Pereira, A. P., Oliveira, J. M., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L. M., e Mendes-Faia, A. (2017). Mead and Other Fermented Beverages. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 407-434).
- Pereira, F. B., Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., e Domingues, L. (2010). Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*

- using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101, 7856-7863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.082>.
- Puerari, C., Strejc, J., Souza, A. C., Karabín, M., Schwan, R. F., e Brányik, T. (2016). Optimization of alcohol-free beer production by lager and cachaça yeast strains using response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing*, 122, 69-75. <https://doi.org/10.1002/jib.306>.
- Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A. P., Dias, T., e Estevinho, L. M. (2011). Mead production: Tradition versus modernity. In *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. 101-118). Academic Press.
- Reggiori, F., e Klionsky, D. J. (2013). Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194, 341-361. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>.
- Remize, F., Sablayrolles, J. M., e Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 371-378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00964.x>.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., e Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (2th ed.). John Wiley e Sons
- Salmon, J. M., e Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and environmental microbiology*, 64, 3831-3837.
- Santos, A. A. D., Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., e Alves Junior, S. L. (2017). Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.11315>.
- Singh, N., Jedhe, A., Diwanay, S., e Shede, P. (2017) Potassium and Calcium ion concentration influence the ethanol tolerance of yeast isolates. *Scholarly Research Journal for Interdisciplinary Studies*, 4, 8919-8932.
- Slininger, P. J., Dien, B. S., Gorsich, S. W., e Liu, Z. L. (2006). Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 1285-1296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0435-1>.

- Šmogrovičová, D., Nádaský, P., Tandlich, R., Wilhelmi, B. S., e Cambray, G. (2012). Analytical and Aroma Profiles of Slovak and South African Meads. *Czech Journal of Food Science*, 30, 241-246.
- Srimeena, N., Gunasekaran, S., e Murugesan, R. (2014). Optimization of fermentation conditions for producing Indian rock bee (*Apis dorsata*) mead using response surface methodology. *Journal of Applied and Natural Science*, 6, 366-370. <https://doi.org/10.31018/jans.v6i2.429>.
- Sroka, P., e Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104, 1250-1257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.046>.
- Toussaint-Samat, M. (2009). *A history of food*. (2th ed.). Cambridge: Blackwell, (Part I)
- Varela, C., Pizarro, F., e Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and environmental microbiology*, 70, 3392-3400. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004>.
- Vidrih, R., e Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta alimentaria*, 36, 151-162. <https://doi.org/10.1556/AAlim.36.2007.2.2>.
- Zhuang, Y. P., Chen, B., Chu, J., e Zhang, S. (2006). Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41, 405-409. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.004>.

4.2 ARTIGO 2

SELEÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* COM BAIXA DEMANDA DE NITROGÊNIO PARA A FABRICAÇÃO DE HIDROMEIS

Luisa Vivian Schwarz^a; Angela Rossi Marcon^b; Ana Paula Longaray Delamare^a; Sergio Echeverrigaray^{a,*}

RESUMO

O hidromel é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel, que nos últimos anos tem experimentado economicamente um aumento em sua demanda. Porém, devido à peculiar e variada composição do mosto de mel a produção do hidromel enfrenta vários problemas, tais como parada fermentativa, falta de uniformidade do produto final e a produção de aromas desagradáveis. Neste contexto, a levedura empregada no processo pode ser um fator essencial para a qualidade do produto final. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de leveduras enológicas na composição físico-química e aromática na fermentação de hidromel. Cinco leveduras enológicas foram selecionadas através de uma avaliação da demanda bioquímica de nitrogênio e utilizadas em fermentações de hidromeis. As leveduras apresentaram um comportamento na cinética fermentativa similar, porém a levedura ROUGE destacou-se das demais por exibir altas taxas fermentativas (0,51 gCO₂/ 100mL/dia), maior produção de biomassa celular (1,42 g/L), maior produção de etanol (11,23 % v/v) e a menor quantidade de açúcares residuais totais (14,35 g/L) em comparação com as outras leveduras avaliadas. Quanto à composição aromática, os hidromeis elaborados com a levedura SPARK resultaram nos maiores valores da soma de álcoois superiores (189,52 mg/L), ácidos graxos (62,44 mg/L) e ésteres etílicos (38,97 mg/L) e a levedura AWRI-R2 atribuiu aos hidromeis as maiores somas de acetatos (13,22 mg/L) e terpenos (10,09 mg/L), podendo essas espécies contribuir para o aroma e a produção de hidromeis com características peculiares.

INTRODUÇÃO

O hidromel é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel, podendo variar sua concentração de etanol de 8-18% (v/v) (Navrátil *et al.*, 2001). O hidromel e seus derivados fermentados com a adição de chás, frutas e sucos são produzidos desde a antiguidade em diversas regiões do mundo e possui uma particular relevância em países nórdicos e do leste europeu. Apesar da longa história do hidromel, poucos relatos científicos sobre a sua produção estão disponíveis (Teramoto *et al.*, 2005). Atualmente, o desenvolvimento de produtos derivados do mel, como o hidromel, especialmente com o uso de mel excedente e eventualmente inadequado para comercialização “in natura”, é importante para fornecer bebidas alcoólicas inovadoras aos consumidores e aumentar os lucros e opções de comercialização dos apicultores (Küçük *et al.*, 2007).

A fermentação dos mostos de mel para a produção de hidromel enfrenta vários problemas, tais como a falta de uniformidade do produto final, fermentação lenta, podendo demorar meses para ser concluída (Navrátil *et al.*, 2001) ou sofrer paradas fermentativas. Estes problemas têm sido associados a vários fatores, incluindo a grande variabilidade da composição do mel (Vidrih e Hribar, 2007), a falta ou limitação de nutrientes essenciais para o desenvolvimento da levedura (Pereira *et al.*, 2015), o baixo pH e a capacidade tampão do mel (Sroka e Tuszyński, 2007), o uso de cepas de leveduras inapropriadas (Pereira *et al.*, 2009), entre outros.

As leveduras desempenham um papel vital na produção de todas as bebidas alcoólicas, possuindo um efeito significativo nas características sensoriais de cervejas, vinhos, cidras, assim como hidromeis. O metabolismo de leveduras é responsável pela formação de centenas de compostos, que atribuem a estas bebidas fermentadas seu aroma e sabor característico (Lambrecht e Pretorius, 2000). A produção e a concentração destes metabólitos, desejáveis ou não, formados durante a fermentação dependerão da contribuição de determinada espécie ou estirpe de levedura (Varela, 2016), sendo importante conhecer as diferenças potenciais no metabolismo destes compostos entre as várias cepas de leveduras para selecionar as melhores linhagens para o produto desejado (Pretorius, 2000; Girard *et al.*, 2001).

As leveduras usadas na produção de hidromel são normalmente linhagens utilizadas na produção de vinho, cerveja e espumante (Pereira, 2008). Estas leveduras são selecionadas para um conjunto de características típicas de cada produto, como atividade fermentativa vigorosa, alta tolerância ao etanol, tolerância às variações de temperatura, capacidade de competição, produção de aromas e capacidade de decantação, entre outros (Pretorius, 2000). Porém, a

utilização de leveduras comerciais que não se adaptem às condições do mosto de mel pode resultar em problemas, resultando em fermentações lentas e incompletas, e mudanças negativas nas características sensoriais do produto final (Pereira *et al.*, 2009). Considerando as características e demandas particulares na produção de hidromel, a utilização de leveduras apropriadas para a fermentação é essencial na obtenção de fermentações adequadas, como menor requerimento de insumos e que resultem em hidromeis de alta qualidade (Ramalhosa *et al.*, 2011).

Uma característica dos mostos para produção de hidromel é a baixa concentração de nitrogênio disponível. Análise de um amplo conjunto de méis mostra concentrações de 0 a 0,13% (m/m) de nitrogênio total, a maior parte do qual se encontra na forma de aminoácidos (Ball, 2007). Considerando uma diluição de 1:3 (mel:água), o mosto resultante deve conter entre 0 e 32,5 mg/L de nitrogênio, quatro vezes inferior à concentração considerada ideal em fermentações vínicas (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Neste contexto, considerando a baixa quantidade de nitrogênio assimilável pelas leveduras em mostos de mel, o objetivo deste trabalho foi avaliar e selecionar leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* enológicas com baixa demanda de nitrogênio, determinar o seu comportamento fermentativo e a composição do produto final.

MATERIAL E MÉTODOS

Mosto e condições fermentativas

O experimento foi realizado com um mel comercial multifloral coletado no final do verão de 2017 na região serrana do Rio Grande do Sul, Brasil. O mel foi caracterizado de acordo com as exigências da legislação brasileira (Instrução Normativa n ° 11/2000, de 20 de outubro), utilizando os métodos analíticos oficiais para mel (Brasil, 1981) e apresentou: acidez (23.94 meq/kg), cinzas (0.15g/100g), sólidos (0.036g/100g), umidade (17.9%), açúcar total (79.8 g/100g), e nitrogênio assimilável (48.2 mg/kg).

O mosto de mel foi preparado através da diluição do mel com água destilada até a concentração final de 20°Brix de sólidos solúveis, aquecido a 70°C por 10 minutos, esfriado à temperatura ambiente, suplementado com nitrogênio amoniacal através da adição de difosfato de amônio (DAP), de acordo com os ensaios, e uma solução de minerais (250 mg/L-MgSO₄.7H₂O, 210 mg/L-FeSO₄, 150 mg/L-NaCl, 150 mg/L-CaCl₂, 750 mg/L-K₂HPO₄, 1 mg/L-CuCl₂, 15 mg/L-ZnSO₄, 2 mg/L-KI, 1 mg/L-H₃BO₃, 0,4 mg/L- (NH₄)₆Mo₇O₂₄ e 0,8 µg/L-CoCl₂), vitaminas (20 mg/L-inositol, 2 mg/L-ácido nicotínico, 1,5 mg/L-pantotenato de

cálcio, 0,25 mg/L - tiamina, 0,25 mg/L - piridoxina, 0,05 mg/L - biotina) baseadas naquelas descritas por Salmon e Barre (1998) e o pH foi ajustado para 3,6 com a adição de ácido tartárico.

Para todos os ensaios, as leveduras foram preparadas através do crescimento em placas de petri contendo meio YEPD (1% extrato de levedura, 1% peptona, 2% dextrose e 1,8% agar) por 48h a 28°C, posteriormente isolou-se uma colônia para crescimento em YEPD líquido por 24h a 28°C sob agitação constante (150 rpm). As células foram centrifugadas, lavadas com uma solução esterilizada de salina (0,9% NaCl) e finalmente a suspensão de leveduras foi inoculada ao mosto de mel a fim de obter um inóculo de 10^6 células/mL.

Teste de demanda bioquímica de nitrogênio de leveduras

Foram avaliadas vinte e uma leveduras comerciais enológicas utilizadas tradicionalmente na elaboração de vinhos e espumantes da espécie *S. cerevisiae* quanto à sua demanda bioquímica de nitrogênio, sendo elas: CROSS EVOLUTION, QA23, CY3079 e QD145 (Lallemand), PDM, BP725, AWRI-R2, AWRI 350, AWRI 796, ELEGANCE, UCD 522 (Maurivin), Actiflore F33, Zymaflore F15, Zymaflore VL1, Zymaflore VL2, Zymaflore VL3, Zymaflore X5, Zymaflore SPARK (Laffort), Red Fruit (Enartis), ROUGE (Fermol) e Y-904 (Mauriferm).

As fermentações foram elaboradas em mosto de mel base descrito anteriormente. Cada levedura foi avaliada em três diferentes concentrações de nitrogênio assimilável (YAN) sobre o mosto base contendo 15 mg/L YAN. Os tratamentos resultaram em mostos com concentrações finais de 60, 75 e 90 mg/L, adicionado na forma de difosfato de amônio (DAP), respectivamente 214 mg/L, 286 mg/L e 357 mg/L de DAP. O ensaio foi realizado em tubos de ensaio com 10 ml de mosto de mel à uma temperatura de 22 ± 2 °C. As fermentações foram acompanhadas através do desprendimento de CO₂ e, ao final deste experimento, as leveduras foram classificadas de acordo com seu comportamento fermentativo em relação à quantidade de nitrogênio disponível: baixa, média e alta demanda.

Avaliação fermentativa de leveduras selecionadas

As leveduras que indicaram uma menor demanda de nitrogênio, de acordo com os seus comportamentos fermentativos, foram selecionadas para as fermentações em maior escala. Neste experimento, as leveduras selecionadas foram utilizadas em fermentações de 800 mL de mosto de mel com a adição de 285 mg/L DAP, resultando em uma concentração final de 75 mg/L de YAN. O preparo do mosto de mel e o inóculo das leveduras foi realizado da mesma

forma que no experimento anterior. As fermentações foram realizadas em triplicata em frascos Duran à uma temperatura de 22 ± 2 ° C. Ao final deste ensaio, foram realizadas análises físico-químicas e análises de compostos voláteis.

Análises físico-químicas dos hidromeis

O açúcar residual total (g/L) e o açúcar redutor (g/L) foram avaliados pelo método colorimétrico DNS (3,5-ácido dinitrossalicílico), segundo Miller (1959) com a utilização de microplacas proposta por Santos *et al.* (2017). A concentração de álcool (% v/v) foi determinada por destilação a vapor seguida de densitometria através do método OIV (<http://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf>). A acidez total e acidez volátil (mEq/L) foram determinadas por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, usando fenolftaleína como indicador, e por destilação a vapor seguida de titulação, respectivamente (Antonelli *et al.*, 1999). A intensidade da cor foi determinada pela absorbância a 420 nm, utilizando um espectrofotômetro (Modelo 2800, Hitachi, Japão). A concentração de glicerol (g/L) foi quantificada por ensaio enzimático usando o kit Megazyme® Glycerol seguindo as instruções do fabricante. O nitrogênio assimilável por levedura (mg/L) foi determinado pela técnica de titulação de formol descrita por Gump *et al.* (2002). A biomassa de levedura (g massa seca/L) foi determinada pelo método gravimétrico após centrifugação e secagem a 50°C. A taxa de fermentação foi calculada pela regressão da seção linear da perda de massa de CO₂ por dia, segundo Ciani e Maccarelli (1997).

Análise de compostos voláteis de hidromeis obtidos com as leveduras selecionadas

A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando-se microextração em fase sólida (SPME) com fibra de poliacrilato, de acordo com a metodologia adaptada proposta por Xiao *et al.* (2015). Brevemente, 8ml de amostra, 2g de cloreto de sódio e 80µl de 3-octanol (13,5 mg/L) foram colocados em um frasco de 20 ml com septo de silicone. Em banho termostático a fibra DVB/CAR/PDMS 50/30 foi exposta ao espaço acima do líquido (“headspace”) e a amostra foi agitada magneticamente a 50°C por 45 minutos. Após a extração, a fibra foi colocada no injetor do aparelho GC/MS e a análise cromatográfica foi realizada. Utilizou-se um cromatógrafo a gás (GC) 6890 acoplado a um detector seletivo de massas (MS) 5973 (Agilent Technologies, USA), com coluna HP-INNOWAX (30m x 0,25mm x 0,25 µm). As condições de operação do forno foram 40°C durante 2 minutos, aumentando a uma taxa de

3°C/min até 230°C por 2 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada a 230°C e a fibra foi injetada em permanência de dessorção por 5 minutos em modo “split-less”, com hélio em fluxo constante de 1,2 mL/min. Os parâmetros do MS incluíram ionização por impacto de elétrons com energia de elétrons de 70 eV e faixa de massa de m/z 30-550, utilizando-se o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). A área de cada pico foi determinada pelo software ChemStation (Agilent Technologies). A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os índices de retenção (RI) e os padrões de massa fragmentada com os compostos autênticos, com espectros de massa na Wiley banco de dados (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) e NISTDatabase. A quantificação dos compostos foi realizada através da comparação entre a área do composto e a área do padrão interno (3-octanol).

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA com comparação de médias pelo teste de Tukey e os resultados das análises de compostos voláteis foram submetidas a análise multivariada (CP), utilizando o software SPSS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de demanda bioquímica de nitrogênio

A avaliação do perfil fermentativo das vinte e uma leveduras enológicas em mostos com distintas concentrações de nitrogênio permitiu separar as leveduras através do desprendimento de CO₂, que resultou em três grupos distintos, exemplificados nas Figura 1.A - 1.C. De acordo com seus perfis nas diferentes concentrações de nitrogênio disponível, as leveduras foram classificadas em alta, média e baixa demanda de nitrogênio baseado em Gardner *et al.* (2002). As leveduras com um perfil fermentativo onde não se observaram diferenças de comportamento entre a concentração intermediária (75 mg/L) e baixa (60 mg/L) de nitrogênio assimilável foram classificadas como leveduras com alta demanda bioquímica de nitrogênio (Figura 1.A), sendo elas: VL1, RED FRUIT e QD-145. Já as leveduras com um perfil distinto em todas as concentrações de nitrogênio assimilável foram classificadas como leveduras de média demanda bioquímica de nitrogênio (Figura 1.B), sendo elas: CROSS EVOLUTION, PDM, BP725, F33, AWRI 350, AWRI 796, F15, VL2, UCD 522, X5, ELEGANCE e CY3079. As leveduras com um perfil fermentativo semelhante na alta (90 mg/L) e na média (75 mg/L) concentrações de

nitrogênio foram classificadas como leveduras com baixa demanda, sendo elas: AWRI-R2, QA23, SPARK, Y-904, ROUGE e VL3.

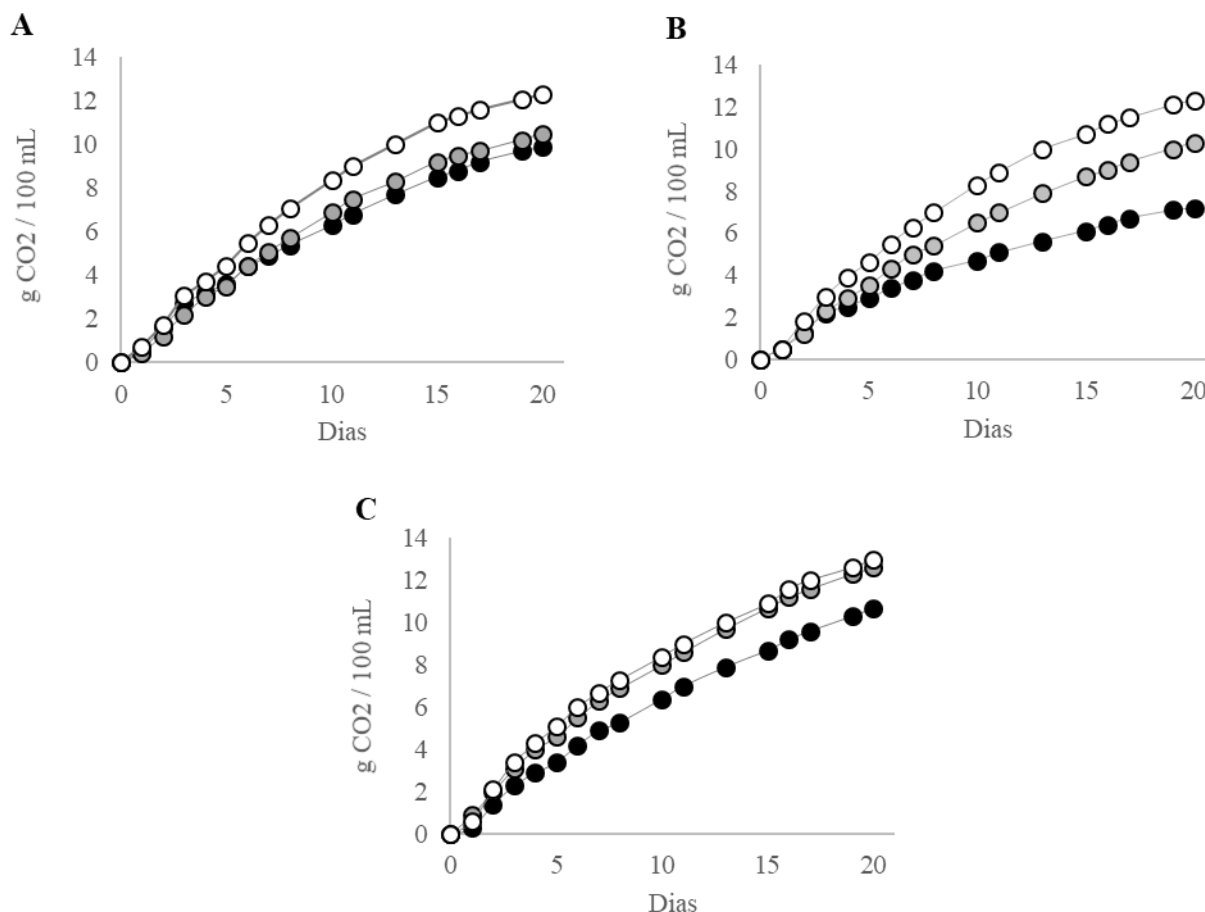


Figura 1. Comportamento fermentativo representativo, determinado pelo desprendimento de CO₂, em dependência do teor inicial de nitrogênio assimilável, onde: (A) alta, (B) média e (C) baixa demanda bioquímica de nitrogênio. (●) 60 mg/L, (◐) 75 mg/L e (○) 90 mg/L de nitrogênio assimilável.

A diferença na demanda de nitrogênio por parte de distintas cepas de *Saccharomyces* é conhecida por enólogos e empresas produtoras de leveduras comerciais. Por outro lado, poucos trabalhos têm sido realizados visando desvendar quais os mecanismos envolvidos nestas diferenças. Manginot *et al.* (1998) e Martinez-Moreno *et al.* (2012) mostraram que a produção de biomassa de leveduras é dependente da disponibilidade de nitrogênio, da natureza do mesmo e da concentração de açúcar. Complementarmente, mostraram que a produção de biomassa não garante o consumo total do açúcar e que alguns aminoácidos, particularmente leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e treonina, aumentam o consumo de açúcares e garantem maior viabilidade das leveduras. Por sua vez, a suplementação de nitrogênio através da adição de fosfato ou sulfato de amônio, comum na produção de vinhos e hidromeis (Ilha *et al.*, 2000;

Morales *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014), pode afetar o consumo de aminoácidos (Beltran *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, a síntese de álcoois superiores e ésteres, entre outros compostos envolvidos nas características sensoriais do produto fermentado (Lambrecht e Pretorius, 2000).

Brice *et al.* (2014) comparando cepas de leveduras com alta e baixa demanda de nitrogênio, através de análise transcriptômica, mostraram que a diferença não está relacionada com o acúmulo de nitrogênio, o conteúdo protéico celular ou a síntese de proteínas e que as diferenças no fluxo glicolítico podem estar associadas à detecção de nitrogênio e sinalização celular em condições de privação e à resposta ao estresse de nitrogênio.

Com base no perfil fermentativo, cinco leveduras com baixa demanda de nitrogênio foram selecionadas para os testes subsequentes. A levedura Y904 foi excluída pois apresentou menor desprendimento total de CO₂, não completando a fermentação na concentração intermediária de nitrogênio.

Avaliação fermentativa de leveduras com baixa demanda de nitrogênio

As leveduras comerciais QA23, AWRI-R2 e SPARK (*S. cerevisiae* var *bayanus*), e ROUGE e VL3 (*S. cerevisiae* var *cerevisiae*) foram selecionadas através do teste prévio considerando sua baixa demanda de nitrogênio e analisadas quanto às suas contribuições aos parâmetros físico-químicos e à produção de compostos voláteis em hidromeis em ensaios fermentativos.

A Figura 2 mostra a curva de cinética fermentativa das leveduras comerciais selecionadas, monitoradas através do desprendimento de CO₂ por dia, em mosto contendo concentração intermediária de nitrogênio assimilável (75 mg/L). Todas as leveduras concluíram as fermentações no 18º dia. A levedura SPARK apresentou a menor taxa fermentativa (0,46 gCO₂/100ml), seguida pela levedura AWRI-R2 com 0,48 gCO₂/100ml/dia. As leveduras ROUGE, QA23 e VL3 não exibiram diferenças significativas nas taxas fermentativas (0,51 gCO₂/100ml/dia).

Quanto à biomassa final produzida, houve diferença significativa entre as leveduras avaliadas (Tabela 1). A levedura ROUGE produziu a maior quantidade de biomassa durante a fermentação (1,42 g/L), seguida pelas leveduras VL3 (1,33 g/L) e AWRI-R2 (1,3 g/L), que não apresentaram diferenças significativas entre si e, SPARK (1,2 g/L) e QA23 (1,07 g/L), com as menores produções de biomassa. Levando em consideração que a adaptação metabólica pode ser observada através da quantidade de biomassa produzida (Martínez-Moreno *et al.*, 2012), a levedura ROUGE mostrou adaptar-se melhor as condições de um mosto de mel com apenas 75

mg/L de nitrogênio assimilável, mas cabe ressaltar que, segundo Martinez-Moreno et al. (2012), a produção de biomassa não garante o consumo total de açúcar.

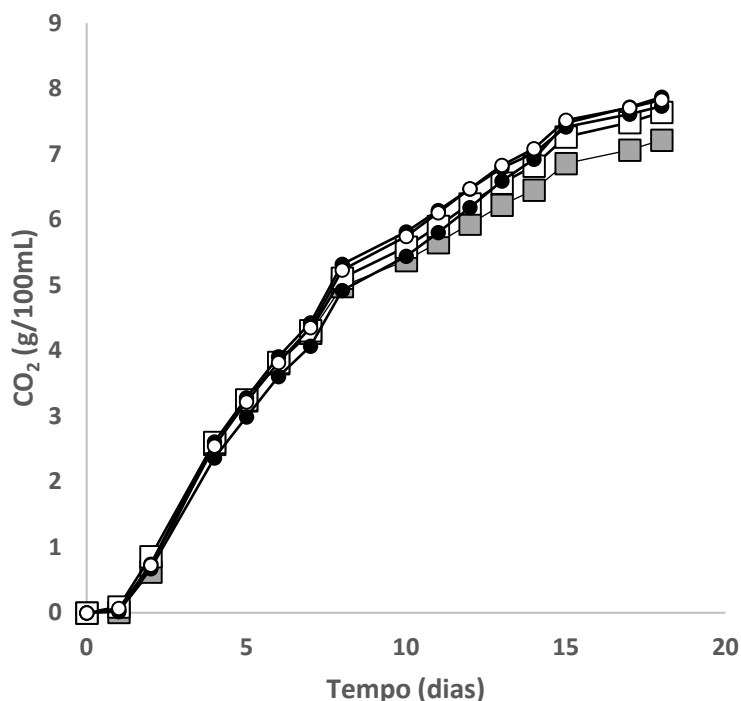


Figura 2. Cinética fermentativa determinada pelo desprendimento de CO₂ (g/100mL) para os hidromeis elaborados com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* var *bayanus* QA23® (■), AWRI-R2® (□) e SPARK® (■), e *Saccharomyces cerevisiae* var *cerevisiae* ROUGE® (○) e VL3® (●).

Quanto à quantidade de açúcares residuais, as leveduras ROUGE, AWRI, QA23 e VL3 não exibiram diferenças significativas. Já a levedura SPARK apresentou as maiores concentrações de açúcares redutores e açúcares residuais totais no final das fermentações, 13,35 g/L e 21,66 g/L respectivamente (Tabela 1). É importante ressaltar que a presença de açúcar residual, sendo açúcares não fermentáveis, não é obrigatoriamente um demérito já que, segundo Gomes et al. (2015), hidromeis com um maior teor de açúcar foram melhor apreciados pelos consumidores.

Apesar das diferenças quanto ao conteúdo de açúcares residuais, não foram constatadas diferenças significativas no conteúdo final de etanol, o qual variou entre 10,33% (v/v) para os hidromeis fermentados com a levedura SPARK e 11,23% (v/v) para aqueles produzidos com a levedura ROUGE (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos (médias e desvios padrão) dos hidromeis.

	QA23	AWRI-R2	ROUGE	SPARK	VL 3
Açúcar residual total (g /L)	16,38 ± 1,69 ^b	14,79 ± 1,49 ^b	14,35 ± 1,38 ^b	21,66 ± 3,12 ^a	16,84 ± 0,44 ^{ab}
Açúcares redutores (g /L)	10,34 ± 0,81 ^b	9,88 ± 0,95 ^b	9,75 ± 0,83 ^b	13,35 ± 1,57 ^a	10,47 ± 0,59 ^b
Glicerol (g /L)	2,72 ± 0,47 ^{ab}	3,24 ± 0,27 ^a	2,86 ± 0,27 ^{ab}	2,24 ± 0,35 ^b	3,05 ± 0,33 ^{ab}
Biomassa celular (g /L)	1,07 ± 0,02 ^d	1,30 ± 0,02 ^b	1,42 ± 0,02 ^a	1,20 ± 0,03 ^c	1,33 ± 0,01 ^b
Acidez volátil (mEq/L)	16,33 ± 4,73 ^a	17,00 ± 1,00 ^a	16,67 ± 0,58 ^a	11,00 ± 1,00 ^a	13,00 ± 3,00 ^a
Acide total (mEq/L)	51,33 ± 2,31 ^a	55,33 ± 3,06 ^a	53,33 ± 3,06 ^a	54,00 ± 5,29 ^a	52,67 ± 3,06 ^a
Nitrogênio assimilável (mg/L)	8,60 ± 1,35 ^a	7,82 ± 1,35 ^a	7,04 ± 2,35 ^a	7,82 ± 1,35 ^a	7,04 ± 2,35 ^a
Etanol (% v/v)	10,97 ± 0,06 ^a	10,80 ± 0,00 ^a	11,23 ± 0,15 ^a	10,33 ± 0,35 ^a	10,43 ± 0,81 ^a
Intensidade de cor	0,34 ± 0,05 ^b	0,19 ± 0,05 ^c	0,17 ± 0,01 ^c	0,52 ± 0,06 ^a	0,31 ± 0,03 ^b
Taxa fermentativa (g/CO ₂ /100mL/dia)	0,51 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^{ab}	0,51 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,00 ^a
Relação Glicerol/etanol	0,25 ± 0,04 ^{ab}	0,3 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,03 ^{ab}	0,22 ± 0,03 ^b	0,29 ± 0,03 ^{ab}

Análise estatística ANOVA (n=3) 95% nível confiança, letras iguais não possuem diferenças significativas.

A quantidade de glicerol final variou significativamente entre os hidromeis (Tabela 1), assim como sua relação com o etanol (glicerol/etanol). A levedura SPARK originou hidromeis com a menor produção de glicerol (2,24 g/L) e menor relação glicerol/etanol (0,22 glicerol/etanol), enquanto a levedura AWRI-R2 levou à maior produção de glicerol (3,24 g/L) e à maior relação entre glicerol e etanol (0,3 glicerol/etanol). Neste sentido, cabe ressaltar que o glicerol é um dos subprodutos mais importantes gerados durante a fermentação alcoólica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Na fermentação do vinho, o principal papel da síntese de glicerol é fornecer à célula um soluto responsivo ao estresse osmótico e equilibrar o balanço redox intracelular (Scanes *et al.*, 1998). Além disso, o glicerol possui uma importante implicação sensorial em vinhos (Hatzakis *et al.*, 2007), contribuindo principalmente para o corpo da bebida, textura, persistência (Nieuwoudt *et al.*, 2002) e, em altas concentrações, para a doçura e suavidade do vinho (Cavalcante da Silva *et al.*, 2018).

A acidez volátil nas fermentações variou entre 11,00 e 17,00 mEq/L de ácido acético (Tabela 1), correspondendo a uma variação de 0,66 a 1,02 g /L de ácido acético. Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), em concentrações altas (> 1 g/L) o ácido acético pode afetar bebidas alcoólicas negativamente, atribuindo um caráter avinagrado.

Quanto à acidez total, os hidromeis variaram entre 51,33 mEq/L e 54,00 mEq/L, em fermentações realizadas com QA23 e SPARK, respectivamente (Tabela 1). Esses valores correspondem a um aumento mínimo de 39,33 mEq/L em comparação com o mosto de mel (12 mEq/L). Já que a acidez fixa em mostos de mel é muito baixa, é importante adicionar-se ácido tartárico, málico ou cítrico, sendo vantajoso utilizar cepas que atribuam ao hidromel média/alta

acidez (Caridi *et al.*, 1999). Cabe ressaltar que não foram observadas diferenças significativas nos valores de acidez total e volátil entre as leveduras comerciais avaliadas.

A intensidade de cor, avaliada pela absorbância em 420 nm (tom amarelo), nos hidromeis variou entre 0,17 e 0,52, em fermentações com ROUGE e SPARK, respectivamente (Tabela 1). A cor é um dos atributos mais importantes em bebidas, já que está diretamente relacionada à aparência do produto, além de ser a primeira avaliação feita pelos consumidores (de Oliveira Mascarenhas *et al.*, 2017). Em comparação com a intensidade de cor do mosto de mel (0,22), as leveduras ROUGE e AWRI-R2 (0,19) ocasionaram uma diminuição da intensidade de cor dos fermentados, resultando em hidromeis que tendem para o amarelo-palha, enquanto os hidromeis produzidos por SPARK, QA23 (0,34) e VL3 (0,31) apresentaram maior intensidade da cor amarela.

Visando avaliar a contribuição aromática das leveduras selecionadas nos hidromeis, foi determinada a concentração de 52 compostos voláteis, incluindo álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos, terpenos e outros compostos voláteis, identificados através de GC/MS nos hidromeis (Tabela 2). A capacidade da levedura em sintetizar esses compostos varia entre diferentes cepas (Lambrechts e Pretorius, 2000). Além disso, para compreender a contribuição de cada levedura na composição aromática destes hidromeis, considerou-se a produção individual dos compostos voláteis identificados, a soma dos ésteres de acetato, ésteres etilados, terpenos e álcoois e os valores da atividade odorífica (OAV).

A fermentação com QA23 exibiu as maiores concentrações de 1-propanol, 2-metil 1-propanol, 2,3 butanodiol, 2-feniletanol, álcool benzílico, 1-heptanol, 1-dodecanol, ácido hexanoico, ácido octanoico, fenilacetato de etila, terpineol, benzaldeído, 1-propanol-3-etoxi, 1-propanol-3-metilol e 2-methoxy-4-vinilfenol. Os hidromeis elaborados com QA23 também exibiram as maiores concentrações na soma total de álcoois graxos, em que 1-dodecanol foi o composto mais representativo nesta soma. Segundo Tao e Li (2009), os álcoois graxos voláteis possuem aroma desagradável em altas quantidades, mas florais em baixas quantidades.

Tabela 2. Concentração dos compostos aromáticos (mg/L) identificados nos hidromeis e limiar de percepção

	QA23	AWRI-R2	ROUGE	SPARK	VL3	Limiar de percepção (mg/L)
Álcoois						
1-propanol	1,97	1,66	0,28	1,01	0,56	500
2-metil-1propanol	2,72	n.d	1,14	1,81	2,04	75
3-metil-1-butanol	53,72	73,58	26,61	90,43	67,66	300
3-metil-1-pentanol	0,06	0,08	0,07	0,10	0,06	1
2,3-butanodiol	23,01	16,23	15,03	7,50	11,28	150
2-feniletanol	96,85	84,56	42,51	88,00	54,24	7,50
álcool benzílico	1,69	0,78	0,52	0,45	0,67	200
2-Etil hexanol	n.d	0,13	n.d	0,22	n.d	8
Soma	180,02	177,01	86,17	189,52	136,51	
Álcoois graxos						
1-Hexanol	n.d	n.d	n.d	0,06	0,03	8
1-heptanol	0,14	0,08	0,07	n.d	n.d	0,30
1-Octanol	n.d	n.d	n.d	0,29	n.d	0,90
1-Nonanol	0,33	0,43	0,25	n.d	n.d	0,60
1-dodecanol	0,67	0,36	0,10	0,36	0,24	1
Soma	1,14	0,88	0,42	0,71	0,27	
Ácidos graxos						
ácido hexanoico	6,53	4,93	3,28	5,82	4,77	0,42
ácido heptanoico	0,13	0,28	0,07	0,29	0,28	3
ácido octanoico	46,31	38,73	18,71	41,79	33,99	0,50
ácido nonanoico	0,25	0,66	0,21	0,67	0,52	3
ácido n-decanoico	0,22	13,16	4,14	11,64	9,93	10
ácido 9-decenoico	n.d	1,87	1,30	1,19	2,44	0,04
ácido dodecanoico	n.d	0,36	0,10	0,35	n.d	1
ácido tetradecanoico	0,25	0,44	0,08	0,70	0,64	10
Soma	53,68	60,42	27,89	62,44	52,55	
Ésteres de acetato						
acetato de isoamila	3,49	5,98	1,65	0,64	0,93	0,26
acetato de hexila	n.d	n.d	n.d	n.d	0,08	0,67
acetato de 2-feniletanol	6,12	7,24	3,32	6,38	5,62	0,25
octanoato de isoamila	n.d	n.d	n.d	0,14	n.d	0,15
Soma	9,61	13,22	4,97	7,16	6,63	

	QA23	AWRI-R2	ROUGE	SPARK	VL3	Limiar de percepção (mg/L)
Esteres etilados						
butirato de etila	n.d	0,09	n.d	0,46	0,60	0,40
hexanoato de etila	0,54	0,67	0,31	1,79	n.d	0,08
heptanoato de etila	n.d	0,05	n.d	0,08	n.d	0,0022
octanoato de etila	3,51	13,21	n.d	14,60	9,40	0,58
nonanoato de etila	0,00	0,42	0,25	0,57	0,20	0,337
decanoato de etila	3,14	8,49	2,42	15,97	3,93	0,40
dodecanoato de etila	0,15	n.d	n.d	0,41	n.d	1,50
fenilacetato de etila	0,69	0,41	0,39	0,33	0,33	0,65
9-decenoato de etila	1,54	7,28	2,53	4,91	3,28	0,10
Soma	9,23	30,42	5,71	38,97	17,57	
Terpenos						
linalol	1,67	1,86	1,85	1,61	0,65	0,05
nerol	0,23	0,25	n.d	0,27	n.d	0,40
hotrienol	2,89	3,43	1,68	3,15	3,05	-
citronelol	0,50	0,54	0,16	0,31	0,40	0,40
nerolidol	1,68	3,68	1,45	2,75	1,72	0,70
terpineol	0,43	n.d	0,23	0,23	0,22	0,40
limoneno	n.d	n.d	n.d	n.d	0,25	0,02
cosmene	0,30	0,33	0,12	0,15	n.d	-
Soma	7,69	10,09	5,49	8,46	6,30	
Aldeídos						
benzaldeído	0,70	0,35	0,25	0,27	0,30	2
Outros compostos voláteis						
acetaldeído	0,84	1,22	0,42	1,70	0,80	0,50
dietil succinato	n.d	0,65	0,54	0,81	1,01	200
acetato de etila	14,71	17,25	8,28	13,00	14,39	160
1-propanol, 3-ethoxy-	2,48	n.d	0,03	0,79	n.d	0,10
monoetil ester	n.d	n.d	0,41	0,28	0,67	-
propilene glicol	1,20	0,63	0,56	n.d	0,43	-
1-propanol, 3-(metiltio)-	2,25	n.d	1,06	0,46	0,60	1,20
Fenois voláteis						
eugenol	n.d	0,20	0,06	n.d	n.d	0,005
2-methoxy-4-vinilfenol	0,63	n.d	n.d	n.d	n.d	0,04

A fermentação realizada com a levedura AWRI-R2 exibiu maiores concentrações de 1-nonanol, ácido n-decanoico, acetato de isoamila, acetato de feniletila, linalol, hotrienol, citrionelol, nerolidol, cosmene, acetato de etila e eugenol. De um modo geral, a levedura AWRI-R2 originou hidromeis com maior produção de acetatos e terpenos.

Existem duas categorias principais de ésteres aromáticos em bebidas fermentadas, a primeira categoria é o grupo dos acetatos (ésteres derivados da reação entre um álcool e um ácido) tais como acetato de etila (aroma de solvente), acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de isobutila (aroma frutado) e acetato de feniletila (rosas, mel) (Saerens *et al.*, 2010). Por sua vez, o conteúdo de terpenos é considerado um fator positivo na qualidade de bebidas, devido à sua contribuição para o aroma, atribuindo nuances florais (Calleja e Falqué, 2005; Falqué *et al.*, 2001).

Os terpenos podem ser originados do mel (Barra *et al.*, 2010) ou liberados pelas α -glicosidasas das leveduras durante o processo de fermentação a partir de terpenos glicosilados presentes no mosto (King e Dickinson, 2003), ou ainda sintetizados pela levedura (Carrau *et al.*, 2005).

A fermentação com a levedura SPARK exibiu as maiores concentrações de 3metil-1-butanol, 3metil-1-pentanol, 2-etil-hexanol, 1-hexanol, 1-octanol (única levedura que exibiu este composto), ácido heptanoico, ácido nonanoico, ácido tetradecanoico, octanoato de isoamila (única levedura que exibiu este composto), hexanoato de etila, heptanoato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, nerol e acetaldeído. Assim, a utilização da levedura SPARK resultou em hidromeis com as maiores quantidades de álcoois superiores, ácidos graxos voláteis e ésteres etílicos.

Já os hidromeis obtidos com a levedura ROUGE não exibiram concentrações particularmente elevadas de nenhum grupo de compostos, resultando em hidromeis equilibrados e relativamente neutros.

Geralmente, as concentrações de álcoois superiores em hidromeis são inferiores a 300mg/L, mas concentrações acima de 400 mg/L podem atribuir impactos negativos no sabor e aroma, resultando em odores e sabores fortes e picantes (Swiegers *et al.*, 2005). Já os ácidos graxos são um grupo de compostos que geralmente atribuem aromas desagradáveis, com descritores de queijo e ranço (Ilc *et al.*, 2016); porém, seus ésteres correspondentes, que incluem hexanoato de etila (aroma de maçã) e dodecanoato de etila (aroma frutado e floral) desempenham um papel fundamental nas notas frutadas de vinhos jovens brancos (Ferreira *et al.*, 1995). Neste sentido, o hidromel fermentado com a levedura VL3 exibiu maiores

concentrações de ácido decenoico, acetato de hexila, butirato de etila, limoneno e dietil succinato, o que pode ser responsável pelo seu perfil sensorial.

O OAV foi calculado e apenas os 23 compostos com um OAV maior do que 1, e que consequentemente contribuem individualmente para o aroma do hidromel (Guth 1997), foram analisados usando a análise multivariada de componentes principais (Figura 3 A). O impacto olfativo de cada composto volátil é dependente de sua concentração e seu limiar de percepção varia consideravelmente para cada composto. Assim, o cálculo do valor da atividade odorífica (OAV) é importante para o estudo de compostos químicos capazes de estimular uma resposta sensorial pelo sistema olfativo humano (Zapata *et al.*, 2012). Para todos os tratamentos o maior valor de OAV foi detectado para ácido octanoico, entre $92,61\times$ e $37,41\times$, nas fermentações realizadas com QA23 e ROUGE, respectivamente.

Os dois primeiros componentes acumularam 71,52% de variância na análise multivariada realizada com base na concentração dos 25 compostos voláteis com OAV acima de 1. Estes componentes permitiram a separação dos hidromeis em três grupos, de acordo com a levedura utilizada: (a) QA23; (b) AWRI-R2 e SPARK; (c) ROUGE e VL3 (Figura 3 A).

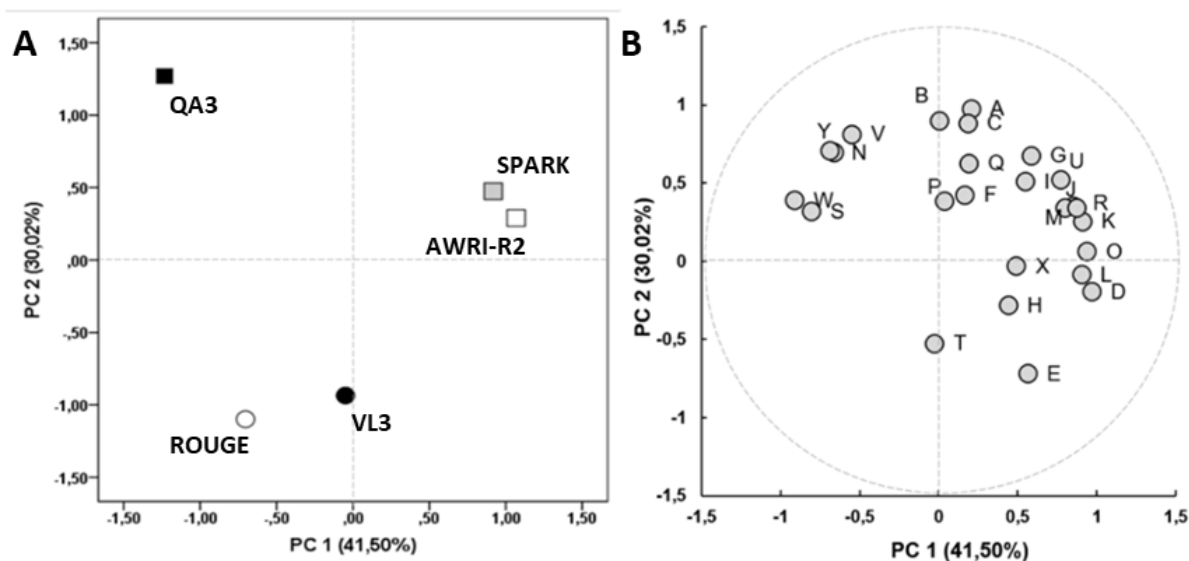


Figura 3. (A) Análise de componentes principais (PC) baseado nos valores de atividade odorífera dos compostos voláteis nos hidromeis fermentados com as leveduras *S. cerevisiae* var *bayanus* QA23, AWRI-R2 e SPARK, e *S. cerevisiae* var *cerevisiae* ROUGE e VL3. (B) Contribuição das variáveis para a análise multivariada de componentes principais: 2-feniletanol (A), ácido hexanoico (B), ácido octanoico (C), ácido n-decanoico (D), ácido 9-decenoico (E), acetato de isoamila (F), acetato de feniletila (G), butirato de etila (H), hexanoato de etila (I), heptanoato de etila (J), octanoato de etila (K), nonanoato de etila (L), decanoato de etila (M), fenilacetato de etila (N), 9-decenoato de etila (O), linalol (P), citrionelol (Q), nerolidol (R), terpineol (S), limoneno (T), acetaldéido (U), 3-etoxi-1-propanol (V), 3-metiltiliol-1-propanol (W), eugenol (X) e 2--metoxi-4-vinilfenol (Y).

O primeiro componente (41,50% da variância) separou os hidromeis produzidos com as leveduras AWRI-R2 e SPARK dos hidromeis obtidos com as leveduras QA23, ROUGE e VL3 (Figura 3). Os compostos que contribuíram para a separação destes hidromeis foram o ácido n-decanoico, heptanoato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, 9-decenoato de etila, nerolidol e acetaldeído, sendo que os hidromeis obtidos com AWRI-R2 e SPARK exibiram as maiores concentrações (Figura 3. B). Em contrapartida, os hidromeis fermentados com as leveduras QA23, ROUGE e VL3 apresentaram menores concentrações para estes compostos e maiores concentrações para terpineol e 1-propanol, 3-(methylthio).

O segundo componente (30,02% da variância) separou os hidromeis obtidos com as leveduras QA23, AWRI-R2 e SPARK (*S. cerevisiae* var *bayanus*) dos hidromeis fermentados com as leveduras ROUGE e VL3 (*S. cerevisiae* var *cerevisiae*). As leveduras da variedade *bayanus* produziram hidromeis com maiores concentrações de 2-feniletanol, ácido hexanoico, ácido octanoico, acetato de feniletila, fenilacetato de etila, 1-propanol, 3-ethoxy e 2-methoxy-4-vinylphenol, enquanto os hidromeis produzidos com as leveduras da variedade *cerevisiae* exibiram maior concentração de ácido decenoico. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Antonelli *et al.* (1999), que, estudando vinhos produzidos com treze leveduras distintas, evidenciaram que, entre outros compostos, as cepas de *S. cerevisiae* var. *bayanus* produzem maior concentração de 2-feniletanol e acetato de 2-feniletila. Por outro lado, Antonelli *et al.* (1999) observaram maior produção de 3-ethoxy-1-propanol e 3-methylthio-1-propanol por parte de cepas de *S. cerevisiae* var *cerevisiae*, enquanto no presente trabalho as maiores concentrações destes compostos foram constatadas em hidromeis produzidos com a leveduras QA23 (*S. cerevisiae* var *bayanus*).

É importante ressaltar que os hidromeis obtidos com as leveduras AWRI-R2 e SPARK resultaram em uma composição aromática diferente dos hidromeis fermentados com as leveduras ROUGE e VL3, enquanto que o tratamento com a levedura QA23 exibiu uma composição aromática que compartilha características intermediárias.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, vinte leveduras enológicas comerciais foram avaliadas quanto à demanda bioquímica de nitrogênio e taxa fermentativa na produção de hidromel. Os resultados obtidos possibilitaram uma prévia seleção de cinco leveduras comerciais QA23, AWRI-R2, SPARK, ROUGE e VL3, que, de uma forma geral, melhor se adaptaram à baixa disponibilidade de nitrogênio do mosto de mel. As cinco leveduras foram avaliadas quanto às suas contribuições

nos parâmetros físico-químicos e na produção de compostos voláteis em hidromeis. Quanto aos parâmetros fermentativos, a levedura comercial ROUGE se destacou por obter altas taxas fermentativas, maior produção de biomassa celular, maior produção de etanol e maior consumo de açúcares em comparação com as outras leveduras testadas. Nas características aromáticas, a categorização em grupos e a soma dos compostos voláteis indicou que as leveduras SPARK e AWRI-R2 são as maiores produtoras de compostos aromáticos, em comparação com as demais leveduras. Quanto aos compostos com OAV>1, através da análise de componentes principais, pôde-se evidenciar uma clara diferença aromática em hidromeis fermentados com as distintas variedades de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho. Desta forma, as leveduras avaliadas possuem potenciais diferenciados para a produção de hidromel, cada uma carregando distintas características ao produto final.

REFERÊNCIAS

- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., e Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem*, 47: 1139-1144.
- Ball, D.W. (2007) The chemical composition of honey. *J. Chem. Edu.* 84: 1643-1646.
- Barra M.P.G., Ponce-Díaz M.C. e Venegas-Gallegos C. (2010) Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. *Chilean J Agric Res*, 70: 75–84.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., e Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J Agric Food Chem*, 53(4):996-1002.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal – Lanara. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos Físicos e Químicos. Brasília, DF. 1981. p. XXV 3 – XXV 10.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 20 de abril de 2005.
- Brice, C., Sanchez, I., Tesnière, C., e Blondina, B. (2014) Assessing the mechanisms responsible for differences between nitrogen requirements of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 1330-1339.
- Calleja, A., e Falqué, E. (2005). Volatile composition of Mencia wines. *Food Chem*, 90: 357-363.

- Caridi, A., Fuda, S., Postorino, S., Russo, M., e Sidari, R. (1999). Selection of *Saccharomyces sensu stricto* for mead production. *Food Technol Biotechnol*, 37: 203-207.
- Carrau, F., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., e Henschke, P.A. (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 107-115.
- Cavalcante da Silva, S. M. P., de Carvalho, C. A. L., Sodré, G. D. S., e Estevinho, L. M. (2018). Production and characterization of mead from the honey of *Melipona scutellaris* stingless bees. *J Inst Brew*, 124:194-200.
- Ciani, M., e Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol*, 14: 199-203.
- de Oliveira Mascarenhas, A. M., Amorim, T. S., Anunciação, A. S., Albinati, F. L., e Martinez, E. A. (2017). Produção de Hidromel: Efeito da Concentração da Polpa de Abacaxi (ANANAS MILL). *Rev Bras Agroecologia*, 7:436-440.
- Falqué, E., Fernández, E., e Dubourdieu, D. (2001). Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta*, 54:271-281.
- Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., e Cacho, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J Sci Food Agric*, 67:381-392.
- Gardner, J. M., Poole, K., e Jiranek, V. (2002). Practical significance of relative assimilable nitrogen requirements of yeast: a preliminary study of fermentation performance and liberation of H₂S. *Aust J Grape Wine R*, 8:175-179.
- Girard, B., Yuksel, D., Cliff, M. A., Delaquis, P., e Reynolds, A. G. (2001). Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Res Int*, 34: 483-499.
- Gomes, T., Dias, T., Cadavez, V., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2015). Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. *Pol J Food Nutr Sci*, 65: 137-142.
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., e Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of pre-fermentation nutritional status of grape juice. *Am J Enol Vitic*, 53: 325-329.
- Guth, H. (1997) Identification of character impact odorants of different white varieties. *J Agric Food Chem*, 45: 3022–3026.

- Hatzakis, E., Archavlis, E., and Dais, P. (2007) Determination of glycerol in wines using P-NMR Spectroscopy, *J Am Oil Chem Soc*, 84: 615–619.
- Ilc, T., Werck-Reichhart, D., e Navrot, N. (2016). Meta-analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Front Plant Sci*, 7:1472.
- Ilha E.C., Sant’Anna E., Torres R.C., Porto A.C., Meinert E.M. (2000) Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production at laboratory scale, *Acta Cient Venez*, 5: 231-235.
- King, A. J., e Dickinson, J. R. (2003). Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res*, 3:53-62.
- Küçük, M., Kolailı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., and Candan, F. (2007) Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*. 100: 526–534.
- Lambrechts, M. G., e Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *S Afr J Enol Vitic*, 21: 97-129.
- Manginot C., Roustan J.L., Sablayrolles J.M. (1998) Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol*, 23: 511-517.
- Martínez-Moreno R., Morales P., Gonzales R., Mas A., Beltran G. (2012) Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source, *FEMS Yeast Res*, 12: 477-485.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem*, 31: 426-428.
- Morales E.M., Alcarde V.E., Angelis D.F. (2013) Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (lalvin k1-1116), *Afr J Biotechnol*, 12: 199-204.
- Navrátil, M., Sturdík, E., e Gemeiner, P. (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnol Lett*, 23: 977-982.
- Nieuwoudt, H., Prior, B., Pretorius, I., and Bauer, F. (2002) Glycerol and wine quality: Fact and fiction, *Wynboer: a technical Guide for Wine Producers* 9: 96–101.
- Pereira, A. P. (2008). Caracterização de mel com vista à produção de hidromel, Doctoral dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária.
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem Toxicol*, 47: 2057-2063.

- Pereira A.P., Mendes-Ferreira A., Oliveira J.M., Estevinho L.M., Mendes-Faia A. (2013) High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production, *Food Microbiol*, 33:114-123.
- Pereira A.P., Mendes-Ferreira A., Oliveira J.M., Estevinho L.M., Mendes-Faia A. (2014) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production, *LWT-Food Sci Technol*, 56:21-30.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675-729.
- Ramalhosa, E.; Gomes, T.; Pereira, A.P.; Dias, T.; Estevinho, L.M. (2011) Mead production: Tradition versus modernity. *Adv Food Nutr Res*, 63:101–118.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., e Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology*, Vol 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1). John Wiley e Sons.
- Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., e Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial biotechnology*, 3:165-177.
- Salmon, J. M., e Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 64:3831-3837.
- Santos, A. A. D., Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., e Alves Junior, S. L. (2017). Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. *Braz J Food Technol*, 20: e2015113.
- Scanes, K. T., Hohmann, S., e Prior, B. A. (1998). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S Afr J Enol Vitic*, 19:17-24.
- Sroka, P., e Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104: 1250-1257.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., e Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R*, 11: 139-173.
- Teramoto, Y., Sato, R., e Ueda, S. (2005). Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine, ogol. *Afr J Biotechnol*, 4: 160-163.
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 9861-9874.

- Vidrih, R., Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta aliment*, 36: 151-162.
- Vidrih R., Hribar J. (2016) Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. In: Kristbergsson K., Oliveira J. (eds) *Traditional Foods. Integrating Food Science and Engineering Knowledge Into the Food Chain*, vol 10. Springer, Boston, pp. 325-338.
- Xiao, Z., Zhou, X., Niu, Y., Yu, D., Zhu, J., e Zhu, G. (2015). Optimization and application of headspace-solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherry wines. *J Chromatogr B*, 978:122-130.
- Zapata, J., Mateo-Vivaracho, L., Lopez, R., e Ferreira, V. (2012). Automated and quantitative headspace in-tube extraction for the accurate determination of highly volatile compounds from wines and beers. *J Chromatogr A*, 1230: 1-7.

4.3 ARTIGO 3

CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA DE FERMENTADO “MOSCATO-PYMENT”: UMA OPÇÃO TECNOLÓGICA

RESUMO

O hidromel, ou vinho de mel, é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel, podendo variar sua concentração de etanol de 4 a 22 % (v/v). Existe uma grande variedade de tipos de hidromeis, dentre eles os “pyments” que consistem em hidromel fermentado com a adição de uvas ou suco de uva. Com base no aumento pela demanda e o grande potencial deste produto, o hidromel e suas variedades podem ser uma alternativa lucrativa, possibilitando a obtenção de um produto com maior valor agregado e com tecnologias relativamente simples. Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar e analisar a composição aromática e físico-química de “pyments”, realizados com distintas diluições de mel e mosto de uva Moscato. Os “pyments” foram elaborados com adição de 10%, 20% e 30% de mosto de uva e comparados com vinho Moscato e com hidromel tradicional (sem adição de mosto de uva). Os resultados mostraram um aumento significativo nas taxas fermentativas dos hidromeis suplementados com mosto de uva Moscato, variando entre 1,08 e 1,11 g CO₂/L/dia, em comparação com o hidromel tradicional (0,56 g CO₂/L/dia), revertendo o baixo vigor fermentativo frequentemente relatado em fermentações de hidromeis. Nos parâmetros físico-químicos, observou-se um aumento gradativo da acidez total e uma diminuição gradativa para açúcar residual e para o teor alcoólico a partir do aumento da adição mosto de uva em mostos de mel. Na caracterização aromática, de uma forma geral, a adição de mosto de uva em hidromeis resultou em um produto com uma composição intermediária entre o hidromel e o vinho Moscato, equilibrando aromas frutados, florais e doces, e consequentemente aumentando a complexidade aromática destes hidromeis, levando a um produto particularmente mais complexo do que o hidromel tradicional e o vinho Moscato.

INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural produzido e consumido em larga escala no mundo inteiro (Pires *et al.* 2013) e tem sido usado desde a antiguidade como um agente adoçante, terapêutico, (González Lorente *et al.*, 2008) e como base na produção de bebidas alcoólicas (Iglesias *et al.*, 2014).

De acordo com a legislação brasileira e internacional, o hidromel é definido como uma bebida alcoólica produzida através da fermentação de uma solução diluída de mel, podendo variar sua concentração de etanol de 4-22% (v/v). O hidromel e suas variantes são produzidos e consumidos em todo mundo com muitos relatos, receitas, e sugestões disponíveis em meios digitais. Por outro lado, são raras as pesquisas científicas sobre o tema (Teramoto *et al.*, 2005). Atualmente, é considerado uma bebida com progressiva importância econômica devido ao aumento da demanda de produtos fermentados e à necessidade de opções para os apicultores (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). Pires *et al.* (2013), ao analisarem os índices mundiais de documentos de patentes relacionadas ao hidromel e tecnologias correlatas, constataram um aumento de patentes no ano de 2011 e, segundo o Relatório Anual da Indústria de Hidromel (EUA), houve um crescimento de produção de 130% nessa indústria entre 2012 e 2013 e um aumento de 84% nas vendas no período de 2012 a 2014 (Herbert, 2015).

Existe uma grande variedade de tipos de hidromeis classificados, entre outros fatores, com base nas matérias primas utilizadas em sua elaboração, como chás aromáticos, sucos, entre outros. O nome “pymment” é utilizado para descrever um tipo de hidromel fermentado junto com uvas tintas ou brancas, ou seus sucos. Espera-se que o produto final possua um caráter distinto do hidromel convencional com a contribuição do mel e da uva nas características sensoriais (Vidrih e Hribar, 2016).

A região da Serra Gaúcha, localizada no nordeste do estado do Rio Grande do Sul, é responsável por 90% da produção de vinhos no Brasil. O cultivo de videiras e a produção de vinho possui considerável impacto econômico e social nesta região (Welke *et al.* 2013). Dentre as variedades cultivadas nesta região, encontra-se as variedades de uvas Moscato, um complexo de cultivares aromáticas com uma habilidade natural para produzir vinhos típicos caracterizados por aromas frescos, florais e frutados, e acidez equilibrada (Rizzon *et al.* 2008).

Desta forma, os “pymments” representam uma opção de novos produtos derivados do mel e uvas, sendo uma boa alternativa para fornecer bebidas alcoólicas inovadoras aos consumidores e aumentar o lucro da indústria apícola e mesmo vitícola (Iglesias *et al.*, 2014). A partir da possibilidade de obtenção de um produto com maior valor agregado e com

tecnologias relativamente simples, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e analisar a composição aromática e físico-química de “pyments” preparados com diferentes diluições de mosto de-mel e mosto de uvas Moscato (base Moscato Branco) produzidos na região serrana do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos mostos

O experimento foi realizado com um mel comercial multifloral coletado no final do verão de 2017 na região serrana do Rio Grande do Sul, Brasil. O mel foi caracterizado de acordo com as exigências da legislação brasileira (Instrução Normativa n ° 11/2000, de 20 de outubro), utilizando os métodos analíticos oficiais para mel (Brasil, 1981) e mostrou: acidez (17,14 meq/kg), cinzas (0,18g/100g), sólidos insolúveis (0,048g/100g), umidade (17,0%), açúcar total (78,13 g/100g), e nitrogênio assimilável (96,61 mg/kg).

O mosto de mel foi preparado através da diluição do mel com água destilada até a concentração final de 20°Brix de sólidos solúveis, aquecido a 70°C por 10 minutos e resfriado a temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 3,6 com a adição de ácido tartárico, suplementado com uma solução de minerais resultando em uma concentração final de 250 mg/L-MgSO₄.7H₂O; 210 mg/L-FeSO₄; 150 mg/L-NaCl; 150 mg/L-CaCl₂; 750 mg/L-K₂HPO₄; 1 mg/L-CuCl₂; 15 mg/L-ZnSO₄; 2 mg/L;-KI; 1 mg/L-H₃BO₃, 0,4 mg/L- (NH₄)₆Mo₇O₂₄; e 0,8 µg/L - CoCl₂, e vitaminas em uma concentração final de 20 mg/L – inositol; 2 mg/L - ácido nicotínico; 1,5 mg/L-pantotenato de cálcio; 0,25 mg/L – tiamina; 0,25 mg/L – piridoxina; e 0,05 mg/L – biotina, baseadas naquelas descritas por Salmon and Barre (1998). A concentração de nitrogênio assimilável (YAN) foi corrigida em cada tratamento através da adição de fosfato de amônio, de forma a obter uma concentração final fixa de 140 mg/L de YAN (nitrogênio assimilável pelas leveduras).

O experimento foi realizado através da adição de 30% (v/v), 20% (v/v) e 10% (v/v) de mosto de uvas Moscato em mosto de mel e comparados com produtos obtidos por fermentação de Moscato e o tradicional hidromel. O mosto de uvas Moscatos filtrado foi cedido pela Vinícola São João, sendo constituído por Moscato Branco, Moscato Giallo e Moscato Bianco R2 em proporção aproximada de 60:30:20, respectivamente.

As fermentações foram realizadas em volumes de 4 L em recipientes fechados com válvulas de Muller, com três repetições por tratamento. Os mostos foram inoculados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23 (Lallemand, Montreal, Canada). Para tanto,

a levedura foi crescida em YEPD (1% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glucose) durante 48h a 28°C sob agitação orbital constante (150 rpm). A levedura foi recolhida por centrifugação, lavada com solução salina 0,9% NaCl e adicionada ao mosto para se obter um inóculo inicial de 10^6 células/ml.

As fermentações se desenvolveram no escuro a uma temperatura de 22 ± 2 ° C e foram monitoradas diariamente pela perda de peso (evolução de CO₂). Ao final das fermentações foram realizadas análises físico-químicas básicas e análises de compostos voláteis.

Análises físico-químicas

A densidade e os sólidos solúveis (°Brix) dos tratamentos foram avaliados diretamente com um densímetro (Densito®). O pH foi determinado pelo método potenciométrico utilizando um pHmetro (Digimed®) a uma temperatura de 20° C. O açúcar residual total (g/L) e o açúcar redutor (g/L) foram avaliados pelo método colorimétrico DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) segundo Miller (1959) com adaptações utilizando microplacas propostas por Santos *et al.* (2017). A intensidade da cor foi determinada através da absorvência a 420 nm utilizando um espectrofotômetro (Modelo 2800, Hitachi, Japão).

A concentração de etanol (%v/v) foi mensurada por densitometria após destilação das amostras seguindo o método OIV (<http://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf>). Acidez total e acidez volátil (meq /L) foram avaliadas por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N usando fenolftaleína como indicador, e por destilação a vapor seguida de titulação, respectivamente (Antonelli *et al.*, 1999).

A concentração de glicerol (g/L) foi quantificada por ensaio enzimático utilizando o kit Megazyme® Glycerol seguindo as instruções do fabricante. O nitrogênio assimilável pelas leveduras, YAN (mg/L) foi determinado pela técnica de titulação de formol descrita por Gump *et al.* (2002). A biomassa de levedura (g massa seca/L) foi determinada pelo método gravimétrico após centrifugação e secagem a 50°C. A taxa de fermentação foi calculada pela regressão da seção linear da perda de massa de CO₂ por dia, segundo Ciani e Maccarelli (1997).

Análise de compostos voláteis

A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando microextração em fase sólida (SPME) com fibra de poliacrilato, de acordo com a metodologia adaptada proposta por Xiao *et al.* (2015). Brevemente, em frasco para headspace de 20 ml com septo de silicone adicionaram-se, 8 ml de mostra, 2g de cloreto de sódio e 80 µL de 3-octanol (13,5 mg/L). Em banho

termostático a fibra DVB/CAR/PDMS 50/30 foi exposta ao espaço acima do líquido (headspace) e a amostra foi agitada magneticamente a 50°C por 45 minutos. Após a extração, a fibra foi aplicada no injetor do aparelho GC/MS. Utilizou-se um cromatógrafo a gás (GC) 6890 acoplado a um detector seletivo de massas (MS) 5973 (Agilent Technologies, USA), com coluna HP-INNOWAX (30m x0,25mm x 0,25 µm). As condições do forno foram de 40°C durante 2 min, aumentando a uma taxa de 3°C/min até 230°C por 2 min. A temperatura do injetor foi ajustada a 230°C e a fibra foi injetada em permanência de dessorção por 5 minutos, em modo split-less, com hélio em fluxo constante de 1,2 mL/min. Os parâmetros do MS incluíram ionização por impacto de elétrons com energia de elétrons de 70 eV e faixa de massa de m/z 30-550, usando o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). A área de cada pico foi determinada pelo software ChemStation (Agilent Technologies). A identificação dos compostos foi obtida comparando os índices de retenção (IR) com aqueles relatados na literatura, e os padrões de massa fragmentada com aqueles dos bancos de dados da Wiley (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) e do NISTDatabase. A quantificação dos compostos foi realizada através da comparação entre a área dos compostos e a área do padrão interno (3-octanol).

Cálculo da atividade odorífera (OAV)

A contribuição de cada composto volátil para o aroma dos fermentados foi avaliado qualitativamente pelo seu descritor associado e pelo seu valor de atividade de odor (OAV). Os valores foram calculados através da razão entre a concentração do composto e o limiar de percepção relatado na literatura.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA com comparação de médias pelo teste de Tukey e os resultados das análises de compostos voláteis foram submetidas a análise multivariada (CP), utilizando o software SPSS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do mosto

As quantidades iniciais de sólidos solúveis, pH, intensidade de cor, açúcares redutores, açúcares residuais totais e acidez total dos mostos variaram de acordo com as diferentes concentrações de mosto de Moscato adicionadas ao de mel. A quantidade de sólidos solúveis

no mosto de mel (0% de mosto Moscato) alcançou uma concentração média de 22,23 °Brix, enquanto o mosto de Moscato apresentou 14,67 °Brix. Já os mostos mistos exibiram um decréscimo gradual, onde o mosto contendo 10% de Moscato, semelhante ao hidromel (22,27°Brix), o mosto com 20% de Moscato com 21,63 °Brix e o com 30% de Moscato com valor de 20,93 °Brix.

Da mesma forma, o pH e intensidade de cor exibiram um decréscimo gradativo e significativo em dependência da concentração de mosto de Moscato adicionado. O mosto de mel apresentou o maior valor de pH e intensidade de cor, 3,89 e 0,6863, respectivamente, enquanto o mosto de Moscato apresentou pH 3,13, e intensidade de cor de 0,1617. Já os mostos com diferentes concentrações de mosto Moscato, 10%, 20% e 30%, apresentaram valores intermediários de pH de 3,61, 3,43 e 3,41, e intensidade de cor de 0,6120, 0,5327, 0,5183, respectivamente.

Como a quantidade de nitrogênio foi ajustada, não foram detectadas diferenças significativas na quantidade de nitrogênio assimilável por leveduras (YAN), variando este entre 146,95 mg/L no mosto de mel a 134,44 mg/L no mosto de Moscato. Quanto às quantidades de açúcares residuais totais, o tratamento com 30% de mosto Moscato alcançou a maior concentração, 299,65 g/L e o mosto de Moscato a menor concentração de açúcares residuais totais, 228,55 g/L. A acidez total dos diferentes mostos variou entre 44 mEq/L e 160 mEq/L, sendo o menor valor de acidez total identificado no mosto de mel e os maiores no mosto Moscato. Como esperado, os tratamentos apresentaram valores crescentes dependendo da proporção de mosto Moscato adicionado: 48,67 mEq/L para o mosto com 10%, 59, 33 mEq/L no mosto de 20%, e 65,33 mEq/L no mosto com 30% de Moscato.

Ensaio fermentativos

As fermentações foram conduzidas durante 18 dias (Figura 1), exceto a fermentação do vinho Moscato que durou 11 dias devido à menor quantidade açúcar inicial (228,55 g/L). As fermentações foram monitoradas diariamente através do desprendimento de CO₂. Para o hidromel tradicional e os “pyments” após o 11º dia as fermentações tornam-se mais lentas. Este fato pode estar relacionado aos açúcares de difícil consumo por parte das leveduras (Pereira *et al.*, 2013, 2014) ou à limitação em outros nutrientes.

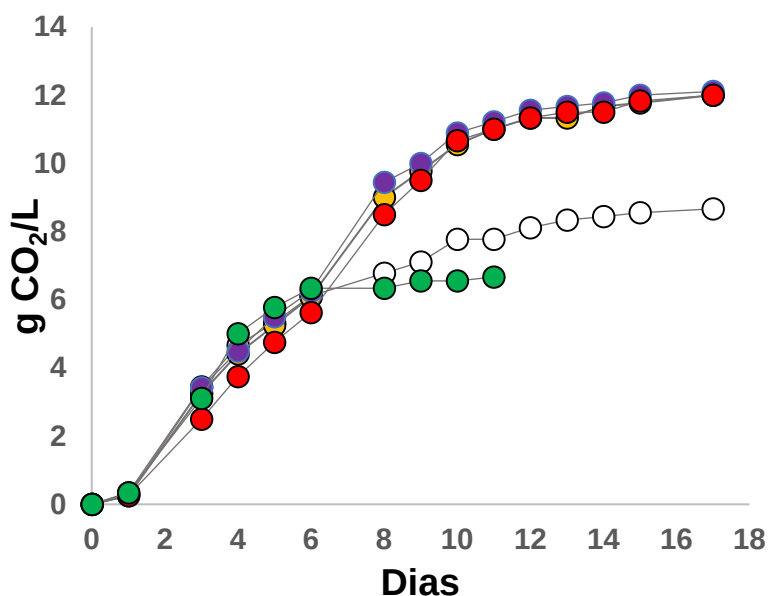


Figura 1. Comparação da cinética fermentativa determinada pelo desprendimento de CO₂ (g/L) entre os diferentes tratamentos: hidromel (○), “pyment” com 10% de Moscato (●), “pyment” com 20% de Moscato (●), “pyment” com 30% de Moscato (●) e vinho Moscato (●).

As taxas fermentativas (Figura 1 e Tabela 1) variaram significativamente entre 0,56 g CO₂/L/dia, para o hidromel, e 1,25 gCO₂/L/dia para o vinho Moscato, mostrando uma tendência crescente dependente da adição de mosto de uva.

Por outro lado, não foram evidenciadas diferenças significativas na taxa fermentativa entre os “pyments” com as diferentes concentrações de Moscato. Porém, a taxa fermentativa aumentou significativamente nos “pyments” em comparação com as fermentações realizadas apenas com mosto de mel. Grande parte dos problemas de fermentação, no hidromel, são consideradas como decorrentes da deficiência de nitrogênio, minerais e outros fatores de crescimento e, apesar da correção nutricional, a utilização de mosto de uva Moscato resultou em um aumento na taxa fermentativa. Como uma forma de corrigir problemas relacionados ao vigor fermentativo, sucos de frutas têm sido usados como aditivos para estimular a fermentação e aprimorar o processo de produção de hidromel (Gupta e Sharma, 2009).

Caracterização físico-química dos fermentados

Os resultados relativos às características físico-químicas dos fermentados são apresentados na Tabela 1. Conforme pode ser observado, houve um decréscimo de densidade, açúcar residual, pH e intensidade de cor em dependência da quantidade de mosto Moscato adicionado nos diferentes tratamentos. O hidromel tradicional e os tratamentos com 10%, 20%

e 30% de mosto Moscato apresentaram menores valores de acidez total e maior densidade final, pH, intensidade de cor e açúcar residual, em comparação com o vinho Moscato. Segundo Pereira *et al* (2013, 2014), 40g/L de açúcar residual em hidromeis já foi descrito e resulta de açúcares não fermentáveis geralmente encontrados em mel, tais como trealose, isomaltose e melezitose. Já o tratamento com 30% de Moscato apresentou densidade e pH com valores mais próximos ao vinho Moscato, menor intensidade de cor e quantidade de açúcar residual, e uma maior acidez total em comparação ao hidromel tradicional. O aumento de acidez total pode ser considerado vantajoso pois tem efeito sensorial positivo, especialmente quando associada à presença de açúcar residual, trazendo maior equilíbrio em boca (Pangborn *et al.*, 1964; Noordeloos e Nagel, 1972). No caso de hidromel, a maior acidez pode diminuir a sensação doce resultante da alta concentração de açúcares residuais.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos dos diferentes fermentados.

	Hidromel	“Pyment” - 10%	“Pyment” - 20%	“Pyment” - 30%	Moscato
Densidade	1,007±0,001 ^a	1,0035±0,0023 ^b	1,0002±0,0006 ^c	0,9993±0,0005 ^c	0,9949±0,0001 ^d
pH	3,48±0,07 ^a	3,41±0,01 ^a	3,42±0,02 ^a	3,24±0,03 ^b	3,28±0,06 ^b
Intensidade de cor	0,30±0,05 ^a	0,13±0,02 ^b	0,12±0,01 ^b	0,10±0,03 ^{bc}	0,03±0,00 ^c
YAN (mg/L)	31,27±2,71 ^{ab}	23,45±4,69 ^b	26,58±5,42 ^{ab}	42,21±12,41 ^a	31,27±2,71 ^{ab}
Açúcares redutores (g/L)	41,33±1,69 ^a	35,21±4,75 ^a	25,63±1,19 ^b	19,04±2,27 ^b	1,12±0,10 ^c
Açúcares residuais totais (g/L)	49,37±2,94 ^a	42,87±4,15 ^a	33,2±0,63 ^b	25,44±1,85 ^c	2,06±0,27 ^d
Acidez total (mEq/L)	59,33±1,15 ^c	58,00±3,46 ^c	76,00±8,72 ^b	81,33±1,15 ^b	152,00±2,00 ^a
Acidez volátil (mEq/L)	12,33±0,58 ^a	11,67±2,08 ^a	11,00±1,00 ^a	12,00±0,00 ^a	6,00±0,00 ^b
Etanol (% v/v)	11,53±0,12 ^a	12,20±0,35 ^a	11,9±0,26 ^a	11,53±0,31 ^a	8,27±0,12 ^b
Taxa Fermentativa (g CO ₂ /L/dia)	0,56±0,04 ^c	1,08±0,02 ^b	1,11±0,05 ^b	1,11±0,02 ^b	1,25±0,01 ^a
Glicerol (g/L)	6,18±0,20 ^a	5,65±0,68 ^a	5,80±0,37 ^a	5,75±0,28 ^a	5,39±0,31 ^a
Relação Glicerol/etanol	0,54±0,01 ^b	0,46±0,07 ^b	0,49±0,04 ^b	0,50±0,03 ^b	0,65±0,04 ^a

A concentração de etanol e a acidez volátil foram significativamente menores apenas no vinho Moscato, o que está associado a menor concentração inicial de açúcar. Por outro lado, não foram evidenciadas diferenças significativas na quantidade de glicerol (g/L) entre os tratamentos, variando entre 6,18 g/L no hidromel tradicional e 5,39 g/L, no vinho Moscato, com valores intermediários nos “pyments”. A produção de glicerol é desejável para obter hidromeis de boa qualidade, uma vez que a sua presença atribui maior plenitude e suavidade em boca (Gomes *et al.*, 2015). O conteúdo de glicerol observado está dentro das concentrações encontradas habitualmente em vinhos brancos (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Caracterização volátil

As concentrações de trinta e dois compostos, incluindo álcoois, ésteres, ácidos graxos, terpenos e outros compostos voláteis, foram determinados através de GC/MS nos “pyments”, no vinho Moscato e no hidromel tradicional (Tabela 2). Para caracterizar a composição aromática destes hidromeis, considerou-se a soma dos ésteres de acetato, ésteres etílicos, terpenos e álcoois superiores, a produção individual de cada composto volátil identificado e os valores da atividade odorífica (OAV).

Compostos voláteis como álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres são importantes parâmetros de qualidade e indicadores sensoriais para bebidas alcoólicas (Janáčová *et al.*, 2008; Saénz-Navajas *et al.*, 2013). Os álcoois superiores conferem aromas de creme de amêndoas e álcool fusel (Catania e Avagnina, 2010) e podem contribuir favoravelmente para o buquê dos vinhos (Ebeler e Thorngate, 2009). Porém, em concentrações acima de 400 mg/L são considerados como um fator negativo na qualidade de vinhos (Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta, 2008). Os “pyments” exibiram as menores quantidades de álcoois superiores em comparação com o vinho Moscato e o hidromel, a concentração nos “pyments” variou entre 111,52 mg/L a 81,80 mg/L, nos tratamentos com 30% de Moscato e 20% de Moscato, respectivamente. Por sua vez, o hidromel apresentou 120,00 mg/L e o vinho Moscato 312,85 mg/L de álcoois superiores. A menor concentração de álcoois superiores no hidromel pode ser atribuída a baixa presença de aminoácidos livres no mosto de mel, já que os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras a partir de aminoácidos pela reação de Ehrlich (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Em mostos de uva a concentração de aminoácidos pode variar entre 1000 – 4000 mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), já a quantidade de aminoácidos no mel raramente ultrapassa 300 mg/L (White, 1992) sendo principalmente composto por prolina, que corresponde entre 50% e 85% do total de aminoácidos livres, seguido de fenilalanina, tirosina e lisina (Hermosín *et al.*, 2003). Prolina é um aminoácido utilizado pela levedura, mas não é catabolizado pela reação de Ehrlich (Pires *et al.*, 2014).

Tabela 2. Concentração dos compostos aromáticos (mg/L) identificados no hidromeis, nos “pyments”, com as diferentes concentrações de mosto de Moscato e no vinho Moscato, e limiar de percepção – LP (mg/L).

Álcoois	Hidromel	“Pyment” 10%	“Pyment” 20%	“Pyment” 30%	Moscato	LP
1-propanol	3,23 ± 0,57 ^{bc}	2,66 ± 0,22 ^c	2,26 ± 0,31 ^c	5,06 ± 0,15 ^b	8,59 ± 1,55 ^a	500
1-propanol, 2-metil	2,55 ± 0,62 ^b	2,57 ± 0,48 ^b	2,68 ± 0,78 ^b	3,53 ± 0,26 ^b	14,45 ± 5,01 ^a	75
1-butanol, 3-metil	75,67 ± 7,16 ^{bc}	58 ± 1,54 ^{cd}	51,97 ± 1,4 ^d	87,52 ± 6,97 ^b	166,26 ± 12,22 ^a	300
1-pentanol, 3-metil	0,12 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,05 ^a	0,20 ± 0,00 ^a	0,23 ± 0,20 ^a	1
2-feniletanol	38,35 ± 0,78 ^b	40,93 ± 3,66 ^b	23,88 ± 4,52 ^b	13,78 ± 2,13 ^b	119,11 ± 27,12 ^a	7,50
1-hexanol	0,05 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,24 ^b	0,57 ± 0,14 ^b	1,16 ± 0,19 ^b	2,99 ± 1,01 ^a	8
1-octanol	0,18 ± 0,03 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,14 ^{ab}	0,90
1-dodecanol	0,15 ± 0,03 ^a	0,33 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,12 ^a	0,27 ± 0,23 ^a	1,07 ± 0,78 ^a	1
Soma álcoois superiores	120,31 ± 7,68 ^b	105,05 ± 3,08 ^b	81,80 ± 4,15 ^b	111,52 ± 8,65 ^b	312,85 ± 41,01 ^a	
Ácidos graxos voláteis						
ácido hexanoico	8,88 ± 0,77 ^a	6,16 ± 1,07 ^{bc}	5,00 ± 0,04 ^c	5,45 ± 1,44 ^{bc}	7,36 ± 0,00 ^{ab}	0,42
ácido octanoico	70,88 ± 12,67 ^a	36,34 ± 7,07 ^b	51,04 ± 9,03 ^{ab}	44,46 ± 7,24 ^b	32,48 ± 1,20 ^b	0,50
ácido n-decanoico	33,10 ± 2,27 ^a	16,84 ± 2,09 ^b	16,83 ± 0,62 ^b	23,22 ± 5,30 ^b	8,69 ± 1,62 ^c	10
ácido dodecanoico	0,27 ± 0,10 ^b	1,08 ± 0,03 ^{ab}	0,92 ± 0,06 ^b	0,67 ± 0,84 ^b	2,21 ± 0,49 ^a	1
Soma ácidos graxos	113,13 ± 15,11 ^a	60,43 ± 8,30 ^b	73,79 ± 9,48 ^b	73,80 ± 8,49 ^b	50,74 ± 1,41 ^b	
Ésteres de acetato						
acetato de isoamilo	4,82 ± 0,8 ^b	4,06 ± 0,74 ^b	5,57 ± 0,82 ^b	7,79 ± 1,06 ^{ab}	12,21 ± 3,66 ^a	0,26
acetato de hexila	0,00 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,03 ^b	0,22 ± 0,00 ^b	0,60 ± 0,00 ^b	2,83 ± 0,53 ^a	0,67
acetato de feniletila	10,50 ± 2,10 ^b	7,42 ± 1,24 ^b	6,79 ± 2,11 ^b	5,84 ± 1,97 ^b	67,56 ± 17,09 ^a	0,25
acetato de etila	19,54 ± 3,17 ^b	13,61 ± 1,40 ^c	17,61 ± 1,85 ^{bc}	21,73 ± 1,35 ^b	52,92 ± 0,58 ^a	160
Soma acetatos	34,87 ± 1,26 ^b	25,13 ± 0,69 ^b	30,19 ± 3,37 ^b	35,96 ± 2,82 ^b	135,53 ± 15,79 ^a	
Ésteres etílicos						
hexanoato de etila	5,45 ± 0,94 ^a	2,60 ± 1,15 ^b	1,56 ± 0,18 ^b	2,14 ± 0,14 ^b	6,81 ± 0,58 ^a	0,08
octanoato de etila	55,62 ± 9,65 ^a	14,98 ± 3,37 ^{bc}	14,24 ± 2,28 ^{bc}	20,26 ± 2,27 ^b	5,82 ± 0,29 ^c	0,58
decanoato de etila	105,88 ± 8,04 ^a	29,87 ± 2,13 ^b	17,57 ± 5,02 ^b	24,75 ± 11,00 ^b	21,43 ± 15,59 ^b	0,40
dodecanoato de etila	10,18 ± 0,96 ^a	7,46 ± 0,34 ^{ab}	2,13 ± 0,58 ^c	4,58 ± 0,02 ^{bc}	9,42 ± 2,61 ^a	1,50
feniletilacetato de etila	0,16 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,08 ^a	0,65
9-decenoato de etilo	1,66 ± 0,09 ^a	0,55 ± 0,07 ^b	0,24 ± 0,02 ^b	0,61 ± 0,10 ^b	2,04 ± 0,76 ^a	0,10
Soma etilatos	179,46 ± 19,01 ^a	55,81 ± 5,36 ^b	36,06 ± 5,89 ^b	52,63 ± 10,60 ^b	45,76 ± 13,12 ^b	
Terpenóides						
linalol	0,83 ± 0,00 ^d	1,39 ± 0,34 ^d	2,14 ± 0,18 ^c	3,07 ± 0,32 ^b	10,63 ± 0,00 ^a	0,05
hotrienol	0,96 ± 0,06 ^c	1,21 ± 0,14 ^c	1,71 ± 0,08 ^b	1,60 ± 0,26 ^b	6,51 ± 0,00 ^a	0,11
citronelol	0,19 ± 0,08 ^b	0,27 ± 0,06 ^b	0,38 ± 0,07 ^b	0,39 ± 0,10 ^b	2,23 ± 0,57 ^a	0,40
alfa-terpineol	0,00 ± 0,00 ^d	0,43 ± 0,07 ^c	0,67 ± 0,15 ^c	1,08 ± 0,12 ^b	4,95 ± 0,00 ^a	0,40
limoneno	0,00 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,03 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,04 ^b	0,38 ± 0,14 ^a	0,02
geraniol	0,00 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,03 ^b	0,38 ± 0,04 ^b	4,43 ± 1,74 ^a	0,03
cosmene	0,00 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,04 ^b	0,07 ± 0,04 ^b	2,22 ± 0,23 ^a	-
Soma terpenos	1,98 ± 0,15 ^d	3,54 ± 0,29 ^{cd}	5,22 ± 0,40 ^{bc}	6,65 ± 0,51 ^b	31,33 ± 1,63 ^a	
Outros compostos voláteis						
acetaldeído	1,44 ± 0,09 ^b	0,40 ± 0,16 ^b	0,69 ± 0,09 ^b	1,29 ± 0,21 ^b	5,28 ± 2,08 ^a	0,50
succinato de dietila	0,00 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,43 ^a	200
Vinil guaiacol	0,27 ± 0,04 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,08 ^a	1,18 ± 0,86 ^a	1,15

Os compostos que mais contribuíram para a soma dos álcoois superiores em todos os tratamentos foram 3-metil-1-butanol (derivado da leucina) e 2-feniletanol (derivado da fenilalanina), sendo esses álcoois superiores precursores para seus ésteres correspondentes, acetato de isoamila (aroma de banana) e acetato de feniletila (aroma de rosas), também encontrados em maior quantidades no vinho Moscato. Os ésteres de acetatos, que são derivados de etanol ou de álcoois superiores, como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de feniletila, são reconhecidos como importantes compostos aromáticos em vinhos e em outras bebidas alcoólicas (Viana *et al.*, 2008). A soma das concentrações de ésteres de acetato para o hidromel foi de 34,87 mg/L e para o vinho Moscato foi de 135,53 mg/L, para os “pyments” a concentração de acetatos variou entre 25,13 mg/L a 35,00 mg/L, tratamento com 10% de Moscato e com 30% de Moscato, respectivamente. Não houve diferenças significativas na quantidade de ésteres de acetato entre o hidromel tradicional e os “pyments”, assim como na soma dos álcoois superiores. Os compostos que mais influenciam a soma dos ésteres de acetato foram o acetato de feniletila (aroma de rosas) e o acetato de etila (aroma de solvente), porém este último está abaixo do limiar de percepção.

A concentração total de ácidos graxos variou entre 50,74 mg/L (vinho Moscato) e 113,13 mg/L (hidromel tradicional), sendo o ácido octanoico (70,88 mg/L) o composto que mais contribuiu para esta soma. Quanto aos “pyments”, em comparação com o hidromel tradicional, há uma diminuição desses ácidos graxos, variando entre 60,43 mg/L e 73,80 mg/L no “pyment” com 10% e com 30% de Moscato, respectivamente. Os ácidos graxos são um grupo de compostos que geralmente atribuem aromas desagradáveis, variando de queijo a rançoso (Ilc *et al.*, 2016). Porém, seus ésteres correspondentes que incluem hexanoato de etila (aroma de maçã) e dodecanoato de etila (aroma frutado e floral), desempenham um papel fundamental nas notas frutadas de vinhos jovens brancos (Ferreira *et al.*, 1995). Igualmente, a maior concentração de ésteres etílicos (derivados de ácidos graxos) é evidenciada no hidromel tradicional, as concentrações medianas nos “pyments” e as menores concentrações desses ésteres no vinho Moscato.

A maior quantidade de terpenos foi evidenciada no vinho Moscato (31,33 mg/L) e a menor concentração no hidromel tradicional (1,98 mg/L). Nos “pyments” esses valores variaram de 3,54 mg/L a 6,65 mg/L, aumentando em dependência da adição de mosto de Moscato nos tratamentos. Assim, a adição de mosto Moscato atribui características florais aos “pyments”, melhorando a qualidade sensorial destes hidromeis. Linalol e hotrienol foram os terpenos com maiores valores em todos os tratamentos, porém não houve diferenças

significativas entre o hidromel tradicional e o “pymment” com 10% de Moscato para estes compostos. Já os terpenos terpineol, limoneno, geraniol e cosmene não são evidenciados no hidromel tradicional, sugerindo que sua presença seja decorrente da adição de Moscato. Os compostos aromáticos mais característicos das variedades Moscato pertencem à família química dos terpenos (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006, González-Barreiro *et al.* 2015). Linalol, geraniol, nerol, citrionelol e α -terpineol são encontrados em muitos vinhos de caráter floral, como os Moscatos (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006). Por outro lado, em meios os compostos orgânicos voláteis, entre eles os terpenos, estão presentes em baixas concentrações e dependem da origem botânica do mel (Jerković e Kuš, 2014).

O vinho Moscato, além de apresentar os maiores valores para a soma total de álcoois, ésteres de acetato e terpenos, também apresentou os maiores valores de acetaldeído, 5,28 mg/L, seguido do hidromel tradicional, 1,44mg/L, e por fim dos “pymments”, com concentrações que variaram de 0,4 mg/L (“pymment” com 10% de Moscato) a 1,29 mg/L (“pymment” com 30% de Moscato). O acetaldeído, ou etanal, está diretamente relacionado com o metabolismo da levedura na fermentação alcoólica. Quando uma levedura é submetida a um estresse osmótico, a redução de acetaldeído para etanol é frequentemente desacelerada, como resultado mais ácido acético é sintetizado (Erasmus,*et al.*, 2003), além disso, o acetaldeído é produzido através da descarboxilação do piruvato, sendo necessário tiamina para o funcionamento da enzima piruvato-decarboxilase, podendo as altas quantidades de acetaldeído no vinho Moscato indicar uma falta de tiamina no mosto.

Os valores de atividade de odor (OAVs) foram determinados e a média de apenas 22 compostos com um OAV>1, que contribuem individualmente para o aroma do vinho (Guth 1997), foram analisados usando a análise multivariada de componentes principais (Figura 2), a fim de possibilitar uma clara diferenciação da composição volátil e aromática entre os tratamentos e os diferentes produtos. Complementarmente, os OAVs para os compostos que exibiram o mesmo descritor aromático foram agrupados e apenas seis aromas foram estabelecidos, sendo eles floral, frutado, ranço, cítrico, pungente e cravo, sendo os descritores aromáticos floral, frutado e ranço os que contribuíram de forma mais marcante para o perfil aromático dos fermentados.

Os dois primeiros componentes (95,97% de variância) da análise multivariada realizada com base na concentração de 22 compostos voláteis permitiu a separação de três grupos: (a) hidromel tradicional (sem adição de mosto de uva); (b) “pymments” com 10%, 20% e 30% de adição de mosto de uva; e (c) vinho Moscato. Conforme pode ser observado na Figura 2, os

“pyments” apresentaram características aromáticas complementares entre o hidromel e o vinho Moscato.

O primeiro componente (72,06%) separou o vinho Moscato dos “pyments” e do hidromel tradicional. Os compostos que mais contribuíram para esta separação foram 2-feniletanol, 1-dodecanol, ácido dodecanoico, acetato de isoamila, acetato de hexila, acetato de feniletila, os terpenos (linalol, hotrienol, citronelol, terpineol, limoneno e geraniol), acetaldeído e vinilguaiacol, para os quais o vinho Moscato apresentou maiores concentrações. Por outro lado, hidromeis e “pyments” exibiram maiores concentrações de ácido decanoico. No agrupamento por descritor aromático, o vinho Moscato exibiu as maiores quantidades de compostos (OAV>1) com o descritor aromático floral, sendo esta soma influenciada principalmente pelo acetato de feniletila e o linalol.

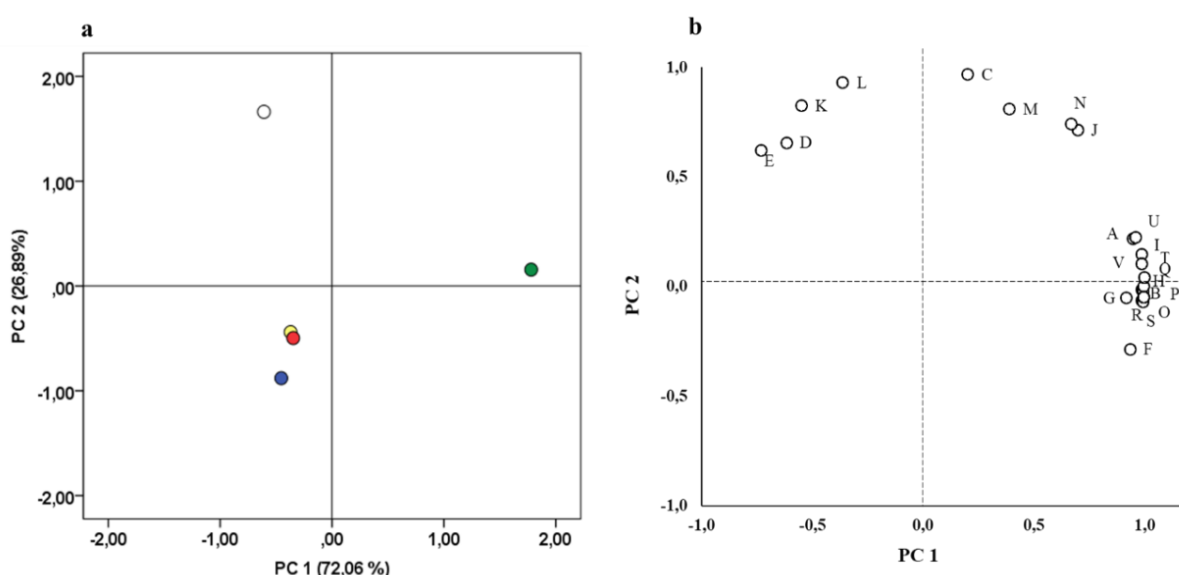


Figura 2. (a) Análise de componentes principais (PC) com base nos compostos voláteis com OAV >1 para o hidromel (○), “pyments” com 10% (●), 20% (●) e 30% de mosto Moscato (●) e vinho Moscato (●), e (b) Contribuição das variáveis: 2-feniletanol (A); 1-dodecanol (B); ácido hexanoico (C); ácido octanoico (D); ácido decanoico (E); ácido dodecanoico (F); acetato de isoamila (G); acetato de hexila (H); acetato de feniletila (I); hexanoato de etila (J); octanoato de etila (K); decanoato de etila (L); dodecanoato de etila (M); 9-decanoato de etila (N); linalol (O); hotrienol (P); citronelol (Q); terpineol (R); limoneno (S); geraniol (T); acetaldeído (U) e vinilguaiacol (V).

O segundo componente (26,89%) separou o hidromel tradicional e do vinho Moscato dos “pyments”. Os componentes que mais contribuíram para esta separação foram o ácido

hexanoico, ácido octanoico, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila e 9-decenoato de etila, sendo o hidromel tradicional o fermentado com maiores concentrações destes compostos. O hidromel tradicional destacou-se por exibir as maiores quantidades de compostos ($OAV > 1$) que atribuem aromas frutados, sendo decanoato de etila o composto que mais influenciou esta soma, e ranço, onde a soma foi influenciada, principalmente, pelo ácido octanoico. Os “pyments”, nas três diferentes concentrações de uva Moscato, distingue-se dos demais produtos por apresentar maiores concentrações de ácido octanoico e ácido decanoico e menores concentrações de todos os outros compostos com $OAV > 1$, sendo que os “pyments” exibiram valores mais próximos para os compostos aromaticamente descritos como floral, ranço e frutado, não exacerbando na soma total desses descritores.

De acordo com Ferreira *et al.* (2011) ácidos orgânicos, álcoois superiores e ésteres, com suas notas frutadas, são componentes sensoriais significativos do vinho e em outras bebidas fermentadas e são os principais compostos que formam um buquê de fermentação. Em baixos níveis, a maioria desses compostos contribui para o aroma primário, porém, em níveis elevados eles podem dominar o aroma e, conseqüentemente, diminuir sua complexidade.

CONCLUSÃO

A adição de mosto de uva Moscato na elaboração de hidromeis, originando uma bebida denominada “pyment”, pode contribuir positivamente para o perfil fermentativo solucionando a falta de vigor fermentativo em hidromeis tradicionais e minimizando a alta doçura atribuída a esses hidromeis. Os “pyments” caracterizados neste estudo obtiveram concentrações mais equilibradas de compostos caracterizados como florais, frutados e rançosos, resultando em um produto que dispõe de uma maior complexidade aromática, manifestando aromas característicos de vinhos elaborados com uvas Moscato e simultaneamente, expondo aromas característicos do mel. Através deste estudo os “pyments-moscato” podem ser caracterizados como um produto particularmente complexo e distinto em comparação ao hidromel tradicional e ao vinho Moscato, sendo sua elaboração uma alternativa tanto para apicultores quanto para produtores de uva.

REFERENCIAS

Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., e Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem*, 47: 1139-1144.

- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal – Lanara. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos Físicos e Químicos. Brasília, DF. 1981. p. XXV 3 – XXV 10.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 20 de abril de 2005.
- Brasil. Decreto nº6871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas pela Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Diário Oficial da União. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância Sanitária, 2009.
- Catania, C. D., e Avagnina, S. (2010). La interpretación sensorial del vino. INTA.
- Ciani, M., e Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol*, 14: 199-203.
- Ebeler, S. E., e Thorngate, J. H. (2009). Wine chemistry and flavor: looking into the crystal glass. *J Agric Food Chem.*, 57: 8098-8108.
- Erasmus, D. J., van der Merwe, G. K., e van Vuuren, H. J. (2003). Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res*, 3: 375-399.
- Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., e Cacho, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J Sci Food Agric*, 67: 381-392.
- Ferreira, A. M., Barbosa, C., Lage, P., e Mendes-Faia, A. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciênc Técn Vitivini*, 26: 17-32.
- Garde-Cerdán, T., e Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT- Food Sci Technol*, 41: 501-510.
- Gomes, T., Dias, T., Cadavez, V., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2015). Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. *Pol J Food Nutr Sci*, 65: 137-142.
- González Lorente M., De Lorenzo Carretero C., Pérez Martin R.A. (2008). Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish honeys, *J Sens Stud*, 23: 293-302.

- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., e Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55: 202-218.
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., e Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *Am J Enol Vitic*, 53: 325-329.
- Gupta, J. K., e Sharma, R. (2009). Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *NOPR* 8: 345-355.
- Guth, H. (1997) Identification of character impact odorants of different white varieties. *J Agric Food Chem*, 45: 3022–3026.
- Jerković, I., e Kuš, P. M. (2014). Terpenes in honey: occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. *RSC Adv*, 4: 31710-31728.
- Herbert J. Ammerican Mead Maker's 2nd annual mead industry report. American mead maker, v. 15, abr. 2015. Disponível em: <http://issuu.com/americanmead/docs/amma_15.1>.
- Hermosín, I., Chicon, R. M., e Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem*, 83: 263-268.
- Iglesias, A., Pascoal, A., Choupina, A. B., Carvalho, C. A., Feás, X., e Estevinho, L. M. (2014). Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, 19: 12577-12590.
- Ilc, T., Werck-Reichhart, D., e Navrot, N. (2016). Meta-analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Front Plant Sci*, 7:1472.
- Janáčová, A., Sádecká, J., Kohajdová, Z., e Špánik, O. (2008). The identification of aroma active compounds in slovak brandies using GC-Sniffing, GC-MS and sensory evaluation. *Chromatographia*, 67: 113-121.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., e Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int J Food Microbiol*, 144: 193-198.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem*, 31: 426-428.
- Noordeloos, S., e Nagel, C. W. (1972). Effect of sugar on acid perception in wine. *Am J Enol Vitic*, 23: 139–143.
- Pangborn, R. M., Ough, C. S., e Chrisp, R. B. (1964). Taste interrelationship of sucrose, tartaric acid, and caffeine in white table wine. *Am J Enol Vitic*, 15: 154–161.

- Pereira A.P., Mendes-Ferreira A., Oliveira J.M., Estevinho L.M., Mendes-Faia A. (2013) High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production, *Food Microbiol*, 33: 114-123.
- Pereira A.P., Mendes-Ferreira A., Oliveira J.M., Estevinho L.M., Mendes-Faia A. (2014) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production, *LWT-Food Sci Technol*, 56: 21-30.
- Pires, E. A., Ferreira, M. A., da Silva, S. M. P. C., e Santos, F. L. (2013). Estudo prospectivo do hidromel sob o enfoque de documento de patentes. *Geintec*, 3: 033-041.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., e Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 1937-1949.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., e Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology*, Vol 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1). John Wiley e Sons.
- Rizzon, L.A., Salvado, M.B.A., e Miele, A. (2008). Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. *Ciênc Tecnol Aliment*, 28: 635-641..
- Saénz-Navajas, M. P., Ballester, J., Pêcher, C., Peyron, D., e Valentin, D. (2013). Sensory drivers of intrinsic quality of red winesI: Effect of culture and level of expertise. *Food Res Int*, 54: 1506-1518.
- Salmon, J. M., e Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3831-3837.
- Santos, A. A. D., Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., e Alves Junior, S. L. (2017). Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. *Braz J Food Technol*, 20.
- Teramoto, Y., Sato, R., e Ueda, S. (2005). Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine, ogol. *Afr J Biotechnol*, 4: 160-163.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., e Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol*, 25: 778-785.

- Vidrih R., Hribar J. (2016) Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. In: Kristbergsson K., Oliveira J. (eds) *Traditional Foods. Integrating Food Science and Engineering Knowledge Into the Food Chain*, vol 10. Springer, Boston, pp. 325-338.
- Welke, J. E., Manfroi, V., Zanusi, M., Lazzarotto, M., e Zini, C. A. (2013). Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data. *Food Chem*, 141: 3897-3905.
- White, J. W., Jr. (1992) Honey. In: Graham, J. M. (Ed) *The Hive and the Honey bee*, Dadant e Sons: Hamilton, IL, p 869–925.
- Xiao, Z., Zhou, X., Niu, Y., Yu, D., Zhu, J., e Zhu, G. (2015). Optimization and application of headspace-solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherry wines. *J Chromatogr B*, 978:122-130.

5. DISCUSSÃO GERAL

A produção de hidromel enfrenta vários problemas, tais como fermentação lenta ou parada fermentativa, falta de uniformidade do produto final e produção de aromas desagradáveis de origem leveduriana (Ramalhosa *et al.*, 2011). Neste trabalho, avaliaram-se os problemas relacionados à deficiência nutricional do mosto de mel, selecionaram-se leveduras capazes de suportar as condições particulares e composição do mosto de mel e desenvolveram-se alternativas para a suplementação e para a elaboração de um novo produto, “Moscatto-pyment”, aproveitando as potencialidades da Serra Gaúcha na produção de mel e mostos de uvas Moscato.

De acordo com a literatura, a deficiência de nitrogênio é uma das principais causas da fermentação lenta ou parada fermentativa em vinho e hidromel (Beltran *et al.*, 2005; Ramalhosa *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015^a), podendo determinar fermentações que levam vários meses para serem concluídas ou, eventualmente, paradas de fermentação, já que o nitrogênio influencia o crescimento de levedura, a taxa de fermentação e a duração da fermentação (Bely *et al.*, 1994).

A disponibilidade de nitrogênio está relacionada com a taxa fermentativa, a concentração de etanol e a produção de biomassa em concentrações entre 15 e 135 mg/L de YAN. Neste sentido, os dados obtidos mostraram que em concentrações próximas a 150 mg/L não há diferenças significativas. Além disso, as fermentações realizadas na ausência de suplementação de minerais, independentemente da quantidade de nitrogênio, não foram capazes de completar a fermentação (30 dias), exibindo a menor taxa de fermentação, concentração final de etanol e produção de biomassa de levedura.

Os dados indicam que a suplementação apenas com nitrogênio não garante a completude da fermentação, sendo a quantidade de minerais no mosto, principalmente potássio, tão importante para a eficiência fermentativa quanto a quantidade de nitrogênio, influenciando os parâmetros físico-químicos finais de hidromeis. Baixas concentrações de potássio interferem no pH intracelular e extracelular, no metabolismo do açúcar (Kudo *et al.*, 1998) e influenciam a tolerância ao etanol (Singh, Jedhe, Diwanay, e Shede, 2017). Assim como evidenciou-se a necessidade da suplementação de nitrogênio e minerais no mosto de mel para uma fermentação ideal do hidromel, a adição de vitaminas pôde afetar significativamente o vigor fermentativo, porém com uma influência menor do que outros parâmetros.

As leveduras possuem diferenças na demanda de nitrogênio, com relação entre a qualidade da fonte de nitrogênio e a concentração de açúcar (Manginot *et al.*, 1998; Martínez-Moreno *et al.*, 2012). Diferentes espécies de leveduras, assim como cepas dentro de cada espécie, apresentam diferenças na produção de compostos voláteis e nos parâmetros físico-químicos de acordo com a composição do mosto original (Romano *et al.*, 2003).

As leveduras enológicas avaliadas neste trabalho exibiram potenciais diferentes para a produção de hidromel, cada uma contribuindo com distintas características no produto final. Nas características fermentativas, as leveduras selecionadas com baixa demanda de nitrogênio foram capazes de concluir a fermentação com taxas fermentativas similares, porém com diferenças significativas entre algumas delas. Nas concentrações de açúcares residuais, produção de biomassa, produção de glicerol e intensidade de cor, houve diferenças significativas entre as leveduras, porém para etanol, nitrogênio remanescente, acidez total e acidez volátil não houve diferenças significativas. Já nas características aromáticas, as leveduras SPARK e AWRI-R2 foram as que mais produziram compostos voláteis e quanto aos compostos com OAV>1, pôde-se evidenciar uma clara diferença aromática nos hidromeis fermentados com *S. cerevisiae* var *bayanus* e *S. cerevisiae* var *cerevisiae*. De um modo geral, estas diferenças corroboram com dados prévios obtidos em vinhos (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006), especialmente no que diz respeito à concentração de 2-feniletanol e acetato de feniletila.

Em contrapartida, a escolha da levedura que melhor contribui para a produção de hidromeis é variável em dependência do mel utilizado e das características aromáticas que se pretenda obter. Neste estudo, as cinco leveduras selecionadas foram capazes de fermentar o mosto de mel vigorosamente, acarretando características aromáticas distintas e possibilitando a obtenção de produtos com nuances diferentes dependendo da escolha do produtor.

O hidromel e seus produtos variantes são considerados bebidas com progressiva importância econômica devido ao aumento da demanda de produtos fermentados e à necessidade de opções para os apicultores (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). “Pyments”, um tipo de hidromel fermentado junto com uvas tintas ou brancas, pode ser uma alternativa tanto para a indústria apícola quanto para a indústria vitivinícola da Serra Gaúcha.

Sucos de frutas têm sido usados como aditivos para estimular a fermentação e aprimorar o processo de produção de hidromel, além evidentemente, da obtenção de produtos com características organolépticas peculiares (Gupta e Sharma, 2009). As fermentações com distintas concentrações de adição de mosto de uva Moscato levaram a um aumento significativo na taxa fermentativa em comparação com o mosto de mel. Além disso, a adição de mosto de

uva em mosto de mel, nas diferentes concentrações, aumentou a acidez total dos fermentados, diminuindo a sensação doce resultante da alta concentração de açúcares residuais frequentemente identificada em hidromeis (Pereira *et al* (2013, 2014), trazendo maior equilíbrio em boca (Pangborn *et al.*, 1964; Noordeloos e Nagel, 1972). Quanto às características aromáticas os “Moscatto-pyments” apresentaram concentrações mais equilibradas de compostos caracterizados como florais, frutados e amanteigados, resultando em produtos que dispõem de uma maior complexidade aromática. Os “Moscatto-pyments” exibiram simultaneamente compostos característicos de vinhos elaborados com uvas Moscato e hidromeis, sendo, portanto, um produto particularmente complexo e distinto e representando uma opção tecnológica.

De uma forma geral, este trabalho mostrou as necessidades nutricionais em mosto de mel para uma fermentação vigorosa e suas interações nos parâmetros físico-químicos, assim como permitiu indicar leveduras enológicas com potencial para a produção de hidromel e caracterizou, em termos físico-químicos e aromáticos, um novo produto que pode trazer vantagens econômicas para a indústria apícola e vitivinícola da Serra Gaúcha, “Moscatto-pyments”.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, e atendendo aos seus objetivos específicos, podem-se formular as conclusões apresentadas a seguir.

- A suplementação com nitrogênio, minerais, principalmente potássio, e vitaminas, em menor grau, possuem um importante papel na fermentação e nas características físico-químicas do hidromeis, mostrando interação destes fatores no processo de produção de hidromel. Concentrações de nitrogênio assimilável de 150 mg/L, de 600 mg/L de potássio e a presença de vitaminas possibilitam fermentações rápidas e completas, resultando em hidromeis com baixa concentração de açúcar residual, elevado conteúdo de etanol, biomassa e acidez total equilibrada, mas reduzindo a relação glicerol/etanol.
- Leveduras enológicas apresentam ampla variação na sua demanda de nitrogênio, sendo possível a seleção de leveduras mais adequadas à fermentação de hidromel. Dentre as leveduras avaliadas, três cepas de *S. cerevisiae* var. *bayanus* (QA23, AWRI-R2 e SPARK) e duas de *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* apresentaram baixa demanda de nitrogênio. As cinco leveduras completaram a fermentação de hidromel com 75 mg/L de nitrogênio assimilável por leveduras (YAN). Por outro lado, os hidromeis produzidos apresentaram diferenças significativas em algumas características físico-químicas e na composição de compostos voláteis, resultando em produtos peculiares. A levedura ROUGE apresentou maior produção de biomassa e originou hidromeis com maior conteúdo de etanol e menor conteúdo de açúcares redutores, com concentrações intermediárias de compostos voláteis olfativamente ativos. Por outro lado, SPARK gerou hidromeis com alto conteúdo de álcoois superiores, ácidos graxos voláteis e seus ésteres, enquanto AWRI-R2 produziu hidromeis com maior concentração de acetatos e terpenos. Assim, os resultados permitem concluir que distintas leveduras com baixa demanda de nitrogênio podem atribuir características organolépticas distintas, cabendo ao produtor, com base na sua definição de produto, a escolha da levedura mais adequada.
- A produção de hidromel oferece a opção de incorporar frutas, sucos ou extratos, antes ou após a fermentação. Neste sentido, os resultados mostraram que a adição de mosto de uva Moscato na elaboração de hidromeis “Moscato-pyment” pôde contribuir positivamente para o perfil

fermentativo, solucionando a falta de vigor na fermentação. Além disso, a adição de mosto Moscato (10-30%) aumenta a acidez do produto, equilibrando a doçura decorrente da presença de açúcares não-fermentecíveis presentes no mel. Os “Moscato-pyments” apresentam uma composição de compostos voláteis intermediária entre o hidromel e o vinho Moscato, com contribuição positiva do Moscato em termos de compostos com aromas florais (terpenos) e frutados, e do mel com compostos de aromas amanteigados (ácidos graxos voláteis), aumentando a complexidade e qualidade do produto final, tornando os “Moscato-pyments” uma opção tecnológica e economicamente atraente.

7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Abemel - Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. Disponível em: <http://brazilletsbee.com.br/dados-setoriais.aspx>
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., e Al-Habibi, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res*, 22:1041-1047.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., e Hannan, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *J. Saudi Chem Soc*, 18:618-625.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martínez-Sánchez, G., *et al.* (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem Toxicol*, 50:1508–1516.
- Andrade, R. C. P. *Apicultura – Mundo, Brasil, Paraná*. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2005.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem*. 63:549–562.
- Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., e Fernández Gutiérrez, A. (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresiselectrospray ionization-mass spectrometry. *Pharmaceut Biomed*, 41:1648-1656.
- Baltrusaityte V., Venskutonis P.R., Ceksteryte V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem* 101:502–514.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. S., e Marioli, J. M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Vet Microbiol*, 124:375-381. 35
- Batista, B. L., Da Silva, L. R. S., Rocha, B. A., Rodrigues, J. L., Berretta-Silva, A. A., Bonates, T. O., e Barbosa, F. (2012). Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Res Int*, 49:209-215.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng*, 70:246–252.

- Berry, B. (2007). The global mead market: opportunities for canadian mead exporters. Ottawa, Ontário; Agriculture and Agri-Food Canada.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., e Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr*, 27:677-689.
- Bonté, F., e Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actual Pharm*, 52(531): 18-21
- Brasil. IN nº 24 de 08 de setembro de 2005. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. Revoga a portaria nº 77 de 27 de novembro de 1986.
- Carrasco, P., Querol, A., and del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.* 175:450–457.
- Carvalho, C. A. L. de, Marchini, L. C., Sodré, G. S., Alves, R. M. de O. (2000). Análises de amostras de méis provenientes do recôncavo da Bahia. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS,4., Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 352
- Castro-Vásquez, L., Dáaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., and Pérez-Coello, M. S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chem.* 112:1022–1030.
- Chen, C-H., Wu, Y-L., Lo, D., Wu, M-C. (2013). Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. *J Inst Brew*, 119:303-308.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., e Cabra, P. (1994). Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J Chromatogr A*, 669:59-64.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanellia, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., *et al.* (2011). RP HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83:924–929.
- Crane, E. (Ed.). (1975). Honey: a comprehensive survey (p. 608). London: Heinemann.
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: A model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl Environ Microbiol*, 78: 8102–8111.
- da Azeredo, L.C , Azeredo, M. A. A., De Souza, S. R., e Dutra, V. M. L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem*, 80:249-254.

- Damasia-Gomes L, Faleiro KM, Santos SO, Guimaraes LE, Silva-Neto CM (2015) Physicalchemical characteristics of honey on Brazil. *Enciclop. Biosf.* 11: 670-682.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., e Fennema, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4^a Ed. (Artmed).
- Davies, A.M.C. (1976). The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *Int J Food Sci Technol* 11:515-523.
- de Almeida Anacleto, D., e Marchini, L. C. (2004). Composição físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. provenientes do cerrado paulista. *Boletim de Indústria animal*, 61:161-172
- El Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D., e Shehata, M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Ann Agric Sci.*, 60:279-287.
- Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borra's, M., and Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chem.* 112:329–338.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., e Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem*, 149:84–90.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., e Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem*, 138:851–856.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., e Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol*, 46:3774-3779
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*, 86:11–22.
- Girolamo, F. D., D'amato, A., e Righetti, P. G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *J Proteom*, 75:3688–3693.
- Gonzalez, R., e Morales, P. (2017) Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. *Microb. Biotechn.* 10: 1449-1450.
- Iurlina, M. O., e Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int J Food Microbiol*, 105(3):297-304.
- Lambrecht, M., e Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21: 97-129.

- Lee C.Y., Kime R.W. (1984). The use of honey for clarifying apple juice. *J Apic Res.*, 23:45–49.
- Lengler, S. Pólen apícola. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2 ed., 2002.
- Lutz, I. A. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: ANVISA.
- Madejczyk, M., e Baralkiewicz, D. (2008). Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F AAS/AES. *Anal Chim Acta*, 617:11-17.
- Mato, I. S., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. S., e Sancho, M. T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *J Agric Food Chem*, 54:1541- 1550.
- McConnell, D. S. and Schramm, K. D. (1995). Mead success: Ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring* 4, 33–39.
- McGovern P.E., Zhang J.H., Tang J.G., Zhang Z.Q., Hall G.R., Moreau R.A., Nunez A., Butrym E.D., Richards M.P., Wang C.S., Cheng G.S., Zhao Z.J. (2004). Fermented beverages of pre- and protohistoric China. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:17593–17598
- Mendes-Faia, D. A. (2015). Optimization of mead production: design of different strategies for improvement of alcoholic fermentation. Dissertation, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., & Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int J Food Microbiol*, 144:193-198.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., & Mendes-Faia, A. (2011). Impacto do Azoto na Actividade Fermentativa das Leveduras e na Qualidade do Vinho. *CTV*, 26:17-32.
- Mercado do mel natural: Competitividade nos preços de exportação. *Floresta*, 46:363-370
- Miller, J. (1994). The Bees lees. A Collection of Mead Recipes.
- Moreira, R. F. A., Maria, C. A. B., Pietroluongo, M., e Trugo, L. C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem*, 121:697–704
- Moreti, A. C. de C. C. (2004). Pólen: alimento protéico para as abelhas – complemento alimentar para o homem. Instituto de Zootecnia de São Paulo.
- Mulu, A., Tessema, B., e Derby, F. (2004). In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiop J Health Dev*, 18:107-111.
- National Honey Board (2001). Making mead: the art and the science.

- Nozal, M. J., Bernal, J. L., Gómez, L. A., Higes, M., e Meana, A. (2003). Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34:181–188.
- Olaitan P.B., Adeleke O.E., Ola I.O.(2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.*, 7:159-165.
- Paramás, A. M. G., Bárez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., e Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chem*, 95:148-156.
- Pereira, A. P. (2008). Caracterização de mel com vista a produção de hidromel. Dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., e Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem Toxicol*, 47: 2057-2063.
- Pohl, P., Steck, H., Greda, K., e Jamroz, P. (2012). Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chem*, 134:392–396.
- Pontes, M., Marques, J. C., e Câmara, J. S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 74:91–103.
- Pyrzyska, K. e Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends Anal Chem*, 28:893-902.
- Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A. P., Dias, T., & Estevinho, L. M. (2011). Mead production: Tradition versus modernity. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 63, pp. 101-118). Academic Press.
- Rapp, A. e Mandery, H. (1987): New progress in wine and wine research. *Experientia*. 42:873–884.
- Rebane, R. e Herodes, K. (2010). A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Anal Chim Acta*, 672:79–84.
- Roldán, A., Van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., e Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chem*, 126:574-582
- Rose A. (ed) (1977) *Alcoholic beverages*. Academic, New York

- Solayman, M., Islam, M., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M., Alam, N., e Gan, S. H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15:219-233.
- Steinkraus KH Morse RA Minh HV Mendoza BV Laigo FM (1971). Chemical analysis of honey wines: a brief summary 1900-1971. *Bee World*, Cardiff. 52: 122-127
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., *et al.* (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Ind Crops Prod*, 46: 124–131.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, I.L. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chem*, 127:1072–1083.
- Úbeda, J., Maldonado Gil, M., Chiva, R., Guillamón, J. M., e Briones, A. (2014). Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts in distilleries of the La Mancha region (Spain). *FEMS Yeast Res*, 14:663-673.
- Valbuena, A. O. (1992). Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria. *Dissertação*. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.
- Wintersteen, C.L., Andrae, L.M., Engeseth, N.J. (2005). Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *J Food Sci*, 70:119–126
- Won, S. A., Li, C., Kim, J., e Rhee, H. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chem*, 113:1334–1338.
- Yücel, Y., e Sultanoğlu, P. (2013). Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. *Food chem*, 140:231-237.