



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

THELMA TIRONE SILVÉRIO MATOS

Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho

Belo Horizonte

2021

Thelma Tirone Silvério Matos

Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho

Versão final

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Orientadores: Prof. Carlos Augusto Rosa - Departamento de Microbiologia, UFMG.
Profª. Amparo Querol - Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.

**Belo Horizonte
2021**

043

Matos, Thelma Tirone Silvério.

Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho [manuscrito] / Thelma Tirone Silvério Matos. - 2021.

178 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadores: Prof. Carlos Augusto Rosa. Profa. Amparo Querol.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Cerveja. 3. Aguardente. 4. Vinho. 5. Fermentação. 6. Leveduras. 7. *Saccharomyces*. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Querol, Amparo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **THELMA TIRONE SILVÉRIO MATOS**

Nº REGISTRO: [2017696140](#)

Às 14:00 horas do dia **29 de setembro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Ary Corrêa Junior (Departamento de Microbiologia/ICB /UFMG), Bruno Gonçalves Botelho (Departamento de Química/UFMG), Beatriz Martins Borelli (Faminas-BH), Fátima de Cássia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET) - o Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa – Orientador, para julgar o trabalho final “Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho”, da aluna **Thelma Tirone Silvério Matos**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da Banca:

Dr. Ary Corrêa Junior

Dr. Bruno Gonçalves Botelho

Dra. Beatriz Martins Borelli

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(*Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia*)



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa, Diretor(a) de centro**, em 30/09/2021, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ary Correa Junior, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2021, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Martins Borelli, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 05/10/2021, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fatima de Cassia Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 19:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 25/10/2021, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0964196** e o código CRC **28BD75D2**.

À minha mãe, Maria Rosália,
que é a mulher mais incrível do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida por terem me tornado uma pessoa de uma infinita fé e alegria, que me ensinam a lutar pelos meus sonhos e objetivos com muita garra e dedicação.

Aos meus irmãos Raquel e Jones, meu sobrinho Matheus e principalmente a minha querida mãe Maria Rosália que é meu alicerce e minha inspiração. Amo muito vocês!

Ao meu professor e orientador Carlos Rosa que me recebeu no laboratório há nove anos e assim pude trilhar minha vida acadêmica e trajetória na UFMG. Aos professores Susana Johann e Luiz Rosa que fazem parte do laboratório.

A todos meus amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos. Em especial para Ana Cristina, Ana Luiza, Ana Raquel, Bia, Fábio, Juliana, Luciana, Marina Perbone e Thaís, vocês foram essenciais para que eu conseguisse desenvolver minhas atividades e ter força de vontade para seguir firme.

À professora Amparo Querol e todos os amigos que fiz no Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos. Dani, Dolores, Ana Cris, Carla, Inês, Lainny, Sebastian, Romain, Peris, Roberto, Laura, Javier e Eládio vocês fizeram parte da realização de um sonho. Muito obrigada por todo carinho, amizade e ensinamentos. Sinto muita falta de todos vocês.

Aos meus amigos que participaram da viagem entre o tempo e o espaço, Laura, Paula, Kayo e Mari até hoje me pergunto se tudo foi real. Aos brasileiros que foram minha família no Doutorado Sanduíche, vocês são minha família Valenciana.

Às minhas amigas de caminhada, Polly, Lorem, Gleice, Bella, Bruna, Paola, Bibi, Carol, Cat, Fer e Nandinha muito obrigada por me ensinarem a ser cada dia melhor e obrigada por serem minhas professoras da vida. Amo vocês!!

E com imenso carinho, agradeço a banca examinadora. Beatriz, Bruno, Fátima, Ary, Verônica e Luciano muito obrigada por terem aceitado participar desse momento importante em minha jornada acadêmica.

RESUMO

A cerveja, vinho e cachaça são bebidas produzidas por meio da fermentação e são mundialmente apreciadas. Rotineiramente, produtores e consumidores estão em busca de novos produtos que apresentem melhores características fermentativas e sensoriais. À partir dessa perspectiva, o presente trabalho buscou por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentação espontânea da cachaça para utilizar na produção de cerveja; também trabalhou na obtenção de híbridos entre as linhagens obtidas a partir da fermentação da cachaça e *Saccharomyces kudriavzevii* (utilizada na fermentação de vinho). A busca por linhagens cervejeiras na produção da cachaça resultou na obtenção de três linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar nas temperaturas de 10 e 20°C, produzir baixas concentrações de H₂S, fermentar a maltose e a maltotriose e de suportar as variações estressantes do processo de produção da cerveja, além de apresentarem característica sensorial neutra. Portanto, o processo de fermentação espontânea da cachaça mostrou ser um excelente ambiente para seleção natural de leveduras com potencial na indústria cervejeira. No segundo objetivo do presente trabalho, a obtenção de híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* por meio do cruzamento espontâneo originou linhagens com características melhoradas em relação as parentais. Os híbridos selecionados para a produção de cerveja foram capazes de fermentar a maltotriose, sendo que as linhagens parentais não apresentavam esta habilidade. Ao total foram obtidos 19 híbridos para a produção de cerveja, cachaça e vinho. Alguns dos híbridos apresentaram melhores perfis fermentativos, maior produção de glicerol e etanol e aumento da produção de compostos aromáticos (ésteres e álcoois superiores). As metodologias aplicadas para a busca de linhagens com potencial para a produção de cerveja, cachaça e vinho foram eficientes para a seleção dos isolados que mostraram desempenho adequado para a produção destas bebidas.

Palavras-chave: Cerveja; Cachaça; Vinho; Híbridos; Fermentação; Leveduras; *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces kudriavzevii*.

ABSTRACT

Beer, wine and cachaça are beverages produced by fermentation and are appreciated worldwide. Routinely, producers and consumers are looking for new products that have better fermentation and sensory characteristics. From this perspective, the present work searched for strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermentation of cachaça to be used in beer production also made hybrids obtained between the strains obtained from the fermentation of cachaça and *Saccharomyces kudriavzevii* (used in fermentation of wine). The search for brewing strains in the production of cachaça resulted in obtaining three strains of *S. cerevisiae* capable of fermenting at temperatures of 10 and 20°C, producing low concentrations of H₂S, fermenting maltose and maltotriose and withstanding stressful variations of the beer production process, in addition to having a neutral sensory characteristic. Therefore, the spontaneous fermentation process of cachaça proved to be an excellent environment for natural selection of yeasts with potential in the brewing industry. In the second objective of the present work, obtaining hybrids between *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* by spontaneous crossing resulted in strains with improved characteristics compared to the parental ones. In total, 19 hybrids were obtained for the production of beer, cachaça and wine. Some of the hybrids showed better fermentation profiles, higher glycerol and ethanol production and increased production of aromatic compounds (esters and higher alcohols). The two methodologies applied to search for strains with potential for the production of beer, cachaça and wine were efficient for the selection of isolates that showed adequate performance for the production of beverages.

Keywords: Beer; Cachaça; Wine; Hybrids; Fermentation; Yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces kudriavzevii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico da produção anual de cerveja no mundo (STATISTA, 2019)	26
Figura 2 – Processo de produção de cerveja. Retirado e adaptado de Anton Paar (2019)	29
Figura 3 – Esquema da produção industrial da Cachaça (SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020)	34
Figura 4 – Etapas da produção do vinho (PRETORIUS-ISAK-S, 2000)	35
Figura 5 – Principais compostos aromáticos produzidos dos pela levedura (PIRES et al., 2014).....	40
Figura 6 – A) Exemplo esquemático do suporte da fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) e B) Passos do método por HS-SPME-GC (MAY, 2015)	52
Figura 7 - A – Equação de crescimento de Gompertz; B – Parâmetros da curva de crescimento (ZWIETERING et al., 1990)	53
Figura 8 – Ilustração da fermentação da maltose pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em tubos de ensaio e tubo de Durham	54
Figura 9 – Ilustração da produção de sulfeto de hidrogênio pelos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizados nos presente trabalho	55
Figura 10 – Ilustração do teste de avaliação de tolerância aos estresses	56
Figura 11 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro por meio da fermentação à temperatura de 20°C com as linhagens comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>S. pastorianus</i> e a linhagens de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça	61
Figura 12 - Gráfico do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) pelas linhagens comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>S. pastorianus</i> e as linhagens de <i>S. cerevisiae</i> isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	63
Figura 13 - Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto cervejeiro com as linhagens comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>S. pastorianus</i> e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	65
Figura 14 – Residual de maltotriose (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>S. pastorianus</i> e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	65
Figura 15 - Residual de maltose, glicose e frutose (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	68
Figura 16 - Produção de glicerol (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	69
Figura 17 - Produção de ácido acético (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	70
Figura 18 - Produção etanol (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	71
Figura 19 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) e a linhagem CAY337 isolada de dorna de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C	73
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose confirmando a hibridação da linhagem UFMG-Y223xCA111E2 através da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY ₁ e MAG ₂	88

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose confirmando a hibridação da linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4 por meio da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY ₁ e MAG ₂	91
Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2 utilizando os genes codificadores de proteínas GSY ₁ , KEL e MAG ₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial	93
Figura 23 – Confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2	94
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) utilizando os genes codificadores de proteínas GSY ₁ , KEL e MAG ₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial	96
Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose da estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)	97
Figura 26 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) na temperatura de 10 °C em intervalos de 24 horas	98
Figura 27 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C	99
Figura 28 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 10 °C	100
Figura 29 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C em intervalos de 24 horas	101
Figura 30 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C.	102
Figura 31 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C	103
Figura 32 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C em intervalos de 24 horas	104
Figura 33 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C	105
Figura 34 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 10 °C	106
Figura 35 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C em intervalos de 24 horas	106
Figura 36 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C	107
Figura 37 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C	108
Figura 38 - Residual de maltotriose, maltose, glicose e frutose (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223 xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223 xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223 xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223 xCA111E2(13).....	109
Figura 39 - Produção de glicerol e ácido acético após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13)	110
Figura 40 - Produção de etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13)	111

Figura 41 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13)	114
Figura 42 – Perfis de restrição do DNA mitocondrial das colônias resultantes dos esporos do híbrido CAY1031xCR90F4. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, linhagem parental <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagem parental <i>S. kudriavzevii</i> e as 14 colônias resultantes dos esporos	116
Figura 43 – Confirmação de estabilidade do híbrido CAY1031xCR90F4. A) RAPD-R3 das colônias dos esporos E5 e B7	118
Figura 44 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C em intervalos de 24 horas	119
Figura 45 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C	120
Figura 46 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de cachaça na temperatura de 28 °C	121
Figura 47 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C em intervalos de 24 horas	121
Figura 48 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C	122
Figura 49 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de cachaça na temperatura de 28 °C	124
Figura 50 - Residual de sacarose, glicose e frutose (g / l) no mosto sintético de cachaça após a fermentação utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CAY1031) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5)	125
Figura 51 - Análise da produção de eritritol, glicerol, butanol e etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CAY1031) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5)	126
Figura 52 - Residual de sacarose, glicose e frutose (g / l) no mosto sintético de cachaça após a fermentação utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CMY030) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C).....	128
Figura 53 - Análise da produção de eritritol, glicerol, butanol e etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CMY030) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C).....	129
Figura 54 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CAY1031) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5)	132

Figura 55 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CMY030) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C)	135
Figura 56 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido CIEN5xCR90F4 utilizando os genes codificadores de proteínas GSY ₁ , KEL e MAG ₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial	138
Figura 57 – Confirmação de estabilidade do híbrido CIEN5xCR90F4. A) RAPD-R3 das colônias dos esporos 1A e 1B	140
Figura 58 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido CIEN12TxCR90F4 utilizando os genes codificadores de proteínas GSY ₁ , KEL e MAG ₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial	142
Figura 59 – Confirmação de estabilidade do híbrido CIEN12xCR90F4. A) Inter- δ das colônias 1A e 1B	143
Figura 60 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C em intervalos de 24 horas	144
Figura 61 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C	145
Figura 62 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de vinho utilizando as linhagens na temperatura de 25 °C	145
Figura 63 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C em intervalos de 24 horas	146
Figura 64 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C. CIEN12: linhagem parental de <i>S. cerevisiae</i> ; CR90F4: linhagem parental de <i>S. kudriavzevii</i> e os híbridos: CIEN12xCR90F4 (1A), CIEN12xCR90F4 (1C) e CIEN12xCR90F4 (1D)	147
Figura 65 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de vinho utilizando as linhagens na temperatura de 25 °C	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Threshold</i> e intervalo de concentração de ésteres e álcoois superiores presentes na cerveja <i>lager</i> (PIRES et al., 2014)	41
Tabela 2 - <i>Threshold</i> e intervalo de concentração de ésteres em vinhos (SWIEGERS et al., 2005)	42
Tabela 3 – Listagem de leveduras utilizadas no ensaio de tolerância as variações de temperatura, álcool, glicose e pH	57
Tabela 4 – Média do consumo de açúcares totais pelas linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em mosto cervejeiro incubado na temperatura de 20 °C	59
Tabela 5 – Residual de açúcares, glicerol, ácido acético e etanol (g / l) no final da fermentação do mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça e as linhagens comerciais de <i>S. cerevisiae</i> (T58) e <i>S. pastorianus</i> (W3470) na temperatura de 20 °C	66
Tabela 6 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pela linhagem CAY337 isolada de dorna de fermentação de cachaça	72
Tabela 7 – Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. kudriavzevii</i> utilizadas para o cruzamento espontâneo visando a obtenção de híbridos	82
Tabela 8 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos cervejeiros	89
Tabela 9 – Resumo dos testes para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2	92
Tabela 10 – Caracterização e estabilização do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)	94
Tabela 11 – Híbridos utilizados para a fermentação do mosto cervejeiro em escala laboratorial.....	97
Tabela 12 – Residual de açúcares, glicerol, ácido acético e etanol (g / l) no final da fermentação do mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas na temperatura de 20 °C ..	109
Tabela 13 – Cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CM-Y223) e <i>S. kudriavzevii</i> (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13)	113
Tabela 14 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos para a produção de cachaça	115
Tabela 15 – Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CAY1031xCA111E2	116
Tabela 16 – Híbridos utilizados para a fermentação da cachaça em escala laboratorial	119
Tabela 17 – Cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CAY1031) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5)	124
Tabela 18 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos por linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CMY030) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C)	125
Tabela 19 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CAY1031) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5)	131
Tabela 20 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (UFMG-CMY030) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens	

híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C)	133
Tabela 21 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos para a produção vínica	135
Tabela 22 - Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CIEN5XCR90F4	136
Tabela 23 - Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CIEN12TxCR90F4	142
Tabela 24 – Híbridos utilizados para a fermentação vínica em escala laboratorial	143
Tabela 25 – Residual de açúcares e produção de eritritol, glicerol, butanol, ácido acético (g / l) e etanol (%) no final da fermentação do mosto vínico após a fermentação utilizando as linhagens parentais <i>S. cerevisiae</i> (CIEN5) e <i>S. kudriavzevii</i> (CR90F4) e as linhagens híbridas CIEN5AxCR90F4(1A-1), CIEN5AxCR90F4(1D), CIEN5AxCR90F4(3C) e CIEN5AxCR90F4(7A)	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviaturas

a.C.: antes de Cristo

CO₂: gás carbônico

DNA: ácido desoxirribonucleico

HPLC: *high performance liquid chromatography*

H₂S: sulfeto de hidrogênio

OGM: organismos geneticamente modificados

PCR: reação em cadeia da polimerase

RNA: ácido ribonucleico

v/v: razão volume/volume

p/v: razão peso/volume

Símbolos

°P: graus Plato; 1°P = 1% (m/m) de extrato solúvel

°C: graus Celsius

%: porcentagem

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	21
1.1. Bebidas fermentadas	21
1.2. Gênero <i>Saccharomyces</i> : caracterização, taxonomia e ecologia	23
1.3. Cerveja	26
1.3.1. <i>Tipos de cerveja</i>	27
1.3.2. <i>Produção de cerveja</i>	28
1.4. Cachaça	31
1.4.1. <i>Produção da Cachaça</i>	33
1.5. Vinho.....	35
1.5.1. <i>Produção do Vinho</i>	36
1.6. Compostos aromáticos	39
1.7. Melhoramento da levedura para a produção de cerveja, cachaça e vinho.....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo Geral	46
3.2. Objetivos Específicos.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Microrganismos utilizados para a triagem de novas leveduras cervejeiras.....	48
4.2. Avaliação fisiológica das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	48
4.2.1. <i>Ensaio de fermentação de maltose</i>	48
4.2.2. <i>Análise da produção de sulfeto de hidrogênio</i>	48
4.2.3. <i>Análise da tolerância da levedura em condições de estresse</i>	49
4.3. Mosto utilizados nas fermentações em escala laboratorial.....	49
4.3.1. <i>Mosto de cerveja</i>	49
4.4. Fermentações em escala laboratorial.....	50

4.5.	Determinação de ácidos, açúcares e álcoois do mosto cervejeiro por HPLC.....	51
4.6.	Determinação de compostos aromáticos voláteis por HS-SPME-GC/FID	51
4.7.	Análise estatística.....	53
5.	RESULTADOS.....	54
5.1.	Microrganismos utilizados para a triagem de novas leveduras cervejeiras.....	54
5.2.	Tolerância as variações de pH, glicose, temperatura e álcool.....	56
5.3.	Fermentação em escala laboratorial em mosto cervejeiro.....	59
5.4.	Determinação de ácidos, açúcares e álcoois.....	65
5.5.	Análise em cromatografia gasosa.....	71
6.	DISCUSSÃO.....	74
6.1.	Fermentação da maltose e verificação da produção de H ₂ S.....	74
6.2.	Resistencia aos estresses estudados.....	75
6.3.	Análise dos açúcares consumidos por meio da fermentação em mosto cervejeiro	76
6.4.	Análise da produção de glicerol, ácido acético e etanol.....	77
6.5.	Análise da produção dos compostos aromáticos produzidos pela levedura.....	78
7.	CONCLUSÕES.....	79
8.	MATERIAIS E MÉTODOS	81
8.1.	Microrganismos utilizados para a obtenção de híbridos	81
8.2.	Preservação das leveduras	81
8.3.	Geração de colônias auxotróficas naturais de leveduras parentais.....	81
8.4.	Cruzamento espontâneo “rare-mating”	82
8.5.	Análises moleculares.....	83
8.5.1.	<i>Extração do DNA total.....</i>	83
8.5.2.	<i>Análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição dos produtos de DNA amplificado (PCR-RFLP)</i>	83
8.5.3.	<i>Análise do polimorfismo do fragmento de restrição mitocondrial de DNA (mtDNA-RFLP)</i>	84
8.5.4.	<i>Análise randômica de DNA polimórfico amplificado (RAPD)</i>	84
8.5.5.	<i>Análise da amplificação do DNA polimórfico inter-δ</i>	85
8.6.	Estabilização genética do híbrido.....	85
8.6.1.	<i>Estabilização dos híbridos por meio da esporulação</i>	85

8.6.2.	<i>Estabilização dos híbridos por meio de fermentação</i>	86
8.7.	Mostos utilizados nas fermentações em escala laboratorial.....	86
8.7.1.	<i>Mosto de cerveja</i>	86
8.7.2.	<i>Mosto sintético de cachaça</i>	86
8.7.3.	<i>Mosto sintético de vinho</i>	87
8.8.	Fermentações em escala laboratorial.....	88
9.	RESULTADOS.....	89
9.1.	Híbridos cervejeiros	89
9.1.1.	<i>Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2</i> . 91	
9.1.2.	<i>Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4</i> ... 94	
9.1.3.	<i>Fermentação em escala laboratorial dos híbridos cervejeiros</i>	97
9.1.5.	<i>Análise dos compostos voláteis produzidos pelos híbridos cervejeiro por meio da cromatografia gasosa</i>	111
9.2.	Híbridos de Cachaça.....	115
9.2.1.	<i>Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CAY1031xCA111E2</i>	115
9.2.2.	<i>Produção em escala laboratorial de cachaça</i>	118
9.2.3.	<i>Determinação açúcares e álcoois dos híbridos obtidos para a produção de cachaça</i> 123	
9.2.4.	<i>Análise dos compostos voláteis produzidos pelos híbridos obtidos para a produção de cachaça por meio da cromatografia gasosa</i>	129
9.3.	Híbridos de vinho	136
9.3.1.	<i>Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CIEN5AxCR90F4</i>	136
9.3.2.	<i>Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CIEN12TxCR90F4</i>	141
9.3.3.	<i>Fermentação em escala laboratorial de vinho</i>	143
9.3.4.	<i>Determinação açúcares e álcoois dos híbridos obtidos para a produção de vinho</i>	148
10.	DISCUSSÃO.....	150
10.1.	Mutantes auxotróficos e caracterização dos híbridos.....	150
10.2.	Consumo dos açúcares pelas linhagens híbridas em comparação com as linhagens parentais 151	
10.3.	Compostos produzidos pelos híbridos em comparação com as linhagens parentais.....	154
10.4.	Análise dos compostos aromáticos produzidos pelos híbridos em relação com as linhagens parentais 155	
11.	CONCLUSÕES.....	157

12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
13.	ANEXOS.....	166

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Bebidas fermentadas

O surgimento de bebidas fermentadas está relacionado, aproximadamente, ao mesmo período da domesticação de plantas e animais, e provavelmente algumas linhagens de leveduras, com características favoráveis, também acabaram sendo inconscientemente domesticadas nesse período (LIBKIND et al., 2011; OLANIRAN et al., 2017; WITRICK; PITTS; O'KEEFE, 2020). Essa domesticação ocorreu há cerca de 13.000 anos e é um marco na história da humanidade, permitindo o surgimento de civilizações e os consequentes desenvolvimentos demográficos, tecnológicos e culturais. Além do mais, é a partir da domesticação que vem a maior parte dos alimentos consumidos pela sociedade (DIAMOND, 2002). Apesar da grande importância da domesticação de microrganismos para a produção do pão, queijo, cerveja, vinho, saquê, iogurte, molho de soja e bebidas destiladas, esta domesticação não é tão evidente e compreendida pela população quanto domesticação de animais e plantas (STEENSELS et al., 2019).

Há mais de 10 mil anos antes de Cristo (a. C.) o homem já consumia alimentos fermentados (PRAJAPATI; NAIR, 2003). A fermentação para a produção de alimentos fornece diversos benefícios, como a conservação dos alimentos pela produção de metabólitos que inibem a proliferação de outros microrganismos (PAUL ROSS; MORGAN; HILL, 2002; GAGGIA et al., 2011); aumento da segurança alimentar pela inibição de patógenos microbianos (ADAMS; NICOLAIDES, 1997); melhoramento no valor nutricional (VAN BOEKEL et al., 2010; ANDRADE et al., 2019), além de conferir qualidade sensorial dos alimentos, pela produção de substâncias aromatizantes (SICARD; LEGRAS, 2011).

Bebidas e alimentos fermentados possuem alta relevância nas sociedades devido à importância econômica, cultural e ao desenvolvimento de tecnologias de fermentação, profundamente enraizados em sua história. Arqueólogos encontraram diversas evidências sobre a produção de bebidas fermentadas, sendo a mais antiga de uma bebida fermentada na China há 7.000 a.C (MCGOVERN et al., 2004) e de vinho no Irã e Egito há 6.000 a.C e 3.000 a.C, respectivamente (MCGOVERN et al., 1997; CAVALIERI et al., 2003). Desde então, acredita-se que as tecnologias de fermentação tenham se expandido da Mesopotâmia pelo mundo. Um exemplo é sobre o cultivo da videira e a produção de vinho que se espalharam através do Mar

Mediterrâneo em direção à Grécia (2.000 a.C), Itália (1.000 a.C), Norte da Europa (100 a.C) e América (1.500 a.C) (PRETORIUS-ISAK-S, 2000).

Acredita-se que o processo de produção da cerveja seja tão antigo quanto do vinho. A domesticação da cevada na região do Crescente Fértil levou ao surgimento da cerveja na Suméria, há 6.000 anos (SALAMINI et al., 2002; HORNESEY I, 2003). As bebidas alcoólicas podem ter desempenhado um papel central na formação das sociedades humanas por meio do ato social e dos rituais de beber (SALAMINI et al., 2002) e por fornecer uma fonte de nutrição, remédios e água não contaminada (MCGOVERN, 2009). Embora a transferência de plantas pelo homem tenha favorecido as migrações de patógenos (GALET, 1977), as bebidas fermentadas contém várias propriedades antimicrobianas que as protegem de patógenos, como o baixo pH, baixa concentração de oxigênio e alta concentração de etanol. As cervejas ainda tem o alto teor de dióxido de carbono e a adição de lúpulo, que irão auxiliar na diminuição da possibilidade de uma possível contaminação e posterior dispersão de patógenos (RODHOUSE; CARBONERO, 2017).

A fermentação alcoólica é uma etapa crucial na produção de cerveja, vinho e bebidas destiladas, e essas fermentações são realizadas principalmente por leveduras. Existe uma gama de espécies de leveduras capazes de fermentar o açúcar e transforma-lo em etanol e gás carbônico; entre elas, as pertencentes ao gênero *Saccharomyces* são as mais utilizadas na produção de bioetanol e na indústria de bebidas alcólicas (WENDLAND, 2014). A relação da fermentação com os microrganismos foi estudada cientificamente somente em 1665 por Van Leeuwenhoek e Hooke (GEST, 2004) e em seguida por Louis Pasteur em 1876, que mostrou que a fermentação alcoólica é um processo causado por organismos vivos (PASTEUR, 1876). Após a constatação de que um organismo vivo era responsável pelo processo fermentativo, observou-se um grande enfoque dado à higiene das cervejarias e à manutenção de estoques viáveis de leveduras. Isto culminou no isolamento das primeiras culturas puras de leveduras de cerveja por Emil Hansen da cervejaria Carlsberg em 1883 (MORITZ; MORRIS, 1891).

A identificação da base genética das características selecionadas durante a domesticação, pode esclarecer como os microrganismos surgiram e permaneceram, além de mostrar o caminho para melhorias adicionais. Como as linhagens domesticadas derivam de um subconjunto de populações selvagens, é provável que um gargalo genético tenha causado o desaparecimento de alguns alelos, especialmente em alguns microrganismos que são propagados clonalmente (DAVENPORT, 1974; GALLONE et al., 2016). A diminuição da

biodiversidade com a destruição acelerada dos habitats dificulta a descoberta de genes selvagens de microrganismos domesticados e dificulta os estudos genéticos para determinada linhagem (LIBKIND et al., 2011).

A domesticação de microrganismos tem levado a uma seleção de linhagens de *S. cerevisiae* que se diferenciam diretamente das linhagens selvagens (HAN et al., 2021). A seleção está diretamente relacionada aos fatores de interesse de utilização daquela linhagem, por exemplo, busca-se por linhagens de *S. cerevisiae* para a produção de cerveja que produzam menor quantidade de *off-flavors*. Além disto, estas leveduras devem ser capazes de consumir a maltotriose. Já as linhagens vínicas precisam apresentar uma maior tolerância as variações estressantes da produção do vinho (GALLONE et al., 2016).

1.2. Gênero *Saccharomyces*: caracterização, taxonomia e ecologia

O gênero *Saccharomyces* foi descrito inicialmente por Reess em 1870 (REESS, 1870) e é classificado como fungo ascomiceto pertencente à ordem *Saccharomycetales* e à família *Saccharomycetaceae* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). São microrganismos telemorfos, e em sua forma reprodutiva assexuada observa-se brotamento multilateral com a célula assumindo formatos diversificados tais como globoso, elipsoide ou cilíndrico, podendo haver formação de pseudohifas. O estado sexuado pode ser haplóide ou poliplóide, e a conjugação pode ocorrer entre linhagens sexuais complementares ou, mais comumente, células diplóides que se fundem formando ascas, que contém usualmente quatro ascósporos globosos ou ovais. As leveduras do gênero *Saccharomyces* comumente apresentam fermentação vigorosa, não produzem compostos amiloides, não utilizam nitrato como fonte de nitrogênio e utilizam glicose como fonte preferencial de carbono e energia (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 2011).

Segundo Vaughan-Martini e Martini (2011), o gênero *Saccharomyces* está representado por oito espécies, sendo elas:

1. *Saccharomyces arboricolus* F.-Y. Bai & S.-A. Wang (2008);
2. *Saccharomyces bayanus* Saccardo (1895) – a) *S. bayanus* Saccardo var. *bayanus* (2000); b) *S. bayanus* Saccardo var. *uvarum* Naumov (2000);
3. *Saccharomyces cariocanus* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000);
4. *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (1883);
5. *Saccharomyces kudriavzevii* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000);

6. *Saccharomyces mikatae* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000);
7. *Saccharomyces paradoxus* Bachinskaya (1914);
8. *Saccharomyces pastorianus* E.C. Hansen (1904).

Três novas espécies foram posteriormente propostas. *S. uvarum*, espécie criotolerante fermentadora de vinho (NGUYEN; GAILLARDIN, 2005); *S. eubayanus*, assim denominada devido à similaridade genética em relação a *S. bayanus* (LIBKIND et al., 2011) e *S. jurei*, que foi isolada de casca de carvalho e solo na região de Saint Auban, França (NASEEB et al., 2017). Estudos aprofundados com a levedura cervejeira *lager*, *Saccharomyces pastorianus* (antiga *Saccharomyces carlsbergensis*), desencadearam diferentes estudos que revelaram que *S. pastorianus* não é uma linhagem de levedura “pura”, mas sim, um híbrido entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*. *S. eubayanus* é uma espécie originalmente descoberta na Patagônia, mas posteriormente isolada em outras regiões, como na América do Norte e na China (LIBKIND et al. 2011; BING et al., 2014; PERIS et al., 2014). Embora *S. eubayanus* tenha sido isolado em outras regiões, o número de isolados encontrados é relativamente baixo e estes apresentam baixa diversidade genética. Portanto, estas informações sugerem que a América do Sul é o principal centro de diversificação de *S. pastorianus* (SAMPAIO, 2018). *S. eubayanus* é 99,5% idêntica à porção não *S. cerevisiae* encontrada em *S. pastorianus*, o que sugere mudanças específicas no metabolismo do açúcar e sulfito que foram cruciais para a dominação no ambiente de fabricação de cerveja (LIBKIND et al. 2011). Estudos posteriores mostraram três linhagens distintas de *S. eubayanus* encontradas na região da Patagônia onde foi isolado as primeiras linhagens desta levedura (NESPOLO et al., 2019).

A hibridação inicial ocorreu entre uma célula diploide de *S. cerevisiae* e uma diploide de *S. eubayanus*, o que levou à formação de uma levedura alotetraploide. Isto foi seguido por uma reorganização extensa do genoma por recombinação mitótica, resultando na perda da heterozigosidade e de cromossomos quiméricos recombinantes (GIBSON; LITI, 2015). Quando e em que circunstância ocorreu o processo de hibridação entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* não é conhecido. Embora não haja evidência molecular conclusiva (BAKER et al., 2015), atualmente acredita-se que o híbrido *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* foi formado há quinhentos ou seiscentos anos, quando as leis alemãs obrigaram os fabricantes de cerveja a usarem temperaturas de fermentação mais baixas, promovendo a seleção de híbridos naturais entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* (LIBKIND et al. 2011).

Pode-se especular que *S. eubayanus* surgiu inicialmente como um contaminante, possivelmente com uma vantagem seletiva sobre a levedura nativa *ale*, quando as fermentações eram realizadas sob temperaturas mais frias. A hibridação das duas espécies (presumivelmente a linhagem original de *S. cerevisiae ale* e o contaminante de *S. eubayanus*) teria resultado na criação de um híbrido com a forte capacidade fermentativa da primeira e a tolerância ao frio de *S. eubayanus*. Este híbrido interespecífico teria tido vantagens competitivas sobre as leveduras parentais conduzindo a uma rápida dominação da população fermentativa de leveduras (GIBSON; LITI, 2015).

A levedura *S. cerevisiae* é utilizada em experimentos laboratoriais a mais de um século e tem sido fundamental para entender os aspectos da biologia molecular e genética (LITI, 2015), tornando-se o primeiro microrganismo eucarioto a ter o seu genoma sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). No entanto, somente há uma década os cientistas notaram o pouco que se sabia sobre a ecologia e a história natural desse microrganismo e como essas informações eram importantes para a interpretação de sua biologia (LITI, 2015).

Diante desse fato, vários pesquisadores dedicaram seus estudos para o conhecimento da ecologia desta levedura. Sampaio e Gonçalves (2008) identificaram as espécies *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* em cascas de carvalho em Portugal. Análises de cascas e folhas de árvores, principalmente de *Quercus* spp. e solos de uma reserva natural no sudeste da Pensilvânia, EUA, mostraram uma gama de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus* (SNIEGOWSKI; DOMBROWSKI; FINGERMAN, 2002). No Brasil, a análise de casca de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) mostrou ser um nicho natural de *S. cerevisiae*, além de evidenciar linhagens híbridas de *S. cerevisiae* com linhagens americanas de *Saccharomyces paradoxus* (BARBOSA et al., 2016). *Saccharomyces arboricolus* foi isolado de cascas de árvores da espécie *Quercus fabri* coletadas de diferentes regiões da China (NAUMOV; NAUMOVA; MASNEUF-POMARÈDE, 2010; WANG; BAI, 2008) e a espécie *S. eubayanus* foi isolado em espécies de *Nothofagus* na região da Patagônia (LIBKIND et al., 2011).

S. cerevisiae é isolada em várias localidades no mundo, desde ambientes naturais selvagens aos ambientes fermentativos industriais (LITI et al., 2009; LITI, 2015). O carvalho (*Quercus* spp., família Fagaceae) (SNIEGOWSKI; DOMBROWSKI; FINGERMAN, 2002; SAMPAIO; GONÇALVES, 2008) e a *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) (BARBOSA et al., 2016) representam nichos naturais do gênero *Saccharomyces*. Outras árvores como as da

família Fagaceae (como faia e castanheira), solos e insetos também se apresentaram como fonte para o isolamento das espécies do gênero de *Saccharomyces* (WANG et al., 2012).

1.3. Cerveja

Apesar de vista atualmente como uma bebida alcoólica, a cerveja já exerceu diversas funções sociais históricas, como, por exemplo, uso como oferenda em cerimônias religiosas; prescrita por médicos para curar várias doenças; utilizada como pagamento de salários ou dízimos, e já foi constituinte da dieta alimentar humana, particularmente, na ausência de água potável (GATELY, 2008; HORNSEY, 2012).

A produção de cerveja vem aumentando nos últimos anos e desde o ano de 2011 alcançou uma produção anual superior a 1,9 bilhões de hectolitros (Figura 1) e, esse aumento fez com que a cerveja se tornasse a bebida fermentada mais produzida no mundo (STATISTA, 2019).

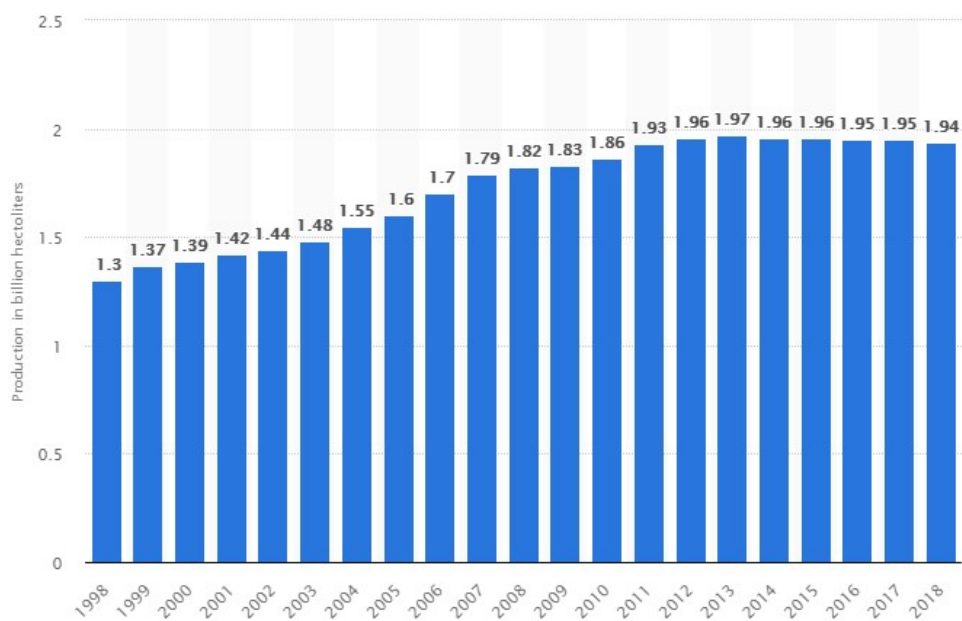


Figura 1 – Gráfico da produção anual de cerveja no mundo (STATISTA, 2019).

Existe uma gama de estilos de cervejas, os quais podem ser diferenciados pela sua natureza e proporções dos materiais utilizados para a fabricação, como água, levedura, cereais, lúpulo e algumas técnicas especiais para melhorar a produção, estocagem e modo de servir. Diante disso, algumas cervejas são diferenciadas em duas grandes famílias, *lager* e *ale*; pode-se variar a concentração de álcool, a torração da cevada, a utilização de outro tipo de cereal que não a cevada, o uso do lúpulo somente como conservante ou para dar sabor diferencial, dentre

outras características. No geral, os estilos de cervejas são variados de acordo com a tradição e experimentação de cada região (WEBB; BEAUMONT, 2012).

1.3.1. Tipos de cerveja

A maioria das cervejas produzidas atualmente são classificadas como cerveja *ale* ou *lager* (o tipo de cerveja *lager* mais conhecido é a Pilsen), sendo que cada tipo é produzido por um processo de fermentação distinto (KODAMA; KIELLAND-BRANDT; HANSEN, 2006; DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016). Para a produção de cerveja *ale* utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta em temperatura relativamente alta, variando de 18 a 25 ° C (KODAMA; KIELLAND-BRANDT; HANSEN, 2006; PREEDY, 2011). Essa levedura tem a característica de permanecer na superfície do mosto durante o processo fermentativo, sendo classificada como de alta fermentação (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010). Essas leveduras cessam a fermentação quando o mosto atinge a concentração de 12% de etanol (DE KEUKELEIRE, 2000). As leveduras *ale* produzem uma elevada concentração de compostos voláteis, conferindo à cerveja um aroma frutado e floral (GIBSON; LITI, 2015).

As leveduras do tipo *lager* sedimentam no fundo do mosto (floculam) após a fermentação, sendo classificadas como de baixa fermentação. São leveduras criotolerantes, com uma temperatura de fermentação variando de 5 a 15 °C, seguido de um armazenamento a frio, “*lagering*”, que é a etapa para lapidar a cerveja dando à ela o sabor e aroma característico desse estilo (DEQUIN; CASAREGOLA, 2011). As leveduras se depositam no fundo do mosto cervejeiro após a produção de cerca de 5% de etanol (DE KEUKELEIRE, 2000; DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016). A levedura *lager* que fermenta esse tipo de cerveja é o *Saccharomyces pastorianus* (anteriormente conhecido como *Saccharomyces carlsbergensis*) (DEQUIN; CASAREGOLA, 2011; GIBSON; LITI, 2015). As cervejas *lager* possuem uma origem mais recente que as cervejas *ale*, porém, representam 90% do mercado cervejeiro (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010; GIBSON; LITI, 2015). A produção de cervejas *lager* foi desenvolvida no século XVIII na Baviera, Alemanha (HORNSEY, 2003).

Saccharomyces pastorianus abrange pelo menos duas linhagens distintas, conhecidas como Saaz e Froberg, que podem ter surgido independentemente (DUNN et al., 2013; MONERAWELA et al., 2015; GALLONE et al., 2018). Os dois tipos de levedura foram nomeados de acordo com o local em que foram utilizadas pela primeira vez, nas regiões da Boêmia da Alemanha. As linhagens foram isoladas por Paul Lindner no final do século XIX (LINDNER, 1909). Esses tipos de leveduras possuem fenótipos e características de fermentação

ligeiramente diferentes. As leveduras do tipo Saaz apresentam uma melhor tolerância às baixas temperaturas, e são incapazes de fermentar maltotriose, o que resulta em um menor multiplicação e consecutivamente, menores taxas de fermentação (WALTHER; HESSELBART; WENDLAND, 2014; MONERAWELA et al., 2015). Adicionalmente, as leveduras do tipo Saaz produzem baixas concentrações de compostos aromáticos, como acetato de etila, álcool isoamílico e acetato de isoamilo, em comparação com as leveduras Froberg que são mais ricas em aromas (DUNN; SHERLOCK, 2008; GIBSON et al., 2013; WALTHER; HESSELBART; WENDLAND, 2014; GALLONE et al., 2018). Estas diferenças fenotípicas podem explicar o porquê das leveduras tipo *lager* Froberg serem geralmente preferidas em relação às leveduras tipo Saaz na indústria cervejeira atual (MERTENS et al., 2015).

A terceira família de cerveja conhecida é a *Lambic*, sendo a produção dessa cerveja feita pela fermentação espontânea de microrganismos. A fermentação ocorre por leveduras *Saccharomyces*, *Dekkera* e bactérias, principalmente as bactérias do ácido lático. Esses microrganismos estão presentes no ar, paredes e equipamentos das cervejarias e, pelo tanque de fermentação permanecer aberto durante todo o processo, esses microrganismos caem no mosto e iniciam a fermentação (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; SPITAEELS et al., 2014; DE ROOS; VANDAMME; DE VUYST, 2018). Essas cervejas são azedas e refrescantes sendo bem apreciadas por parte dos consumidores (KEERSMAECKER, 1996).

1.3.2. Produção de cerveja

De acordo com o decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019, a cerveja é definida como a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro. Os quatro ingredientes essenciais para a produção da cerveja são: água, malte de cevada, lúpulo e a levedura (DE KEUKELEIRE, 2000; STEWART; PRIEST, 2006). Esses ingredientes podem ser utilizados em inúmeras combinações para dar sabores diferenciados à cerveja (SIMONE et al., 2021). O corpo da cerveja é fornecido pela cevada, mais especificamente o malte da cevada. O malte pode ser parcialmente substituído por cereais ricos em amido, tais como arroz, milho ou trigo (STEWART; PRIEST, 2006). O processo geral de produção da cerveja é mostrado na figura 2. Este processo engloba os procedimentos básicos: maltagem, brassagem, fermentação, maturação e envase. Para que ocorra o processo de maltagem, a cevada deve ser submetida à

maceração, germinação, e secagem. Esse processo regula a degradação do amido (por amilases), de proteínas (pela proteólise) e de substâncias estruturais (pela citólise) (STEWART; PRIEST, 2006; MORADO, 2009; PREEDY, 2011; KUNZE, 2014; DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016). Dependendo das condições empregadas (tempo, temperatura), obtêm-se maltes de coloração clara, âmbar ou escura, sendo a cor um resultado da caramelização dos açúcares e das reações de tipo *Maillard*, que é uma reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor, obtendo-se produtos que dão sabor, odor e cor aos alimentos. É importante notar que a cor da cerveja é derivada da cor do malte utilizado (DE KEUKELEIRE, 2000).

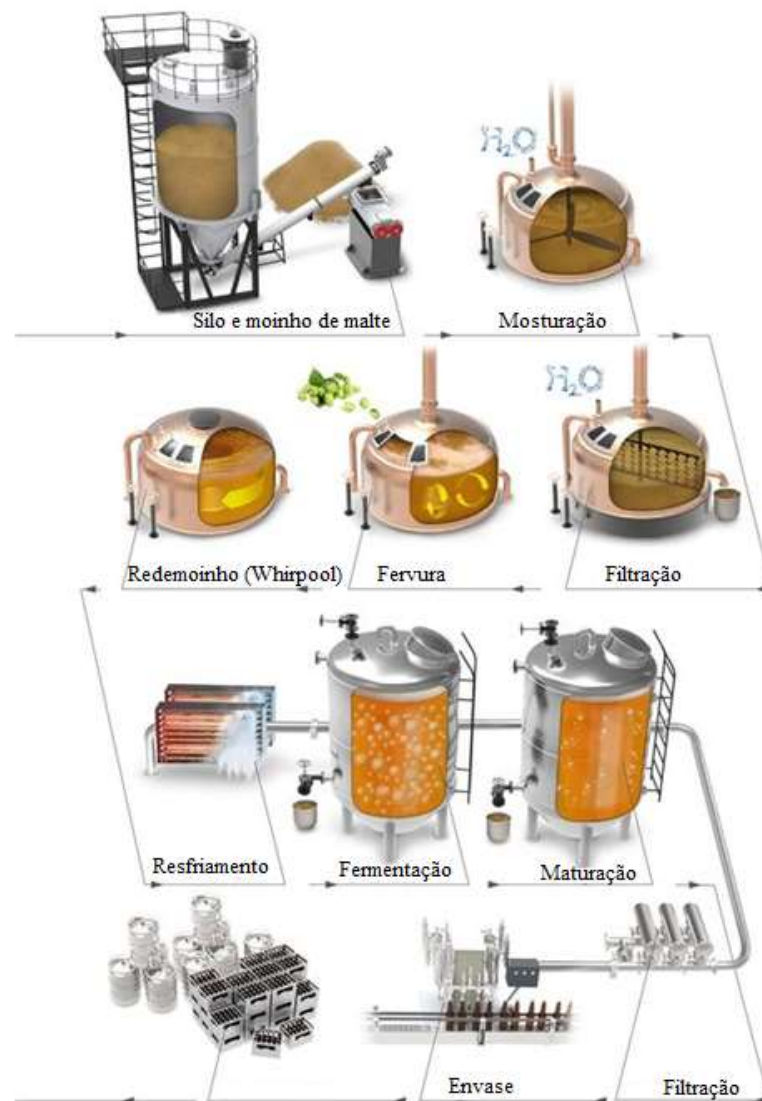


Figura 2 – Processo de produção de cerveja. Retirado e adaptado de Anton Paar (2019).

No processo de brassagem, os grãos maltados são submetidos à sacarificação, filtragem, fervura e lupulagem. Na sacarificação, os grãos são moídos, aumentando a superfície de contato

para a ação das proteases, amilases e peptidases. Adiciona-se água no momento da mosturação, para auxiliar na extração e conversão do malte em açúcares fermentáveis e compostos nitrogenados para nutrição da levedura. Estes processos são regulados pela temperatura, tempo de permanência (repouso) e valor de pH (KUNZE, 2014). Após a sacarificação ocorre a filtração, gerando a parte líquida (mosto) e a parte sólida (malte triturado), que será dispensada. Em seguida, ocorre a fervura do mosto, com a finalidade de se inativar as enzimas dos cereais, além de reduzir uma possível contaminação microbiana. Nessa etapa, o lúpulo é adicionado e a liberação de seus compostos é favorecida pelo aumento da temperatura do mosto (STEWART; PRIEST, 2006; MORADO, 2009; DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016). Durante a fervura, as substâncias aromatizantes indesejadas são evaporadas e ocorre a formação de substâncias que dão cor e sabor à cerveja (KUNZE; 2014). No final do processo de brassagem, o mosto é resfriado, retira-se o lúpulo e, então, o mosto está pronto para receber o inóculo de leveduras.

A quantidade de lúpulo necessária é apenas uma fração da quantidade substancial de malte utilizada nas cervejarias. O lúpulo confere muitas vantagens para a cerveja, como, a estabilização de proteínas e polipeptídeos que contribuem para a estabilidade coloidal da cerveja, estabilidade bacteriológica, o gosto amargo e a estabilização da espuma dessa bebida (DE KEUKELEIRE, 2000; DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016).

Após o resfriamento e aeração do mosto, deve-se misturar rapidamente a levedura para reduzir contaminações por microrganismos indesejáveis. As condições fisiológicas e a quantidade de leveduras são cruciais e podem afetar o desempenho da fermentação e o sabor da cerveja (KANEDA et al., 1992; VERBELEN et al., 2009). A fermentação é o processo da conversão de açúcares presentes no mosto pela ação das leveduras, formando gás carbônico, etanol e compostos secundários (DE KEUKELEIRE, 2000; MORADO, 2009). Os açúcares fermentescíveis, como glicose, sacarose, frutose, maltose, galactose, rafinose e maltotriose, são transportados para o interior da célula da levedura através da membrana e, com isso, ocorre a conversão dos açúcares em produtos. A principal diferença distintiva entre as linhagens *ale* e *lager* é a capacidade da levedura *lager* fermentar a melibiose. A maltose é o principal açúcar do mosto (50 - 55%) seguida pela maltotriose (10-14%) (LODOLO et al., 2008). A fermentação termina quando cessa o consumo de açúcares pelas leveduras, período de atenuação. O tempo da fermentação pode variar conforme a linhagem da levedura utilizada, o conteúdo inicial de açúcares no mosto e a temperatura de fermentação (MORADO, 2009).

Dá-se o nome de “cerveja verde” ao produto da fermentação, que não é pronto para o consumo, uma vez que possui vários compostos indesejáveis, como o diacetil, que são formados durante a fermentação. O diacetil confere sabor amanteigado à cerveja, o qual não é apreciado pelos consumidores. Finalmente, as cervejas necessitam de um período de maturação (chamado de *lagering*) de vários dias a cerca de 0 °C, dando início a um conjunto de reações físico-químicas que contribuirão para melhorar o aspecto, o sabor e o aroma da cerveja. Nesse processo, as leveduras sedimentam e são retiradas pelo processo de filtração e, finalmente, a cerveja é pasteurizada e embalada em barris, garrafas ou latas (STEWART; PRIEST, 2006; MORADO, 2009; KUNZE, 2014).

1.4. Cachaça

A cachaça pode ser considerada a bebida destilada mais antiga das Américas, prestes a completar 500 anos, sendo criada, antes mesmo do Pisco, Tequila e do Rum. Historiadores apontam que a origem da cachaça se deu entre os anos de 1516 e 1532 em algum engenho de açúcar, no início da colonização do Brasil pelos portugueses. Das diversas histórias sobre a origem da cachaça, há duas versões mais aceitas que explicam o início da destilação da cachaça. A primeira relata que os portugueses eram acostumados a tomar a bagaceira, destilado de casca de uva e com isso improvisaram uma bebida destilada a partir da fermentação e destilação de derivados do caldo da cana-de-açúcar, que produzia o mesmo efeito prazeroso do destilado português. A outra versão é que nos engenhos de açúcar, durante o preparo do açúcar, surgia uma espuma que era retirada dos tachos e jogada nos cochos dos animais. Com o tempo, o líquido fermentava e transformava-se num caldo, a que se dava o nome de “cagaça”, que parecia revigorar o gado. Percebendo esses efeitos, os escravos experimentaram e passaram também a bebê-lo. Como os portugueses já conheciam as técnicas de destilação em alambiques, começaram a destilar o mosto fermentado da cagaça, provavelmente também do melaço, subproduto da produção de açúcar, e do próprio caldo de cana dando origem à cachaça – a aguardente de cana brasileira (PERAZOLLI et al., 2013; LIMA, 2017; ROSA; SOARES; FARIA, 2016).

Estima-se que existam 40.000 produtores de cachaça no Brasil, gerando 6.000 empregos diretos, com uma renda anual de US\$2 bilhões, porém, menos de 2.000 produtores de cachaça são devidamente registrados, com 4.000 marcas no Brasil. Esses produtores possuem uma capacidade de produção de aproximadamente 1,2 bilhão de litros anuais da bebida, porém, anualmente são produzidos menos de 800 milhões de litros (MAPA, 2005; LIMA, 2017). A

cachaça é a segunda bebida mais consumida pelos brasileiros e estima-se o consumo de 70 milhões de doses diárias, o que representa, em média, aproximadamente 6 L (habitante ano-L) (LIMA et al., 2006). O aumento do consumo e mercado de destilados tem impulsionado o desenvolvimento de cachaças de qualidade e sofisticadas. Quando comparada com outros destilados, a cachaça de alambique apresenta uma riqueza de características sensoriais (ROSA; SOARES; FARIA, 2016). A qualidade da cachaça requer conhecimentos científicos e tecnológicos apurados, competência, sensibilidade e dedicação (CARDOSO, 1999; DANIEL, 2014; ROSA; SOARES; FARIA, 2016).

De acordo com o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que Regulamenta a Lei nº 8.918, de 1994, que dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e a fiscalização de bebidas, em seu artigo 53, define que cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro ($\leq 6g / l$ de açúcar) (BRASIL, 2019). Atualmente, existem dois tipos de cachaça no Brasil, que são diferenciados pelo processo de destilação utilizado, a “cachaça de coluna” e a cachaça de alambique que representa a maior parcela dos produtores brasileiros da bebida. Geralmente as cachaças de alambique são produzidas em alambiques de cobre. A cachaça de alambique também é conhecida como “cachaça artesanal” devido ao grande número de diferentes receitas utilizadas pelos produtores e da grande dependência da atuação humana no processo (SEBRAE – MG, 2013).

Cachaça foi a primeira bebida brasileira a receber uma Indicação Geográfica do Brasil instituída pelo Decreto nº 4.062 de 2001, elaborado com base no Acordo TRIPS/OMC (Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio, no âmbito da Organização Mundial do Comércio). A cachaça é considerada uma riqueza cultural e diversidade do Brasil e sua produção está distribuída por quase todo o Brasil. Existe uma variedade de sabores e aromas da cachaça e também uma variedade de madeiras utilizadas para envelhecimento da bebida, sendo cada madeira, típica de cada região do Brasil como, por exemplo, a Amburana, Jequitibá, Amendoim, Bálsamo, Ipê, Freijó, Eucalipto, Castanheira, entre várias outras, além do conhecido Carvalho, enaltece e realça sabores riquíssimos e diferenciados na cachaça (LIMA, 2017).

1.4.1. Produção da Cachaça

Há uma variedade de espécies de cana-de-açúcar para a produção da cachaça e, além de uma boa cana conter muito açúcar e adequados teores de nutrientes, também é importante saber sobre a produtividade por área colhida, porte, despalha, teor de fibra, sacarose e curva de maturação. A cana-de-açúcar deve ser colhida crua, despalhada e o tempo entre a colheita e a moagem não deve ultrapassar 36 horas (PESAGRO-RIO, 2008; SEBRAE, 2019). A colheita e o transporte da cana são etapas determinantes da qualidade da cachaça, portanto, quanto mais rápido se utiliza a cana cortada menores são as chances de contaminação por microrganismos deteriorantes. Para o produtor que possui a própria plantação de cana é adequado a moagem no mesmo dia ou até 24 horas após a colheita (SEBRAE, 2019).

A produção de cachaça de alambique está esquematizada na figura 3. De acordo com Soratto, Varvakis e Horii (2007), cada passo na produção da cachaça é crucial para se obter um bom produto. A área de estocagem e moagem da cana-de-açúcar deve ser limpa e protegida de fatores ambientais como, o sol e chuva. Após a moagem é necessário a retirada de impurezas que podem ser prejudiciais ao preparo da cachaça, quanto mais puro for o caldo da cana-de-açúcar, melhor será o processo de fermentação e menor será a chance de contaminação do mosto. Se o caldo apresentar uma concentração elevada de açúcar, é necessário a adição de água potável para diluição do caldo, ou, se o caldo não alcançar a quantidade de Brix adequado, um tratamento térmico é indicado para a concentração do caldo.

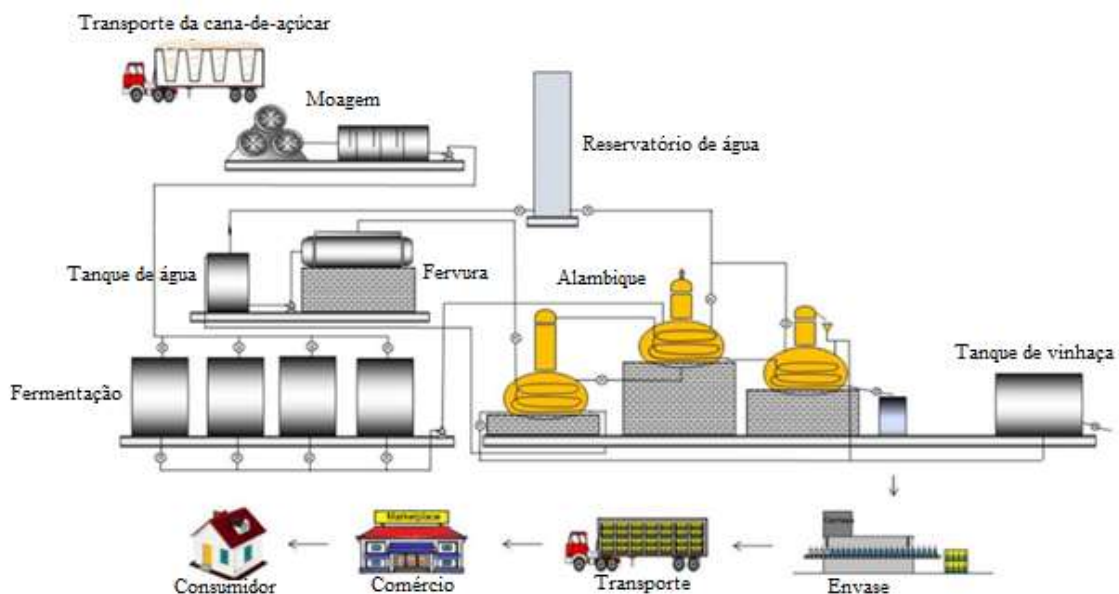


Figura 3 – Esquema da produção industrial da Cachaça (SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020)

Após a obtenção da quantidade necessária de caldo de cana-de-açúcar, essa deve passar pelo processo de fermentação. É nessa etapa que os microrganismos fazem a conversão dos açúcares contidos no caldo de cana em álcool, gás carbônico e subprodutos (MUTTON et al., 2020). Destilarias brasileiras são caracterizadas por produzirem a cachaça por fermentação espontânea por microbiota presentes no mosto fermentativo, em equipamentos ou em instalações, em algumas situações utilizam leveduras de padaria (ROSA; SOARES; FARIA, 2009; FARIA-OLIVEIRA et al., 2015; ROSA; SOARES; FARIA, 2016).

O fermento inicial natural é preparado por vários métodos, incluindo o desenvolvimento da microbiota fermentativa apenas com o uso da cana-de-açúcar ou a mistura do caldo de cana-de-açúcar com milho triturado, arroz ou farelo de soja. Esse processo ocorre dentro do tanque de fermentação e pode durar de 5 a 20 dias, até que a população de leveduras seja suficiente para iniciar o ciclo fermentativo. O caldo de cana-de-açúcar fresco diluído é adicionado a este fermento natural e, após 18-30 horas o mosto fermentado é destilado em alambiques de cobre (ROSA; SOARES; FARIA, 2016). Embora o processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar seja espontâneo, estudos apontam que *Saccharomyces cerevisiae* é predominante na fermentação (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001). No processo clássico da produção de cachaça, é feita a reciclagem do fermento da fermentação anterior para a seguinte. Esse volume consiste em cerca de 17 a 20% do volume útil da dorna de fermentação e recebe o nome de “pé-de-fermentação”. Esse processo diminui o tempo gasto para a propagação do número de células da levedura (SORATTO; VARVAKIS; HORII, 2007).

A etapa de destilação consiste em ferver o vinho resultante da fermentação, produzindo vapores que são condensados por resfriamento, resultando na formação de grande quantidade de etanol. O destilador deve ser de cobre ou aço inoxidável, ser específico para a destilação de cachaça e apresentar o controle de temperatura, pressão e graduação alcoólica do destilado. O produto resultante da destilação pode ser tradicionalmente dividido em três frações: cabeça, coração e cauda. Segundo Maia e Campelo (2006), a cabeça é a primeira fração recolhida na saída do alambique, seu volume corresponde de 0,7% - 1% do destilado e possui grau alcoólico acima de 65 °GL. O coração é a segunda fração, com volume correspondendo entre 80% - 90% do destilado e possui o teor alcóolico entre 38 e 50 °GL; e por último, tem-se a cauda que corresponde de 8% a 10% da fração total do destilado e possui teor alcóolico três vezes menor do que a fração cabeça. A primeira e a última fração (cabeça e cauda) são ricas em substâncias indesejáveis, devendo, portanto, ser eliminadas ou recicladas, pois além de serem prejudiciais à saúde do consumidor, podem comprometer o sabor da cachaça e seu desempenho nos ensaios

de certificação. Saber separar o coração do destilado é um dos principais requisitos para assegurar a pureza e o sabor de uma cachaça de qualidade (ROSA; SOARES; FARIA, 2016)

1.5. Vinho

De acordo com o art. 2º do decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, o vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 2014). O vinho é considerado uma das bebidas mais antigas e populares do mundo e, sua origem está interligada ao início da civilização humana. Registros da produção de vinho são datadas há 5.000 anos a.C. no Egito e na Fenícia (PRETORIUS-ISAK-S, 2000). Há 2.000 anos a.C., o vinho teve uma elevada produção na Grécia e na ilha de Creta e, com a colonização dos Romanos por todo o Mediterrâneo, fez com que se espalhasse também a produção do vinho. Com isso, em 500 anos a.C., o vinho estava sendo produzido na Sicília, Itália, França, Espanha, Portugal e norte da África. O cultivo da videira também se espalhou pelos Estados dos Balcãs, e os romanos a levaram para a Alemanha e outras partes do norte da Europa, chegando até a Grã-Bretanha (ROBINSON, 1994).

O vinho chegou ao Brasil através da colonização portuguesa. Devido à sua importância na liturgia para o sacramento eucarístico e também no consumo dos monges, os colonizadores precisavam do vinho para implantação do catolicismo na colônia. Dados de historiadores contam que a frota de Pedro Alvares Cabral saiu de Lisboa em 9 de março de 1500, rumo às novas descobertas, abastecida de vinho da propriedade que era conhecida como Pera Manca da região do Alentejo (MCCARTHY; EWING-MULLIGAN, 2013). De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), a produção mundial de vinho atingiu, em 2020, 258 milhões de hectolitros, sendo esse valor 1% a mais que em 2019. A Itália é o país com a maior produção de vinhos, 54,8 milhões de hectolitros, seguida pela França (49,1 mhL) e Espanha (44,4 mhL) (JORGE, 2019).

Há informações abrangentes sobre os benefícios do consumo moderado de vinho, com base em seu teor alcoólico e composição polifenólica. Evidências sugerem que o vinho apresenta benefícios na redução dos riscos de doença cardíaca coronária, apresenta características antioxidantes, diminuindo o envelhecimento celular, ação anti-inflamatória e apresentam também melhorias na função cognitiva e aterosclerose entre outras doenças (CHIVA-BLANCH et al., 2013; IVANOVA-PETROPULOS et al., 2015)

O vinho é uma matriz complexa, formada por moléculas de composição variada em diferentes concentrações, como proteínas, aminoácidos, carboidratos, compostos fenólicos, componentes voláteis e compostos inorgânicos. Diversos fatores podem influenciar a composição química do vinho como, as variedades de uva, clima, práticas de viticultura, localização geográfica, colheita, linhagens de leveduras e o processo de fermentação (ALAHÓN; PÉREZ-COELLO; MARINA, 2015). Este conjunto de características e a influência da cultura e tradições locais na produção do vinho é denominado *terroir*, e confere qualidades únicas a vinhos produzidos em diferentes regiões (LEEUEWEN et al., 2010; ALAHÓN; PÉREZ-COELLO & MARINA, 2015).

Os polifenóis são substâncias encontradas na casca, semente e polpa da uva e determinam as características sensoriais da bebida, sendo os principais responsáveis pela diferença entre vinhos tintos e brancos por definirem a cor, amargor e paladar adstringente dessas bebidas (IVANOVA-PETROPULOS et al., 2015; IVANOVA et al., 2011). Além dos polifenóis atuarem na qualidade da uva e vinho, também realizam reações de oxidação, interações com proteínas e no comportamento de envelhecimento do vinho e adicionalmente apresentam ação antimicrobiana para a bebida (IVANOVA *et al.*, 2011; FERREIRA et al., 2016). Em vinhos brancos, os flavonóis são os responsáveis pela pigmentação, conferindo coloração amarelada, enquanto nos vinhos tintos, apesar das antocianinas, afetam a coloração por copigmentação. O acúmulo de antocianinas em variedades de uvas vermelhas inicia o amadurecimento (*véraison*), período no qual as uvas passam por mudanças de tamanho com a ocorrência de crescimento, acúmulo de solutos, aumento da concentração de açúcares e mudanças de cor variando entre amarelo esverdeado para uvas brancas, e vermelho com nuances de azul e lilás para uvas vermelhas (IVANOVA *et al.*, 2011).

1.5.1. Produção do Vinho

A produção do vinho tinto e branco são bastante similares, alterando algumas etapas de produção. Para a produção convencional de vinho tinto (Figura 4), as uvas são colhidas, desengaçadas, esmagadas e então colocadas em tanque de fermentação para que possam ser maceradas (extração dos sólidos - casca, polpa, sementes) e seguido da inoculação de leveduras. A maceração é realizada simultaneamente à fermentação do mosto, a temperatura entre 20 e 30 °C (PRETORIUS-ISAK-S, 2000; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a). Durante o processo, é feito a aeração do mosto para facilitar a multiplicação e propagação das células de leveduras,

além de auxiliar na extração de compostos fenólicos do bagaço e na homogeneização do conteúdo do tanque de fermentação.

Na moderna enologia, usa-se leveduras selecionadas. A adição de leveduras feita após a maceração das uvas ocorre por meio da inoculação de pé de cuba, que consiste em diluir um preparo comercial de leveduras secas ativas em uma quantidade de mosto que represente 2 a 5% do volume total a fermentar, essa concentração de leveduras é em torno de 10^9 células/ mL de mosto. As linhagens de *S. cerevisiae* para a produção de vinho devem apresentar tolerância as variações de concentração de açúcares, capacidade de fermentar frutose, tolerância a elevados teores de dióxido de enxofre, baixa produção de metanol e álcoois superiores, elevada capacidade de floculação, modera produção de acetaldeído a temperatura entre 20 e 30 °C e a capacidade de produção de aromas típicos (GUERRA, 2016).

O monitoramento da etapa de aeração é primordial já que a oxigenação excessiva pode causar reações negativas como, a produção de aromas indesejáveis e deterioração microbiana (crescimento de bactérias ácido-acéticas) (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a; BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008; BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008). Os pigmentos que dão a coloração avermelhada dos vinhos estão localizados na casca da uva, deste modo, uma maceração mais leve e delicada permite a obtenção de vinhos de coloração clara, como os vinhos rosé e os vinhos utilizados para produção de *champagne* (que passam por uma segunda fermentação para a carbonatação, conferindo efervescência). Durante o processo de fermentação do vinho é necessário fazer o controle da gravidade do açúcar consumido pela levedura para o controle de produção de etanol e também o controle de temperatura, para que esta se mantenha adequada para a produção de compostos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a).

A concentração final de açúcar deve ser menor que 2g / l, após a obtenção dessa quantidade de açúcar dá-se início a fermentação secundária, chamada malolática, nesta fermentação ocorre o crescimento de bactérias no mosto fermentado. A fermentação malolática atua na desacidificação do vinho, convertendo o ácido málico em ácido lático e dióxido de carbono, processo este normalmente realizado por bactérias ácido-láticas (*Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., e *Pediococcus* spp.) (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a). No final do processo, o vinho é filtrado para remoção do bagaço e qualquer outra partícula presente e, então, o vinho é armazenado em barris, nos quais ocorre o envelhecimento e engarrafamento (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a).

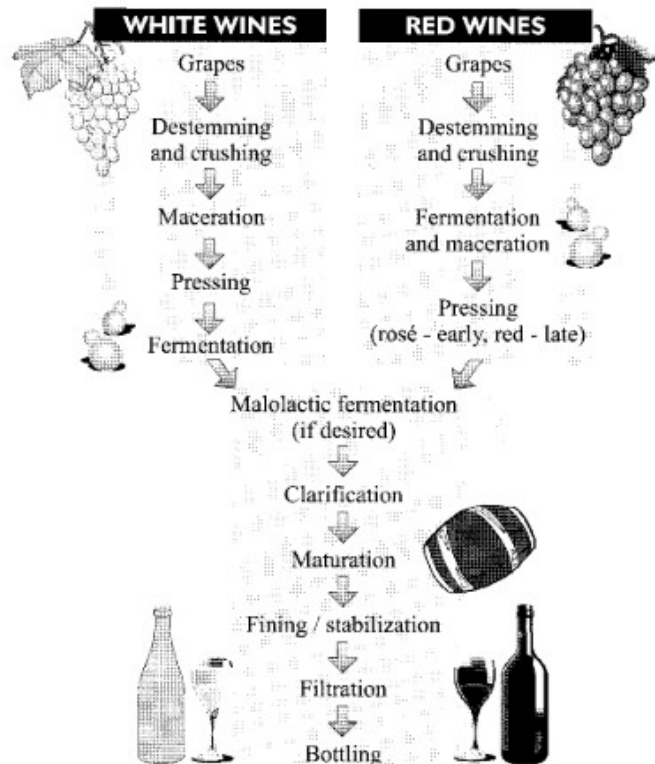


Figura 4 – Etapas da produção do vinho (PRETORIUS-ISAK-S, 2000)

A produção de vinho branco requer a extração do suco da uva e vários processos de clarificação antes do início da fermentação alcoólica, uma vez que a ausência do contato do processo de fermentação com a casca é o que realmente distingue o vinho branco do vinho tinto. A clarificação e remoção de sólidos leva à eliminação de leveduras selvagens presentes na matéria vegetal. Porém, a inoculação de leveduras selecionadas compensa tal perda e favorece a produção de álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres correspondentes. É interessante salientar que vinhos brancos podem ser produzidos a partir de uvas vermelhas quando estas são prensadas em condições adequadas, evitando-se a liberação de antocianinas da casca e consequente coloração do mosto (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a).

Participam do processo de fermentação do mosto da uva diversas espécies de leveduras, bactérias e fungos filamentosos originados de comunidades microbianas presentes na uva e no ambiente de produção. Estas espécies não-*Saccharomyces* são responsáveis por iniciar a fermentação espontânea do mosto da uva, porém, em um curto período de tempo, o crescimento de *S. cerevisiae* ultrapassa o das demais espécies e esta levedura domina o processo fermentativo (FLEET, 2008). Esse fenômeno reflete diversos fatores atribuídos a espécies não-*Saccharomyces*, como baixa capacidade fermentativa, baixa tolerância à limitação de oxigênio e à elevadas concentrações de SO₂ e etanol (MARSIT; DEQUIN, 2015). A utilização de

culturas de *S. cerevisiae* iniciadoras dificulta o crescimento de espécies não-*Saccharomyces*, uma prática favorável ao processo de produção devido ao fato da biomassa formada pelas espécies não-*Saccharomyces* no início da fermentação alterar a composição química final do vinho (FLEET, 2008).

1.6. Compostos aromáticos

O perfil de aroma das bebidas alcoólicas formado durante a fermentação é principalmente atribuído às atividades bioquímicas e metabólicas que ocorrem no interior da célula leveduriforme (figura 5). Os compostos aromáticos produzidos pelas leveduras são intermediários das vias metabólicas de catabolismo dos componentes do meio, como açúcares, compostos nitrogenados e compostos sulfurados, utilizados para produção de fatores necessários para o crescimento celular, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros (PIRES et al., 2014; NEDOVIĆ et al., 2015). Aromas constituem uma grande variedade de compostos voláteis, cuja percepção olfatória varia de acordo com o tipo e a concentração. As características de várias substâncias aromáticas são determinadas por limiares, explicitados a seguir: (i) limiar de percepção: concentração mínima na qual a presença de uma substância odorífica é detectada sem necessariamente a identificação do odor; (ii) limiar de reconhecimento: limiar a partir do qual há a percepção e identificação de um composto odorífico específico; e (iii) limiar de preferência: concentração máxima na qual um composto está presente sem originar um julgamento negativo (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006b).

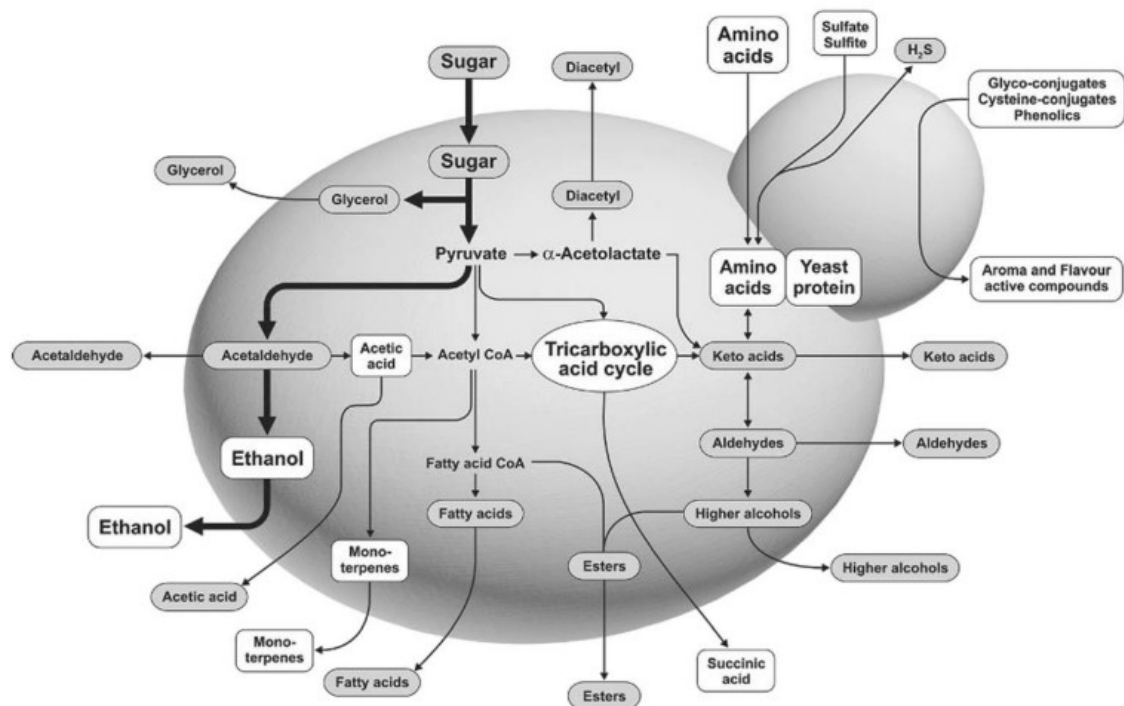


Figura 5 – Principais compostos aromáticos produzidos dos pela levedura (PIRES et al., 2014)

Uma diferença adicional e importante entre as linhagens de leveduras de cerveja *ale* e *lager* está relacionada à capacidade destes microrganismos de produzir diferentes tipos e níveis de compostos aromatizantes. Leveduras *ale* produzem concentrações mais altas de ésteres e álcoois superiores, enquanto leveduras *lager* são reconhecidas por seu "perfil sensorial limpo", isto é, baixo aroma frutado ou floral derivado de éster (KROGERUS et al., 2015a; LIN et al., 2021). A cerveja é uma das bebidas mais agradáveis ao paladar em todo o mundo, cujo sabor e aroma final são resultantes de várias centenas de compostos ativados no decorrer da fabricação da cerveja. Álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais são os elementos-chave produzidos pela levedura que determinarão a qualidade final da cerveja. Embora os álcoois e ésteres superiores sejam constituintes voláteis desejáveis de uma cerveja, as dicetonas vicinais são frequentemente consideradas como *off-flavours* por atribuírem um sabor de manteiga à cerveja. Outros três grupos de compostos químicos que contribuem para o aroma e sabor da cerveja são os ácidos orgânicos, compostos de enxofre e aldeídos (PIRES et al., 2014). Os diferentes aromas e sabores da cerveja são derivados de uma escolha criteriosa das matérias-primas utilizadas em sua produção. Um exemplo é o lúpulo, que além de conferir o amargor na cerveja, também proporciona aroma e sabor à bebida (DE KEUKELEIRE, 2000).

Todos os componentes aromatizantes das bebidas devem ser mantidos dentro de certos limites, caso contrário, um único composto ou grupo de compostos pode predominar e

desequilibrar o perfil sensorial. Por exemplo, enquanto as concentrações de acetato de isoamila (aroma de banana) estão acima do nível limiar na maioria das cervejas *ale*, as *lager* têm normalmente acetato de etila (aroma de solvente) e hexanoato de etila (aroma de maçã) como compostos aromatizantes adicionais (KROGERUS et al., 2015a). A maior parte dos compostos aromáticos frutados incluem particularmente os ésteres que são produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica. Na tabela 1 pode-se observar o limiar de percepção de alguns compostos que caracterizam o aroma das cervejas *lager*.

Tabela 1 – *Threshold* e intervalo de concentração de ésteres e álcoois superiores presentes na cerveja *lager* (PIRES et al., 2014).

Composto	<i>Threshold</i> (mg.L-1)	Intervalo de concentração (mg.L-1)	Aroma
Ésteres de acetato			
Acetato de etila	25-30	8-32	Frutado e solvente
Acetato de isoamila	1,2-2	0,3-3,8	Banana
Acetato de feniletilo	0,2-3,8	0,1-0,73	Rosas e mel
Ésteres etílicos			
Hexanoato de etila	0,2-0,23	0,05-0,21	Maçã e frutado
Octanoato de etila	0,9-1,0	0,04-0,53	Maçã e anis
Álcoois superiores			
n-Propanol	600	4-17	Alcoólico e doce
Isobutanol	100	4-57	Solvente
Álcool isoamílico	50-65	25-123	Alcoólico e banana
Álcool amílico	50-70	7-34	Alcoólico e solvente
2-Feniletanol	40	5-102	Rosas

A escolha da levedura para a produção da bebida é um fator determinante para a concentração final de compostos voláteis. Estudos utilizando o mesmo mosto vínic com diferentes linhagens de leveduras foram capazes de produzir diferente compostos (MOLINA et al., 2009). No vinho os aromas e componentes estimulantes de odor e sabor podem ser formados durante o desenvolvimento da uva antes da colheita (óleos essenciais, aromas frutados e vegetais), por microrganismos presentes no mosto (bactérias ácido-acéticas, bactérias ácido-láticas, fungos filamentosos), pela fermentação alcoólica por leveduras e pelo processamento do vinho (tratamentos térmicos, cozimento, envelhecimento) (SWIEGERS et al., 2005). Os aromas derivados essencialmente da uva são denominados primários ou varietais; os componentes aromáticos produzidos durante a fermentação sob a influência do metabolismo de leveduras são denominados secundários (tabela 2), e os aromas resultantes de transformações durante o processamento final, como por exemplo, no envelhecimento, são denominados terciários ou “*bouquet*” (GONZÁLEZ; MUÑOZ; CARRASCOSA, 2011).

Tabela 2 - *Threshold* e intervalo de concentração de ésteres em vinhos (SWIEGERS et al., 2005).

Composto	<i>Threshold</i> (ppm)	Intervalo de concentração (ppm)	Aroma
Acetato de etila	7,5	22,5-63,5	Frutado e solvente
Acetato de isoamila	0,03	0,1-3,4	Banana e pera
Acetato de isobutil	1,6	0,01-1,6	Frutado e banana
Acetato de feniletila	0,25	0-18,5	Rosas e flores
Acetato de hexilo	0,7	0-4,8	Doce e perfume
Butanoato de etilo	0,02	0,01-1,8	Frutado e floral
Hexanoato de etilo	0,05	0,03-3,4	Maçã verde
Octanoato de etila	0,02	0,05-3,8	Solvente e maçã
Decanoato de etilo	0,2	0-2,1	Solvente e floral

1.7. Melhoria da levedura para a produção de cerveja, cachaça e vinho

Nem sempre o uso de uma única levedura alcança os objetivos finais desejáveis de sabor e aroma da bebida. Dessa forma, podem ser empreendidas outras vias para melhorar a capacidade fermentativa das linhagens de leveduras. Existem dois grandes objetivos no desenvolvimento de leveduras na indústria cervejeira: melhorar a eficiência do processo de produção e obter um produto final de boa qualidade (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010). O melhoramento genético dos microrganismos industriais raramente é baseado na reprodução tradicional, seja porque o microrganismo não possui um ciclo sexual, é de difícil manipulação ou porque existem estratégias mais rápidas e baratas de melhoria das linhagens. Embora existam centenas de culturas iniciadoras comercialmente disponíveis, produtores e consumidores pressionam continuamente por novas variedades de leveduras melhoradas capazes de produzir produtos distintos e específicos (CEBOLLERO et al., 2007). A indústria de alimentos e bebidas tem procurado por produtos que auxiliam a saúde humana. Por exemplo, indústria de cerveja tem investido em pesquisas focadas na produção de cervejas com menos álcool e açúcar (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010).

A característica limpa, e refrescante e o aroma das cervejas *lager* são alguns dos seus traços mais distintivos e elogiados, porém, a diversificação e diferenciação tornaram-se cada vez mais importantes no mercado de hoje. O desenvolvimento de novos híbridos *lager* pode ajudar a gerar um conjunto de cervejas distintas que utilizam as características aromáticas das cervejas *ale* e o sabor e aroma refrescante das *lager* (GIBSON; LITI, 2015; GIBSON et al., 2013; KROGERUS et al., 2015). Há uma vasta produção de híbridos para a vinificação e estudos mostraram que a hibridação entre duas linhagens de *S. cerevisiae* (PÉREZ-TRAVÉS;

QUEROL; PÉREZ-TORRADO, 2016) e entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (PÉREZ-TRAVÉS; QUEROL; PÉREZ-TORRADO, 2016), apresentaram um melhor desempenho de fermentação e ocorreu a superprodução de manoproteínas, que tem a função de reduzir a adstringência da bebida, reter compostos aromáticos e estimular o crescimento de bactérias do ácido-lático. Híbridos entre *S. uvarum* e *S. kudriavzevii*, produziram vinhos com baixo teor alcoólico, maior concentração de glicerol (PÉREZ-TORRADO; BARRIO; QUEROL, 2018), bom desempenho fermentativo, maior tolerância ao etanol e alta produção de glicerol e aroma (LAIRÓN-PERIS et al., 2020).

O desenvolvimento de híbridos interespecíficos já foi realizado para a produção de vinhos, a partir de cruzamentos de um isolado industrial de *S. cerevisiae* com isolados não-*cerevisiae*, como *S. bayanus* (SATO et al., 2002), *S. kudriavzevii* (PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012), *S. uvarum* (DUNN et al., 2013) ou *S. mikatae* (BELLON et al., 2013). Mertens e colaboradores (2015) realizaram o cruzamento entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* para a produção de cerveja, a partir do qual o híbrido gerado apresentou boa fermentação em escala laboratorial para a produção de cervejas tipo *lager*, produzindo maior quantidade de etanol em comparação com as leveduras parentais. Krogerus e colaboradores (2015) também obtiveram um híbrido entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* com características fermentativas melhores que as leveduras parentais. Hibridação intraespecífica foram obtidas entre linhagens de *S. cerevisiae* para a produção de cervejas e apresentaram resistências a fermentação em baixas temperaturas melhores que as linhagens parentais (FIGUEIREDO et al., 2017).

O híbrido mais comum e utilizado na produção de cerveja é o *S. pastorianus*, porém, outros híbridos foram isolados em ambientes de fabricação de cerveja, como híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* de cervejas Trappistas belgas (PERIS et al., 2012) ou híbridos de *Saccharomyces bayanus* (*S. eubayanus* x *S. uvarum*) isolados como contaminantes de cerveja (NGUYEN et al., 2011). Em um estudo em que foi realizado o sequenciamento genético de mais de 200 leveduras isoladas a partir de meio industrial, cerca de 25% das leveduras foram identificadas como híbridos interespecíficos derivados de quatro espécies parentais: *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* e *S. eubayanus* (GALLONE et al., 2019). A partir da descoberta de híbridos naturais como modelos, novos híbridos sintéticos interespecíficos estão sendo construídos em laboratórios para combinar os fenótipos desejados das linhagens parentais em uma única linhagem filha (IATTICI; CATALLO; SOLIERI, 2020). A possibilidade de manipulação celular permite a obtenção de linhagens com as características desejáveis para a produção de bebidas fermentadas e o arranjo das características apresentadas

pelas linhagens pode ser trabalhada de acordo com o objetivo final (ALPERSTEIN et al., 2020; GIANNAKOU et al., 2021). Em relação as linhagens parentais, os híbridos interespecíficos geralmente apresentam sinergia da heterose, também chamada de vigor híbrido, que é a capacidade de superar as linhagens parentais no desempenho fermentativo; melhoria na tolerância osmótica e melhoramento na capacidade de suportar os efeitos estressantes do processo de produção (GIUDICI et al., 2005).

As abordagens mais comuns para realizar a hibridação é por meio do cruzamento por meio de protoplastos, cruzamento espontâneo e o cruzamento esporo a esporo (SIPICZKI, 2008). A seleção do método de hibridação a ser empregado depende da futura utilização do híbrido gerado, uma vez que os organismos geneticamente modificados (OGM) gera uma preocupação pública e não são aceitos na indústria alimentícia pelas legislações em vigor em diferentes países, incluindo o Brasil (CEBOLLERO et al., 2007; STEENSELS et al., 2014). OGM, segundo o art. 3º, inciso V, da Lei Federal brasileira nº 11.105, de 24 de março de 2005, é o organismo cujo material genético (DNA/RNA) foi modificado por qualquer técnica de engenharia genética. O cruzamento clássico por meio do cruzamento espontâneo e o cruzamento esporo a esporo, se baseia apenas no cruzamento natural e não na modificação genética, com isso, os híbridos interespecíficos gerados não são considerados OGM e podem ser utilizados sem restrições pela indústria de bebidas (MERTENS et al., 2015).

As leveduras do tipo *lager* possuem genomas aloploplóides (e às vezes aneuplóides) que apresentam uma capacidade de esporulação muito fraca e um baixo grau de viabilidade dos esporos (NEVOIGT, 2008). No geral, leveduras utilizadas na fermentação cervejeira são poliplóides ou aneuplóides, com 3 ou 4 cópias de cada cromossomo (HAMMOND, 1996; CODÓN; BENÍTEZ; KORHOLA, 1998). Acredita-se que a multiplicidade de cópias do gene faz com que a levedura seja mais estável (CASEY, 1990), e pode haver um aumento da produção de enzimas que conduz a um metabolismo mais rápido de componentes do mosto (HAMMOND, 1996). Além disso, as leveduras *lager* industriais são homotáticas, o que torna difícil obter haploides estáveis para cruzamento. Apesar das limitações, estudos recentes têm conseguido a hibridação para o melhoramento das leveduras (KROGERUS et al., 2015; MERTENS et al., 2015; PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012). Adicionalmente, a prática de reciclar a levedura em vários ciclos de fermentação é comum na indústria, e com isso, é primordial que estas leveduras permaneçam geneticamente estáveis durante todo o processo.

2. JUSTIFICATIVA

O mercado de bebidas alcoólicas é bastante promissor e os consumidores têm continuamente buscado por produtos diferenciados que agradem tanto ao paladar com aromas e sabores diferenciados, quanto características benéficas para a saúde. A produção da cerveja e vinho é feita com linhagens de leveduras importadas e não existe ainda um banco de linhagens de leveduras nacionais para comercialização. A importação de leveduras encarece a produção de alimentos fermentados e representa aproximadamente 10% do custo de produção. A produção de cachaça ocorre principalmente por fermentação espontânea e esse processo dificulta a padronização da qualidade do produto final entre uma safra e outra. Diante desses fatos, a busca por linhagens de *S. cerevisiae* brasileiras com boas características para a produção de cerveja pode favorecer o mercado cervejeiro e diminuir os gastos com a importação do fermento. Além disso, o processo de hibridação para o melhoramento das linhagens pode agregar ainda mais qualidade para a cerveja, cachaça e vinho fazendo com que a linhagem apresente características relevantes das duas linhagens parentais. Com a obtenção destas linhagens ocorrerá a diminuição da importação e com isso a diminuição de gastos, seleção de linhagens que produzam compostos aromáticos e sabores específicos. Além disso, essas linhagens podem apresentar vigor fermentativo e produzir menores quantidades de compostos indesejáveis.

O processo de hibridação entre as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriazevii* foi executado anteriormente e os estudos mostraram que os híbridos gerados apresentaram características melhoradas em relação às leveduras parentais na produção de vinhos e cervejas. Diante dessas informações, além da seleção de uma linhagem brasileira de *S. cerevisiae* diminuir os custos com a importação, a produção dos híbridos auxiliará no melhoramento dessas linhagens e também o híbrido obtido poderá ser patentado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Selecionar linhagens de *S. cerevisiae* para a produção de cerveja e híbridos entre *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* capazes de produzir cerveja, cachaça e vinho de alta qualidade sensorial.

3.2. Objetivos Específicos

1. Selecionar linhagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir de dornas de fermentação de cachaça que sejam capazes de produzir cervejas;
2. Selecionar linhagens de *S. cerevisiae* com melhor perfil fermentativo, tolerância a estresses osmóticos, variações de temperatura e pH e, produção e tolerância ao etanol para que assim sejam capazes de suportar o processo de produção da cerveja;
3. Realizar o cruzamento espontâneo (*rare-mating*) entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* para a obtenção de híbridos para produção de cerveja, cachaça e vinho;
4. Executar fermentações em escala laboratorial para selecionar as linhagens com melhores perfis fermentativos e que apresentem melhores perfis aromático para produção de cerveja, cachaça e vinho.

I

Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial para a produção de cerveja

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos utilizados para a triagem de novas leveduras cervejeiras

Todos os microrganismos utilizados para a triagem estão depositados na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG. Ao todo, 840 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de dorna de fermentação de cachaça do estado de Minas Gerais, foram triadas para a busca de linhagens com características para a produção de cerveja. As coletas foram realizadas entre os anos de 1995 e 1999.

4.2. Avaliação fisiológica das linhagens de *S. cerevisiae*

4.2.1. Ensaio de fermentação de maltose

Previamente às demais análises, as leveduras isoladas em dornas de fermentação de cachaça foram submetidas ao teste de fermentação da maltose como descrito por Montandon (2016). A fermentação foi realizada em tubos de ensaio (com tubos de Durham invertidos em seu interior) contendo 5 ml de meio mínimo suplementado com maltose (p/v: peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, maltose 6%). O inóculo das leveduras para o experimento foi de 10^6 células.ml⁻¹ e incubados às temperaturas de 10 e 20 °C. A fermentação da maltose foi avaliada até o 12º dia de fermentação por meio de observação da formação de gás no interior dos tubos de Durham. Os resultados foram considerados positivos quando os tubos de Durham ficaram preenchidos com gás em ambas as temperaturas testadas. As linhagens de *S. cerevisiae* T58 (*ale*) e *S. pastorianus* W3470 (*lager*) foram utilizadas como controles de leveduras comerciais e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.2. Análise da produção de sulfeto de hidrogênio

O teste qualitativo para a verificação da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi realizado de acordo com Romano e colaboradores (1976) com algumas adaptações. As leveduras testadas foram crescidas em caldo YPD (p/v: extrato de levedura 0,5%, peptona bacteriológica 0,5%, glicose 2% e ágar 2%) a 25 °C por 24 horas e em seguida, o inóculo foi ajustado para um valor de 0,3 de absorvância a 655_{nm}. Aliquotas de 5 µL do inóculo foram plaqueadas em um meio diferencial com indicador contendo bismuto (Difco Bismuth Sulfite Agar) e incubadas a 25 °C por 6 dias. A produção de H₂S foi revelada pelo escurecimento das colônias seguindo o padrão de leitura de Araújo e colaboradores (2018) onde, colônias sem escurecimento foram consideradas como teste negativo (-), baixo escurecimento (+), alto (++)

e muito alto (+++). As leveduras comerciais *S. cerevisiae* WB-06 e *S. cerevisiae* US-05 (Fermentis) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.3. Análise da tolerância da levedura em condições de estresse

A análise de tolerância das leveduras em distintas condições foi feita de acordo com Belloch e colaboradores (2008) com algumas modificações. As leveduras foram previamente crescidas em meio YPD por 48 horas a 25 °C. Em seguida, uma pequena alçada da levedura foi inoculada em 5 ml de caldo YPD e incubada a 25 °C por toda a noite sob agitação. No dia seguinte, as culturas foram ajustadas a 655_{nm} para uma DO de 0,3 de absorbância em caldo YPD e incubadas novamente sob agitação durante 4 horas a 25 °C. Após incubação de 4 horas, o inóculo foi novamente ajustado a 655_{nm} para uma DO de 0,3 de absorbância e em seguida foi feito 5 diluições seriadas. Foram estudados quatro fatores de estresse considerados relevantes na fermentação da cerveja: pH, glicose, temperatura e etanol. Para cada fator de estresse foram testadas diferentes condições: pH (2,5, 3 e 4), glicose (p/v: 20%, 25%, 30%), temperaturas (10, 16, 25, 30 e 42 °C), etanol (5%, 8%, 10%, 12%, 15% e 20%). Os meios contendo os fatores de estresse foram preparados em meio YPD suplementado com as quantidades adequadas de etanol e glicose. Para a avaliação de tolerância em diferentes pHs, o pH do meio YPD foi ajustado de acordo com o desejado e para as variações de temperatura, foi feita a incubação das placas nas temperaturas pré-determinadas. Alíquotas de 5 µL do inóculo e de suas respectivas diluições foram plaqueadas com uma pipeta multicanal. Todas as placas foram incubadas a 25 °C, com exceção das placas do teste de estresse de temperatura. Um controle de crescimento das leveduras foi realizado e incubado a 25 °C. O crescimento das colônias foi visualmente avaliado entre 1 e 5 dias até o crescimento das colônias em todas as diluições. Os testes foram realizados em triplicata para confirmação dos resultados.

4.3. Mosto utilizados nas fermentações em escala laboratorial

4.3.1. Mosto de cerveja

A preparação do mosto cervejeiro foi feita de acordo com Holt e colaboradores (2018) com algumas modificações. O mosto foi preparado a base de extrato de malte (p/v: 22% de extrato de malte - Brewferm spraymalt 8 EBC, Brouwland, Bélgica) e suplementado com 0,5mg.l⁻¹ de ZnSO₄. O pH foi ajustado para 5,0 com ácido láctico. O mosto foi autoclavado a 110 °C por 15 minutos e filtrado através de um filtro de nylon para remover precipitados

insolúveis. Após a filtração, foram adicionados 25 mg.l⁻¹ de extrato de iso- α -ácido (ISOHOP® Botanix Barth Hass). A densidade do mosto foi ajustada para 16 °P (1°P corresponde a um grama de extrato de malte por 100g de solução) utilizando o densímetro Anton Paar® Density meter (DMA 35N).

4.4. Fermentações em escala laboratorial

As fermentações foram feitas como proposto por Pérez-Través (2015), com modificações. As fermentações foram realizadas em frascos com rosca com capacidade de 100 ml (Smuayc). Um volume de 70 ml de mosto foi utilizado em cada frasco. Os frascos foram tampados com um tampão de silicone que continha uma válvula Muller para liberação de gás carbônico. As fermentações foram feitas com as leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça e os controles de leveduras comerciais. Também foram feitas as fermentações em escala laboratorial com as linhagens parentais e seus híbridos. Nessas fermentações foi possível fazer a comparação da velocidade de fermentação, consumo de açúcares e produção de compostos secundários. Para a preparação do inóculo, as leveduras foram pré-cultivadas em 50 ml de YPD a 25 °C por 24 horas e em seguida, o YPD foi descartado e as leveduras ressuspensas em 5 ml de mosto (de acordo com cada bebida).

As fermentações de cerveja e cachaça foram iniciadas inoculando 10⁶ células.ml⁻¹. Para calcular o volume de células a ser inoculado no mosto, a concentração do inóculo foi ajustada usando um espectrofotômetro MUSE Cell Analyser (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA). Para as fermentações em mosto de cerveja, os frascos foram incubados nas temperaturas de 10 e 20°C, já as fermentações de cachaça foram incubadas a 28 °C. As fermentações foram incubadas sob agitação a 100 xg em agitador orbital digital (Shaker DOS-20L, ELMI, Calabasas, Califórnia, EUA). Para as fermentações de vinho, as fermentações foram iniciadas inoculando 2x10⁶ células.ml⁻¹, correspondendo a um valor de densidade óptica a 600 nm (OD600) igual a 0,2, usando um espectrofotômetro UV-Vis (UVmini-1240; Shimadzu, Kyoto, Japão). As fermentações de vinho foram incubadas a temperatura de 25 °C sob agitação a 120 xg. O progresso das fermentações foi medido pela perda de peso observado através do consumo de açúcares e liberação de gás carbônico (CO₂) que é produzido durante a fermentação. Para este fim, os frascos foram pesados uma vez por dia usando uma balança analítica (Sartorius BP121S, Merck, Darmstadt, Alemanha). As fermentações foram consideradas finalizadas quando não observado a variação de peso do frasco devido ao consumo de açúcares pelas leveduras. Quando a variação de peso era menor que 0,2 g por três dias consecutivos ou quando

havia se passado 400 horas, a fermentação era considerado como finalizada. No final da fermentação foram retiradas alíquotas de 15 ml para análise em cromatografia líquida HPLC e cromatografia gasosa (GC).

4.5. Determinação de ácidos, açúcares e álcoois do mosto cervejeiro por HPLC

As concentrações de açúcares, ácidos e álcoois das fermentações do mosto de cerveja foram determinadas por um cromatógrafo líquido (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com coluna HyperREZTM XP Carbohydrate H + 8 μ m (Thermo Fisher Scientific) equipada com um HyperRETZM XP Carbohydrate Guard (Thermo Fisher Scientific). Os açúcares e álcoois foram detectados por um detector de índice de refração e os ácidos por um detector de Ultravioleta (UV). Para a análise, as amostras de cerveja foram diluídas em 1:2 e as de vinho e cachaça foram diluídas em 1:3 e em seguida, as amostras foram filtradas através de um filtro de nylon de 0,22 μ m. As condições de análise foram: 1,5 mM de H₂SO₄, fluxo de 0,6 ml / min, pressão de 35 bar e temperatura do forno de 50 ° C. As concentrações dos compostos analisados foram dadas em g / l e determinadas usando curvas de calibração dos compostos padrão correspondentes e dadas com a média de três fermentações independentes. Os compostos analisados em ordem de eluição foram: glicose, frutose, eritritol, glicerol, 2-, 3-butanodiol e etanol com detector de índice de refração e ácido α -cetoglutárico, ácido succínico e ácido acético com detector UV. Para a detecção da sacarose nas fermentações de cachaça, foi utilizada a coluna HyperREZ XP lead 8 μ m (Thermo Fisher Scientific) com o detector de índice de refração.

4.6. Determinação de compostos aromáticos voláteis por HS-SPME-GC/FID

Os álcoois e ésteres superiores produzidos durante a fermentação foram extraídos e analisados pelo método HS-SPME-GC / FID (figura 6) (cromatografia a gás com micro-extração em fase sólida por Headspace) de Stribny e colaboradores (2015). Para a determinação dos compostos, utilizou-se um cromatógrafo a gás Thermo Science TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com um detector de ionização por chama (FID) e uma coluna capilar HP INNOWax de 30m x 0,25m, revestida com uma camada de polietileno glicol (Agilent, Santa Clara, EUA). As amostras foram centrifugadas a 4000 xg por 10 minutos para remover as células de leveduras e 1,5 ml do sobrenadante foi colocado em um frasco de 12 ml contendo 0,35 g de NaCl e em seguida, foi adicionado 20 μ L do padrão interno (2-Heptanona 0,005% p / v) para a quantificação dos compostos. Os frascos foram fechados com uma tampa de rosca com septo de silicone (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Para que se pudesse criar um

equilíbrio entre os compostos voláteis na fase líquida e na fase gasosa, cada amostra foi agitada por duas horas com o auxílio de um agitador magnético. Em seguida, o septo de silicone que havia na tampa do frasco foi perfurado por uma agulha externa e a fibra de 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) (Supelco, Sigma-Aldrich, Espanha) foi introduzida e exposta por sete minutos, de modo que uma parte dos compostos voláteis puderam ser absorvidos pela fibra. Esta foi, então, injetado na porta de entrada do GC que mantinha uma temperatura de 220 $^{\circ}\text{C}$, com um fluxo de hélio de 1 mL por minuto. A fibra permaneceu exposta por quatro minutos para que os analitos pudessem se dissolver. O programa de temperatura para a corrida foi de 5 minutos a 35 $^{\circ}\text{C}$, onde a temperatura foi aumentando 2 $^{\circ}\text{C}$ por minuto até alcançar a temperatura de 150 $^{\circ}\text{C}$, seguido de um novo aumento de temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$ por minuto até 250 $^{\circ}\text{C}$, onde permaneceu por 2 minutos e a temperatura do detector foi de 300 $^{\circ}\text{C}$. As concentrações dos compostos voláteis em mg / L foram determinadas usando curvas de calibração dos compostos voláteis padrão correspondentes e são dadas como a média de duas fermentações independentes. Os compostos analisados em ordem de eluição foram: acetato de etila, isobutanol, acetato de isoamil, álcool isoamil, caproato de etila (hexanoato de etila), caprilato de etila (octanoato de etila), caprato de etila (decanoato de etila), acetato de 2-fenil-etila e 2-feniletanol.

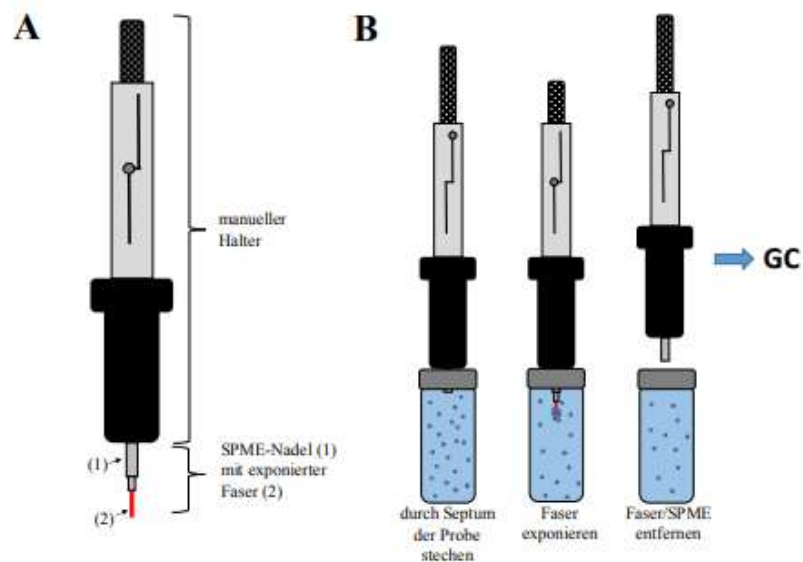


Figura 6 – A) Exemplo esquemático do suporte da fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) e B) Passos do método por HS-SPME-GC (MAY, 2015).

4.7. Análise estatística

As curvas de crescimento dos testes de fermentação foram ajustadas de acordo com o modelo matemático de uma regressão não linear de Gompertz, como proposto por Zwietering e colaboradores (1990). Os parâmetros λ , μ_m e A (figura 7) da equação resultante pode ser interpretada biologicamente como a fase Lag (λ), que descreve o período de tempo antes do início do crescimento exponencial. O (μ_m) representa a taxa máxima de crescimento e o (A) o valor-y assintótico máximo (A), no qual a taxa de crescimento específico atinge zero.

$$\text{A} \quad y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

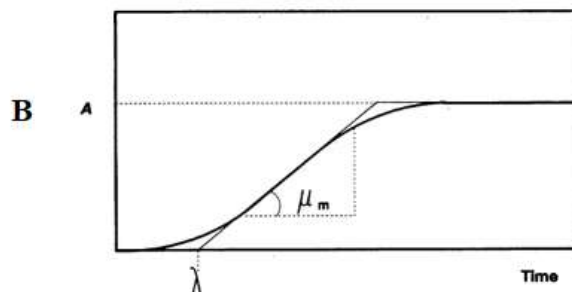


Figura 7 - A – Equação de crescimento de Gompertz; **B** – Parâmetros da curva de crescimento (ZWIETERING et al., 1990).

Os resultados de cada parâmetro e analito foram expressos como a média aritmética de três repetições com seu desvio padrão correspondente. Os resultados de HPLC e GC foram padronizados em g / l. Um experimento de planejamento fatorial foi utilizado para analisar a influência da fermentação e atividade das linhagens de leveduras isoladas em dornas de fermentação de cachaça em comparação com linhagens industriais e também as leveduras parentais em relação aos híbridos obtidos. O teste de Tukey foi empregado considerando a significância quando o valor de p estava abaixo de 0,05. A análise de componentes principais (APC), como metodologia multivariada, foi aplicada para obter uma visualização em uma dimensão reduzida dos dados e determinar qual variável mais contribuiu para as diferenças observadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo softwar Infostat versão 2011 (Grupo Infostat, Córdoba, Argentina).

5. RESULTADOS

5.1. Microrganismos utilizados para a triagem de novas leveduras cervejeiras

A seleção de linhagens de *S. cerevisiae* com potencial para a produção de cerveja foi realizada a partir de 840 leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça. O primeiro teste realizado na triagem foi o de fermentação da maltose, uma vez que este é o açúcar mais abundante no mosto cervejeiro. Seiscentos e noventa e seis leveduras foram capazes de fermentar a maltose a temperatura de 20 °C e dentre essas linhagens 577 foram capazes de fermentar a maltose também a temperatura de 10 °C. No anexo 1 encontram-se a tabela com todas as leveduras que foram capazes de fermentar a maltose em ambas as temperaturas. Na tabela também é mostrado a quantidade de dias que foram necessários para observar a presença de gás no interior do tubo de Durham (Figura 8). Os controles *S. cerevisiae* T58 (Fermentis) e *S. pastorianus* W3470 (Fermentis) foram utilizados para comparação dos resultados.



Figura 8 – Ilustração da fermentação da maltose pelas linhagens de *S. cerevisiae* em tubos de ensaio e tubo de Durham. Na imagem é possível notar o preenchimento do tubo de Durham com gás carbônico, identificando o processo fermentativo.

A seleção das linhagens foi feita baseada naquelas que mais se assemelhavam a fermentação das linhagens comerciais. As linhagens que foram capazes de fermentar a maltose em ambas as temperaturas e tiveram o tubo de Durham repleto de CO₂ até o segundo dia (48 horas) de fermentação na temperatura de 20 °C foram selecionadas para o experimento de produção de sulfeto de hidrogênio. Ao total, foram selecionadas 533 linhagens .

Devido à grande quantidade de linhagens de *S. cerevisiae* estudadas e a necessidade de selecionar as melhores para a produção de cerveja, optou-se por agrupar as leveduras de acordo com a dorna de fermentação de cachaça e a data de coleta. As 533 linhagens selecionadas no processo de fermentação da maltose foram agrupadas em 228 grupos que variaram entre 1 e 15 linhagens. Dentro deste agrupamento, uma levedura foi selecionada para a análise qualitativa da produção de H₂S. Quando o representante do grupo apresentava elevada produção de H₂S, todo o grupo era excluído para os próximos testes. A produção de H₂S foi verificada no terceiro e sexto dia de experimento. A linhagem comercial de *S. cerevisiae* WB-06 foi utilizada como controle positivo da produção de sulfeto de hidrogênio e a linhagem *S. cerevisiae* US-05 como controle negativo (anexo 2). A figura 9 mostra a diferença de intensidade de cor entre as linhagens testadas, quanto maior a intensidade da coloração marrom maior a produção de H₂S pela levedura.

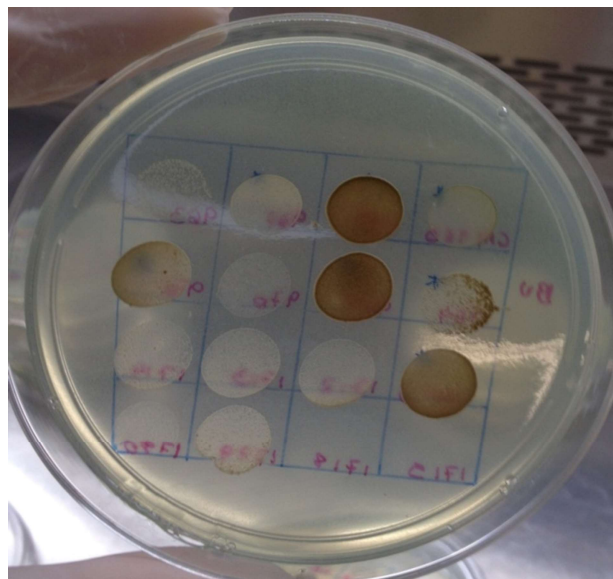


Figura 9 – Ilustração da produção de sulfeto de hidrogênio pelos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* utilizados nos presente trabalho.

As linhagens que apresentaram grau elevado (+++) de produção de H₂S no terceiro e sexto dia e aquelas que apresentaram resultado alto (++) já no terceiro dia foram excluídas dos próximos testes, pelo fato de o sulfeto de hidrogênio conferir um odor sulfuroso à bebida fermentada. Foram considerados como elevado (+++) o escurecimento da levedura que se assemelhou ao controle de *S. cerevisiae* WB-06 e como negativo (-) as que se assemelharam a *S. cerevisiae* US-05. As linhagens utilizadas como controle são utilizadas comercialmente para a produção de cerveja e são aceitas pelos consumidores de acordo com o estilo de cerveja

produzido. A levedura que produz o H₂S está restrita a um limite de estilos de cervejas que podem ser empregadas para a produção. A partir da análise semiquantitativa da produção de H₂S, selecionou-se 52 linhagens de *S. cerevisiae* para os testes de tolerância as variações de pH, glicose, temperatura e álcool.

5.2. Tolerância as variações de pH, glicose, temperatura e álcool

Devido ao ambiente estressante encontrado na fermentação espontânea da cachaça, esse processo seleciona microrganismos capazes de suportar diferentes variações física e químicas presentes no ciclo de produção de bebidas alcoólicas. A fermentação do mosto cervejeiro também é um ambiente estressante para a sobrevivência da levedura, e fazer a seleção de *S. cerevisiae* que se adaptam a esse ambiente favorece a escolha de uma boa linhagem. A variação de pH, glicose, temperatura e álcool são as variações mais comumente encontradas no momento de produção da cerveja. A figura 10 exemplifica como foi avaliado a tolerância das leveduras estudadas frente a fatores estressantes. Diluições seriadas das linhagens foram plaqueadas em meio de cultura (acrescido com o fator estressante), sendo que a primeira diluição possuía o inóculo ajustado para um valor de 0,3 de absorbância a 655_{nm}.



Figura 10 – Ilustração do teste de avaliação de tolerância aos estresses. *Na parte superior da placa encontra-se a linhagem de estudo na maior concentração de células (DO:0,3) seguindo das diluições decimais seriadas das amostras.

A tabela 5 mostra a última diluição em que as leveduras estudadas apresentaram crescimento. Os números na tabela são designados para o crescimento das linhagens nas concentrações celulares testadas, sendo que o número 1 refere-se a concentração de densidade ótica de 0,3 e os números seguintes refere-se aos valores da diluição decimal seriada feita com o inóculo inicial. A verificação do crescimento na temperatura de 10 e 16 °C foi feita após 72 horas de incubação. Apenas três linhagens não apresentaram o crescimento em nenhuma das concentrações na temperatura de 10 °C até o terceiro dia de teste e, o restante apresentou crescimento igual ou melhor que as linhagens comerciais cervejeiras de *S. cerevisiae* e *S.*

pastorianus. Para a temperatura de 16 °C, 12 linhagens apresentaram crescimento somente na maior concentração (DO: 0,3), porém, o restante apresentou o crescimento igual ou melhor que as linhagens controles (tabela – 3).

Tabela 3 – Listagem de leveduras utilizadas no ensaio de tolerância as variações de temperatura, álcool, glicose e pH.

Levedura	Temperatura (°C)				Teor alcóolico (%)					Glicose (%)			pH		
	10	16	25	30	8	10	12	15	20	20	25	30	2,5	3	4
<i>S. pastorianus</i> (W3470)	1	2	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2
<i>S. cerevisiae</i> (T58)	1	2	3	4	6	2	2	0	0	3	3	3	3	6	6
CAY 55A	1	1	2	4	6	6	6	6	6	4	4	3	5	6	6
CAY 70	1	2	2	4	5	5	5	5	5	4	3	3	4	4	6
CAY 77	1	1	2	4	5	4	4	4	4	4	3	3	4	4	5
CAY 120	1	2	2	4	6	5	3	2	1	3	2	2	5	6	6
CAY 129	1	2	4	6	6	6	6	5	6	6	6	4	5	5	5
CAY 143	2	3	4	5	6	6	6	5	5	5	5	4	5	5	6
CAY175	2	2	2	5	4	4	3	3	3	5	5	5	3	3	5
CAY 197	2	3	3	6	4	4	5	5	4	4	4	3	4	5	5
CAY 237	2	3	4	5	5	5	5	5	5	4	4	3	5	5	5
CAY 244	1	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2	0	0	1
CAY 326	1	1	1	2	3	3	3	3	3	2	2	1	2	4	4
CAY 337	1	3	5	5	6	6	6	6	5	3	3	2	4	4	5
CAY 369	2	2	4	4	4	4	4	3	3	5	5	5	3	4	4
CAY 378	2	2	5	5	4	4	4	4	3	4	4	4	3	3	4
CAY 421	2	3	3	4	5	5	5	5	4	4	3	2	3	3	2
CAY 544	1	2	3	4	6	5	5	5	3	3	3	2	4	4	4
CAY 566	1	3	4	4	5	5	4	4	4	4	4	3	3	3	4
CAY 653	1	3	3	5	6	6	6	6	6	4	4	4	4	5	5
CAY 774	1	3	4	5	5	5	5	4	4	4	5	3	2	3	5
CAY 786B	1	1	2	6	4	4	2	1	0	4	4	4	4	4	6
CAY 816	3	4	4	5	5	5	5	6	5	6	5	5	5	5	5
CAY 839	1	2	3	6	6	6	6	6	6	3	6	3	3	6	6
CAY 842	2	2	2	6	4	2	2	0	0	6	6	4	6	6	6
CAY 852	2	3	3	6	3	2	2	2	0	3	3	2	3	3	4
CAY 926A	1	2	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
CAY 980	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	5
CAY 1078B	0	2	2	3	6	6	3	1	0	2	2	2	2	3	3
CAY 1086A	1	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	6
CAY 1094	2	3	3	4	4	4	4	3	3	2	3	2	3	3	4
CAY 1129A	2	2	4	4	6	6	6	5	5	4	3	4	4	5	5
CAY 1155	2	3	6	6	5	5	5	4	4	5	5	6	4	4	5
CAY 1403	0	1	1	1	2	1	0	0	0	3	2	1	3	3	3
CAY 1410	1	1	2	3	2	1	1	0	0	5	2	2	2	3	3
CAY 1426	1	2	3	4	6	3	1	0	0	4	3	3	3	4	6
CAY 1574	2	2	3	5	6	6	5	4	4	5	5	4	5	5	4
CAY 1612	2	2	2	3	3	3	1	1	0	2	3	3	3	3	5
CAY 1733	1	2	2	4	6	6	4	2	2	5	4	3	4	4	5
CAY 1761	1	1	1	3	3	1	1	0	0	2	2	2	3	3	6
CAY 1764	1	1	6	6	6	6	6	6	6	5	5	6	6	6	6
CAY 1769	1	1	3	5	6	6	6	6	5	5	5	4	6	6	6
CAY 1775	1	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
CAY 2015	3	3	3	6	6	3	3	3	1	6	6	4	4	6	6

Levedura	Temperatura (°C)				Teor alcóolico (%)					Glicose (%)			pH		
	10	16	25	30	8	10	12	15	20	20	25	30	2,5	3	4
CAY 2098	1	2	3	6	6	3	2	1	1	6	4	6	3	6	6
CAY 2354	0	1	4	1	0	0	0	0	0	3	3	3	2	3	4
CAY 2377	1	2	2	4	4	4	3	3	3	4	4	4	3	4	4
CAY 2379	2	2	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	2	2	3
CAY 2488	1	1	3	3	3	2	1	1	1	3	3	3	3	4	4
CAY 674b	1	2	3	6	5	5	3	3	1	5	5	5	4	5	5
CAY 2549	2	2	2	4	4	3	2	1	0	4	4	3	4	5	6
CAY 2554	2	2	2	6	5	2	2	1	0	4	5	4	4	6	6
SAL 01	2	2	2	6	4	4	1	1	0	4	4	3	4	4	6
SAL 56A	2	2	3	6	6	3	3	0	0	4	4	5	5	6	6

*Os números na tabela são designados para o crescimento das linhagens nas concentrações celulares testadas, sendo que o número 1 refere-se a concentração de densidade ótica de 0,3 e os números seguintes refere-se aos valores da diluição decimal seriada feita com o inóculo inicial.

A tolerância a condições de estresse é indicada por números de 0 a 6. O número 0 representa ausência de crescimento e 6 desenvolvimento de colônias até a 6ª diluição. Crescimento em baixos pHs e altas concentrações de glicose foram registrados após incubação de 24 h a 25°C; para temperatura de 10°C, crescimento foi registrado após 6 dias e 15°C após 3 dias; para temperaturas de 30 e 37°C após 24 h; em diferentes concentrações de etanol o crescimento foi registrado após 48 h de incubação a 25°C.

A análise de crescimento nas temperaturas de 25 e 30 °C foi realizada após 24 horas de incubação e todas as linhagens cresceram nessas temperaturas e muitas delas cresceram em concentrações de inóculos inferiores ao que visto para as linhagens controles. O controle de *S. cerevisiae* cresceu até a 3ª diluição e *S. pastorianus* somente na primeira diluição (DO:0,3) na temperatura de 25 °C. O teste de tolerância ao etanol foi analisado após 48 horas de incubação e observou que a linhagem de *S. pastorianus* não apresentaram crescimento em nenhuma das concentrações testadas, inferindo que essa linhagem, nas condições avaliadas, pode não tolerar concentrações de etanol acima de 8%. O controle comercial de *S. cerevisiae* foi capaz de crescer até a concentração de 12% de álcool, sendo esse resultado também encontrado para várias linhagens testadas no trabalho. Sessenta e quatro por cento das linhagens de *S. cerevisiae* cresceram até a concentração de 20% de álcool.

Todos os controles e linhagens estudadas foram capazes de crescer nas concentrações de 20%, 25% e 30% de glicose após 24 horas de incubação. Nove linhagens foram capazes de crescer até a sexta diluição seriada do inóculo inicial, indicando que essas leveduras possuem a capacidade de se multiplicar e resistir a essas altas concentrações de glicose. Os resultados encontrados para as variações de concentrações de glicose (20, 25, e 30%) também foram similares aos estudos de Belloch e colaboradores (2008), onde as linhagens foram capazes de se multiplicar nestas condições quando comparadas as linhagens comerciais de cervejas *ale*, *lager* e vinho.

A análise do crescimento em valores baixos de pH foi feito após 24 horas e somente a linhagem CAY224 não foi capaz de se multiplicar em pH 2,5 e 3,0. A maioria das linhagens analisadas apresentaram crescimento satisfatório em pH 4, sendo esse valor próximo ao valor encontrado no mosto cervejeiro.

A partir do ensaio de exposição a diferentes ambientes estressantes, foram direcionadas ao teste de fermentação de bancada 41 linhagens, essas linhagens foram selecionadas de acordo com o perfil de tolerância, principalmente ligado a variações de temperatura e a capacidade de suportar altas concentrações de glicose.

5.3. Fermentação em escala laboratorial em mosto cervejeiro

Quarenta e uma linhagens selecionadas a partir do ensaio de tolerância a diferentes tipos de estresse foram inseridas no teste de fermentação. O mosto cervejeiro preparado para os testes de fermentação tinha a concentração de 22,92 g/l de maltotriose, 41,25 g/l de maltose, 8,76 g/l de glicose e 1,28 g/l de frutose (tabela 5). A linhagem comercial de *S. cerevisiae* utilizada principalmente em fermentações de cervejas *ale* a uma temperatura de aproximadamente 20 °C consumiu uma média de $46,33 \pm 0,72$ g/l dos açúcares totais do mosto cervejeiro, já a comercial *S. pastorianus* utilizada em fermentações de cervejas *lager* em temperaturas de aproximadamente 10 °C, consumiu uma média de $49,67 \pm 0,26$ g/l na temperatura de 20 °C. As linhagens CAY337, CAY1155 e CAY1764 consumiram uma média de 52,46, 47,50 e 45,04 g/l de açúcares totais do mosto cervejeiro, respectivamente. Esses valores estão próximos ao valor encontrado para a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (tabela 4).

Tabela 4 – Média do consumo de açúcares totais pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto cervejeiro incubado na temperatura de 20 °C.

Consumo totais de Açúcares (g / l)			
CAY 55	43,25 ± 4,59	CAY 1078b*	20,63 ± 0
CAY 70	43,75 ± 2,07	CAY 1086a*	13,88 ± 0,7
CAY 77	41,21 ± 1,01	CAY 1097*	26,08 ± 0,72
CAY 120	41,71 ± 0,69	CAY 1129	40,88 ± 0,22
CAY 129	42,13 ± 0,43	CAY 1155**	47,5 ± 0,54
CAY 143	42,17 ± 3,61	CAY 1403	40,63 ± 1,96
CAY 175	43,33 ± 3,89	CAY 1410	41,13 ± 0
CAY 197*	13,21 ± 1,19	CAY 1426*	13,33 ± 0,75
CAY 237	39,83 ± 0,79	CAY 1733	40,58 ± 0,72
CAY 337**	52,46 ± 0,29	CAY 1761	39,71 ± 1,44
CAY 369	41,54 ± 1,32	CAY 1764**	45,04 ± 1,06
CAY 378	43 ± 1,21	CAY 1769	41,63 ± 0,57
CAY 421	42,04 ± 1,44	CAY 1775*	18,54 ± 0,63
CAY 544	43,38 ± 4,9	CAY 2015	38,46 ± 0,79
CAY 566	41,63 ± 1,6	CAY 2098	42,67 ± 1,66

Consumo totais de Açúcares (g / l)			
CAY 653	40,92 ± 1,82	CAY 2354	42,13 ± 1,19
CAY 674b	42 ± 1,24	CAY 2377	40,17 ± 0,83
CAY 774	39,08 ± 2,35	CAY 2379	38,88 ± 0,87
CAY 816	39,33 ± 0,72	CAY 2488	44 ± 0,43
CAY 839	38,33 ± 2,09	<i>S. cerevisiae</i>	46,33 ± 0,72
CAY 842	38,83 ± 0,58	<i>S. pastorianus</i>	49,67 ± 0,26
CAY 980*	28,92 ± 1,13		

*Linhagens que consumiram uma média abaixo de 30 g / l dos açúcares totais do mosto cervejeiro.

**Linhagens que consumiram uma média superior a 45 g / l dos açúcares totais do mosto cervejeiro.

A figura 11 mostra o consumo dos açúcares totais em intervalos de 24 horas. Após 24 horas do início da fermentação as leveduras iniciaram uma fermentação vigorosa e a partir de 120 horas essa fermentação começou a se estabilizar. A fim de estreitar cada vez mais a busca da linhagem ideal para a produção de cerveja e selecionar a levedura com o perfil de fermentação mais similar as leveduras comerciais, foram retiradas dos próximos testes as linhagens CAY197, CAY980, CAY1078, CAY1086, CAY1097, CAY1426 e CAY1775 por elas não consumirem mais de 30 g / l dos açúcares totais do mosto cervejeiro em até 168 horas de teste (tabela 5 e figura 11). Essas linhagens apresentaram uma fermentação lenta e com isso não alcançaram o consumo esperado visto nas outras linhagens estudadas (figura 11).

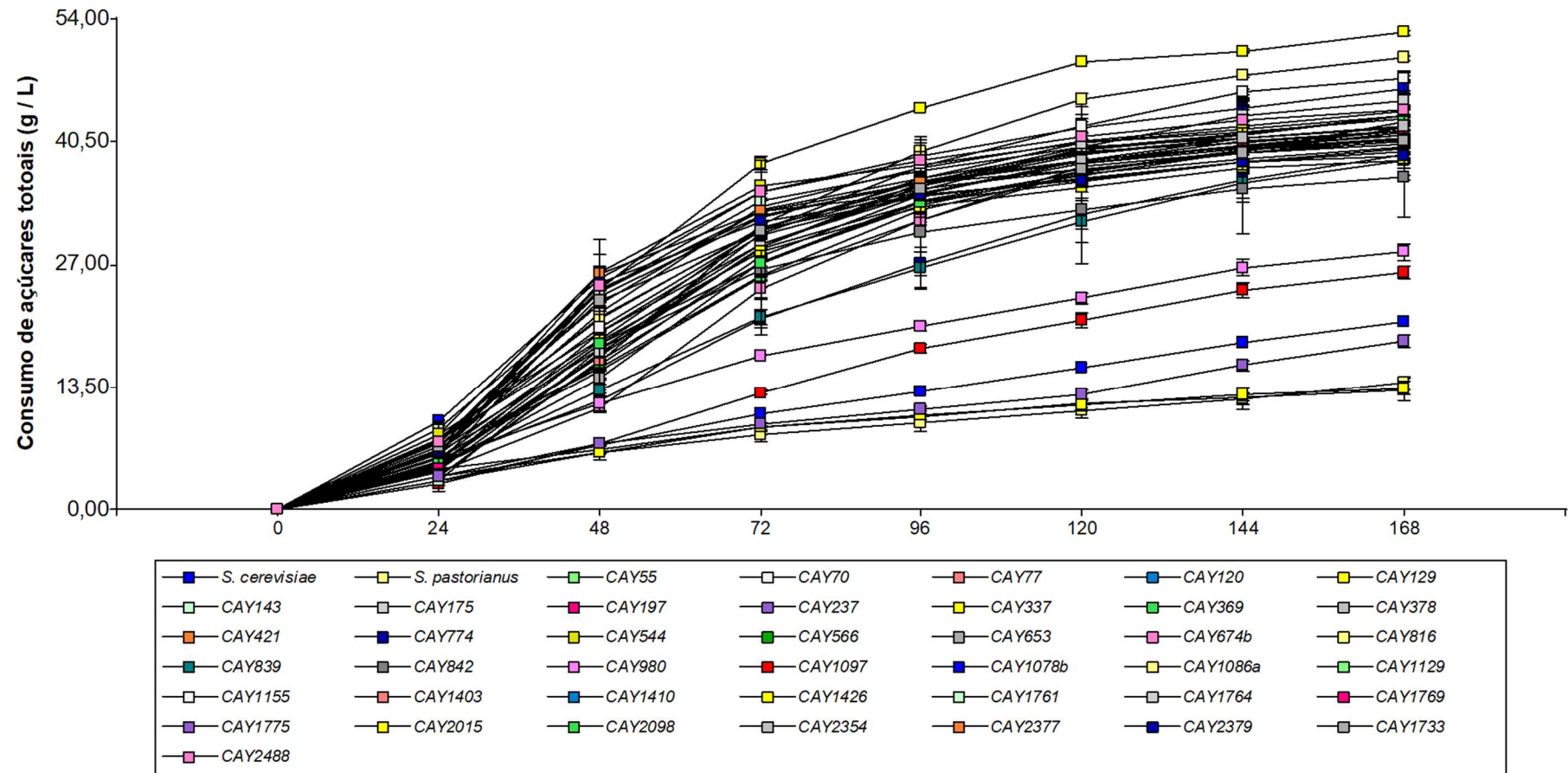


Figura 11 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro por meio da fermentação à temperatura de 20°C com as linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus* e a linhagens de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça.

O teste de Tukey foi executado para verificação da possível diferença estatística entre as linhagens estudadas. Em todas as figuras, a sinalização com letras na parte superior de cada barra informa se aquela linhagem apresentou ou não diferença estatística em comparação com as outras linhagens do estudo. Valores com uma letra comum indica que não são significativamente diferentes ($p > 0,05$), quando as letras divergem, é mostrado que houve diferença estatística. A análise estatística do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro é mostrada na figura 12 em correlação com a tabela 5. As linhagens que mais consumiram os açúcares totais foram as linhagens de estudo CAY337 e CAY1155 e a linhagem comercial de *S. pastorianus*, essas linhagens não apresentaram diferença estatística significativa entre elas e se diferenciaram em relação as outras linhagens de estudo, exceto para a linhagem CAY1764 e a comercial de *S. cerevisiae*. Oitenta e oito por cento das linhagens utilizadas na fermentação de bancada na temperatura de 20 °C não se diferenciaram estatisticamente entre elas em relação ao consumo dos açúcares e 79% das leveduras estudadas apresentaram similaridade na fermentação em relação ao controle comercial de *S. cerevisiae*.

Em relação ao tempo necessário para se adaptarem ao mosto e iniciar o processo fermentativo, pode-se observar na figura 13 que as linhagens CAY175 e CAY839 iniciaram mais precocemente a fermentação, porém, esse tempo inferior de latência não foi estatisticamente diferente de outras 15 linhagens, incluindo 14 linhagens do presente estudo e a *S. cerevisiae* comercial. Pode-se observar também que as linhagens CAY337 e CAY1155 que estão entre as linhagens que mais consumiram os açúcares totais do mosto, se encontram no grupo das linhagens que iniciaram rapidamente a fermentação do mosto. O controle de *S. pastorianus* demorou um pouco mais para iniciar a fermentação, esse fato deve-se ao fato de ser uma linhagem adaptada a fermentações em temperaturas mais baixas em relação ao estudo.

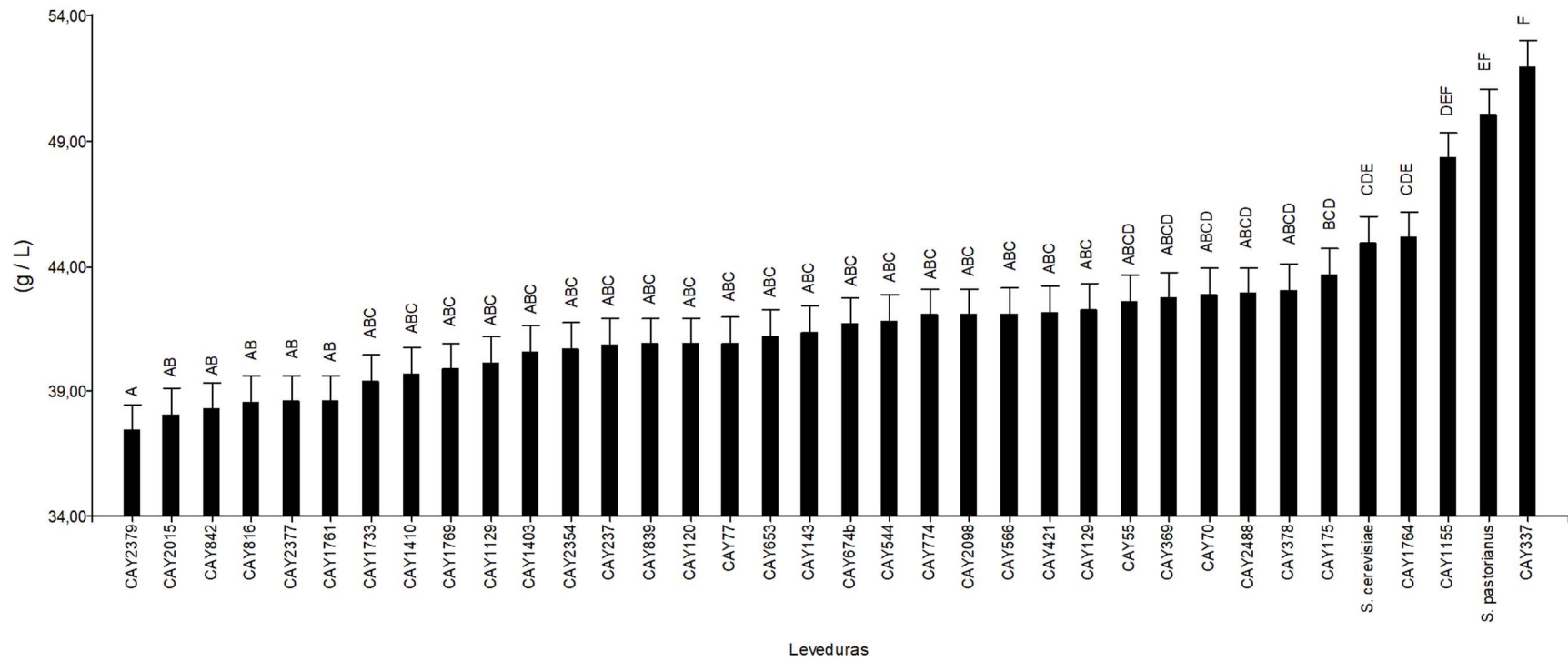


Figura 12 - Gráfico do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) pelas linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus* e as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

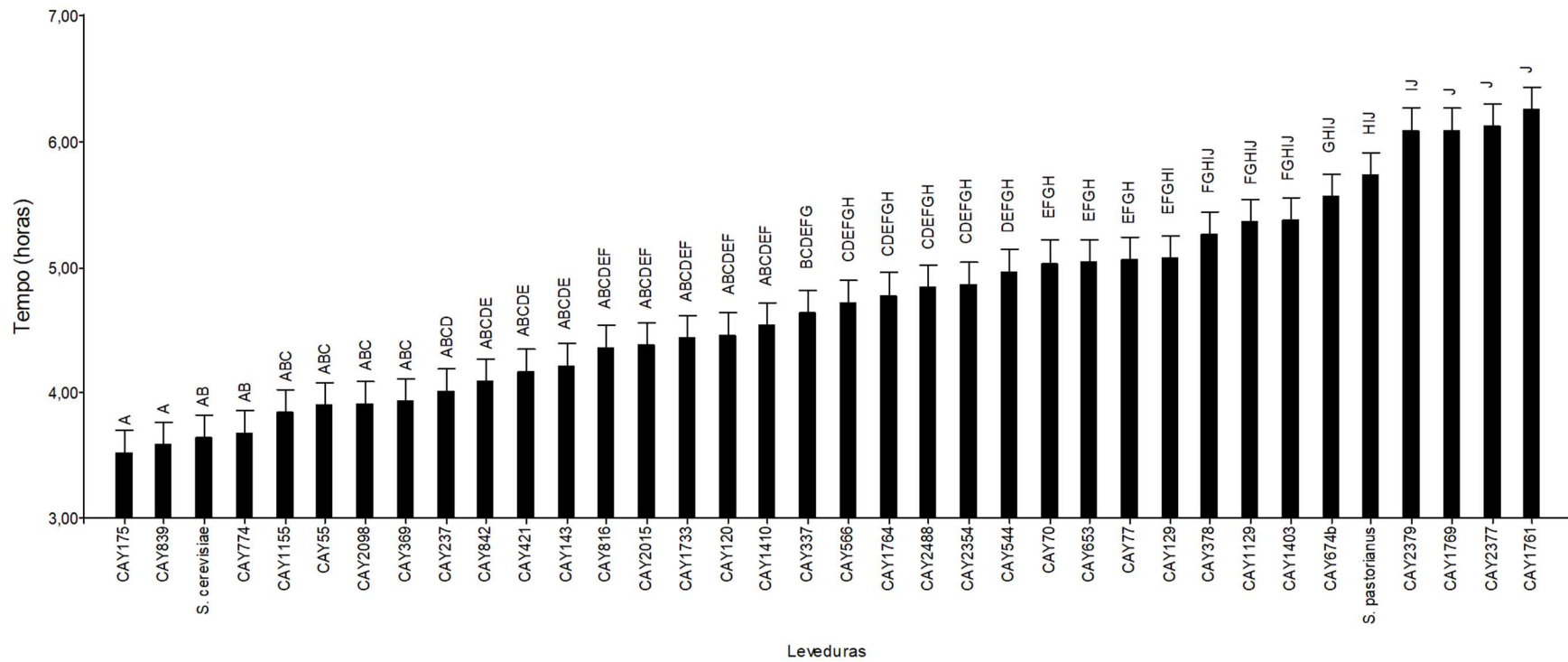


Figura 13 - Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto cervejeiro com as linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus* e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

5.4. Determinação de ácidos, açúcares e álcoois

A tabela 5 mostra o consumo dos açúcares e a produção de glicerol, ácido acético e etanol na análise em cromatografia líquida do mosto cervejeiro fermentado na temperatura de 20 °C. A figura 14 e tabela 5 mostram que CAY1155, CAY337 e CAY1764 foram as únicas linhagens estudadas capazes de fermentar a maltotriose, o segundo açúcar mais abundante no mosto cervejeiro. As linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) também apresentaram essa habilidade.

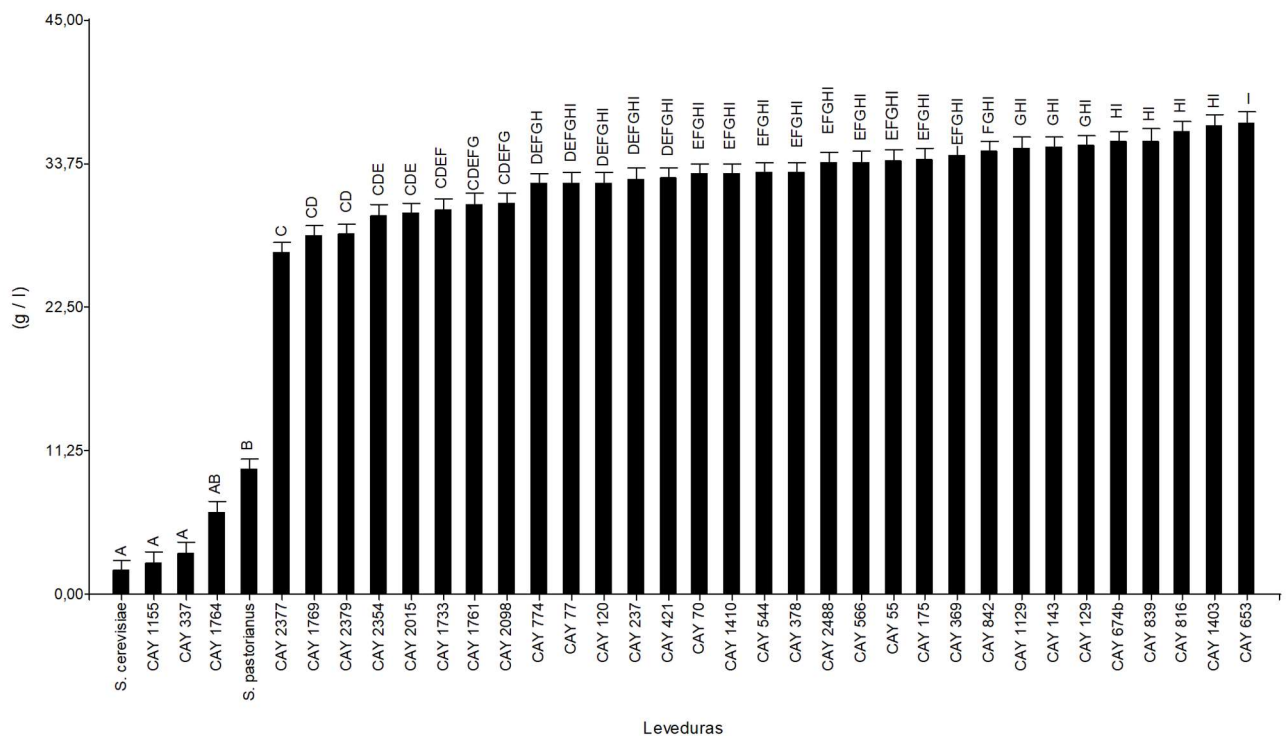


Figura 14 – Residual de maltotriose (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus* e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A tabela 5 mostra a composição inicial do mosto. O mosto inicial foi composto por 22,92 g / l de maltotriose, esse quantitativo é inferior ao encontrado na maioria dos mostos após a fermentação. Tal acontecimento é o resultado da conversão de dextrinas em maltotriose que por sua vez não é consumida por algumas linhagens de *S. cerevisiae*.

Tabela 5 – Residual de açúcares, glicerol, ácido acético e etanol (g / l) no final da fermentação do mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça e as linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) na temperatura de 20 °C.

Levedura	Concentração em g / l						
	Maltotriose	Maltose	Glicose	Frutose	Glicerol	Ácido acético	Etanol
CAY 55	34,02 ± 0,59 (e, f, g, h, i)	0,28 ± 0,02 (a)	0,04 ± 0,04 (a, b, c)	0,73 ± 0,03 (a,b)	3,1 ± 0,05 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,14 ± 0,02 (b, c, d)	43,44 ± 0,12 (a, b, c, d)
CAY 70	32,95 ± 0,37 (e, f, g, h, i)	0,31 ± 0,01 (a)	0,07 ± 0,01 (a, b, c, d)	0,74 ± 0,01 (a,b)	3,44 ± 0,03 (d, e, f, g, h)	0,25 ± 0,04 (e, f, g, h, i)	44,34 ± 0,74 (a, b, c, d)
CAY 77	32,25 ± 0,14 (d, e, f, g, h, i)	0,3 ± 0 (a)	0,09 ± 0,01 (a, b, c, d)	0,73 ± 0,01 (a,b)	2,82 ± 0,02 (a, b, c, d, e, f, g)	0,11 ± 0,01 (b)	42,99 ± 1,91 (a, b, c, d)
CAY 120	32,26 ± 0,53 (d, e, f, g, h, i)	0,32 ± 0 (a)	0,06 ± 0 (a, b, c, d)	0,75 ± 0,02 (a,b)	3,06 ± 0,14 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,21 ± 0,01 (d, e, f, g, h, i)	44,46 ± 1 (a, b, c, d)
CAY 129	35,16 ± 0,12 (g, h, i)	0,32 ± 0 (a)	0,06 ± 0 (a, b, c, d)	0,79 ± 0,12 (a,b)	3,07 ± 0,51 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,29 ± 0,12 (i)	45,18 ± 2,22 (a, b, c, d, e)
CAY 143	35,06 ± 1,45 (g, h, i)	0,3 ± 0,02 (a)	0,09 ± 0,04 (a, b, c, d)	0,75 ± 0,1 (a,b)	3,06 ± 0,24 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,24 ± 0,03 (e, f, g, h, i)	45,11 ± 0,91 (a, b, c, d, e)
CAY 175	34,11 ± 1,35 (e, f, g, h, i)	1,78 ± 0,05 ©	0,05 ± 0,04 (a, b, c)	0,65 ± 0,04 (a,b)	3,32 ± 0,17 (b, c, d, e, f, g, h)	0,23 ± 0,02 (d, e, f, g, h, i)	43,55 ± 0,9 (a, b, c, d)
CAY 237	32,58 ± 0,8 (d, e, f, g, h, i)	1,43 ± 0,03 (a, b, c)	0,04 ± 0,02 (a, b, c)	0,59 ± 0,05 (a,b)	3,17 ± 0,14 (b, c, d, e, f, g, h)	0,23 ± 0,02 (d, e, f, g, h, i)	40,28 ± 4,23 (a, b)
CAY 337	3,2 ± 0,08 (a)	0,5 ± 0 (a, b)	0,1 ± 0,04 (a, b, c, d)	0,74 ± 0,02 (a,b)	2,89 ± 0,08 (a, b, c, d, e, f, g)	0 ± 0 (a)	56,88 ± 0,09 (c, d, e)
CAY 369	34,42 ± 0,04 (e, f, g, h, i)	1,66 ± 0,04 (b,c)	0,02 ± 0,01 (a, b, c)	0,69 ± 0 (a,b)	3,09 ± 0,04 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,19 ± 0,02 (b, c, d, e, f, g)	45,58 ± 0,06 (a, b, c, d, e)
CAY 378	33,07 ± 1,27 (e, f, g, h, i)	0,32 ± 0,01 (a)	0,03 ± 0,03 (a, b, c)	0,63 ± 0,02 (a,b)	3,94 ± 0,17 (f, g, h)	0,29 ± 0,02 (i)	45,6 ± 1,64 (a, b, c, d, e)
CAY 421	32,62 ± 1,05 (d, e, f, g, h, i)	0,28 ± 0,01 (a)	0,13 ± 0,08 (a, b, c, d)	0,64 ± 0,02 (a,b)	2,9 ± 0,07 (a, b, c, d, e, f, g)	0,22 ± 0,05 (d, e, f, g, h, i)	43,96 ± 1,29 (a, b, c, d)
CAY 544	33,06 ± 1,32 (e, f, g, h, i)	0,32 ± 0 (a)	0,06 ± 0,02 (a, b, c, d)	0,69 ± 0,01 (a,b)	3,42 ± 0,1 (c, d, e, f, g, h)	0,23 ± 0,03 (d, e, f, g, h, i)	43,74 ± 0,43 (a, b, c, d)
CAY 566	33,91 ± 3,28 (e, f, g, h, i)	0,31 ± 0,02 (a)	0,08 ± 0,01 (a, b, c, d)	0,65 ± 0,06 (a,b)	3,99 ± 0,34 (g, h)	0,29 ± 0,05 (i)	42,02 ± 5,15 (a, b, c, d)
CAY 653	36,97 ± 0,19 (i)	0,3 ± 0,01 (a)	0,07 ± 0,01 (a, b, c, d)	0,74 ± 0,01 (a,b)	3,74 ± 0,04 (e, f, g, h)	0,25 ± 0 (e, f, g, h, i)	47 ± 1,84 (a, b, c, d, e)
CAY 674b	35,49 ± 3,85 (h, i)	0,34 ± 0,1 (a)	0,14 ± 0,14 (c,d)	0,91 ± 0,29 (b)	4,34 ± 1,06 (h)	0,21 ± 0,02 (d, e, f, g, h, i)	60,99 ± 25,4 (e)
CAY 774	32,16 ± 1,86 (d, e, f, g, h)	3,96 ± 1,63 (d)	0,04 ± 0,01 (a, b, c)	0,53 ± 0,39 (a)	2,99 ± 0,11 (a, b, c, d, e, f, g)	0,11 ± 0,01 (b, c)	41,05 ± 2,13 (a, b, c)
CAY 816	36,27 ± 1,1 (h, i)	0,32 ± 0 (a)	0,05 ± 0 (a, b, c)	0,87 ± 0,01 (a,b)	2,84 ± 0,09 (a, b, c, d, e, f, g)	0,26 ± 0,05 (f, g, h, i)	44,72 ± 0,35 (a, b, c, d)
CAY 839	35,53 ± 0,17 (h, i)	2,29 ± 0,08 ©	0,05 ± 0,03 (a, b, c)	0,91 ± 0,01 (b)	4,02 ± 0,03 (g, h)	0,28 ± 0 (g, h, i)	41,81 ± 1,01 (a, b, c, d)
CAY 842	34,7 ± 0,19 (f, g, h, i)	0,31 ± 0 (a)	0,02 ± 0,03 (a, b, c)	0,9 ± 0,07 (b)	3,4 ± 0,08 (c, d, e, f, g, h)	0,21 ± 0,01 (d, e, f, g, h, i)	45,07 ± 1,37 (a, b, c, d, e)
CAY 1129	34,97 ± 0,35 (g, h, i)	0,33 ± 0,01 (a)	0 ± 0 (a)	0,79 ± 0,01 (a,b)	2,82 ± 0,13 (a, b, c, d, e, f, g)	0,22 ± 0,01 (d, e, f, g, h, i)	42,63 ± 0,55 (a, b, c, d)
CAY 1155	2,47 ± 0,28 (a)	1,85 ± 1,34 ©	0 ± 0 (a)	0,75 ± 0,03 (a,b)	3,03 ± 0,09 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,18 ± 0,03 (b, c, d, e, f, g)	53,78 ± 0,96 (b, c, d, e)
CAY 1403	36,74 ± 2,67 (h, i)	0,29 ± 0,01 (a)	0 ± 0 (a)	0,79 ± 0,04 (a,b)	3,04 ± 0,12(a, b, c, d, e, f, g, h)	0,19 ± 0,01 (b, c, d, e, f, g, h)	44,16 ± 1,35 (a, b, c, d)
CAY 1410	32,97 ± 3,24 (e, f, g, h, i)	0,28 ± 0,01 (a)	0,01 ± 0,01 (a, b)	0,76 ± 0,08 (a,b)	3,15 ± 0,23 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,29 ± 0,03 (h, i)	40,42 ± 4,08 (a, b)
CAY 1733	30,15 ± 0,3 (c, d, e, f)	0,28 ± 0 (a)	0,03 ± 0,05 (a, b, c)	0,65 ± 0,02 (a,b)	2,66 ± 0,02 (a, b, c, d, e, f)	0,21 ± 0,01 (c, d, e, f, g, h, i)	35,11 ± 0,49 (a)
CAY 1761	30,58 ± 1,64 (c, d, e, f, g)	0,31 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,73 ± 0,02 (a,b)	2,74 ± 0,07 (a, b, c, d, e, f, g)	0,17 ± 0,01 (b, c, d, e, f)	35,03 ± 1,33 (a)
CAY 1764	6,44 ± 0,51 (a,b)	0,4 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,65 ± 0,02 (a,b)	2,38 ± 0,1 (a, b, c, d)	0 ± 0 (a)	42,27 ± 0,39 (a, b, c, d)
CAY 1769	28,11 ± 1,3 (c,d)	0,33 ± 0,01 (a)	0 ± 0 (a)	0,67 ± 0,02 (a,b)	2,11 ± 0,14 (a, b, c)	0,14 ± 0,01 (b, c, d)	34,91 ± 3,65 (a)
CAY 2015	29,85 ± 0,21 (c, d, e)	0,31 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,73 ± 0,02 (a,b)	2,4 ± 0,06 (a, b, c, d)	0,22 ± 0,01 (d, e, f, g, h, i)	36,8 ± 1,54 (a)

Levedura	Concentração em g / l						
	Maltotriose	Maltose	Glicose	Frutose	Glicerol	Ácido acético	Etanol
CAY 2098	30,65 ± 0,61 (c, d, e, f, g)	0,31 ± 0,01 (a)	0 ± 0 (a)	0,77 ± 0,01 (a,b)	2,73 ± 0,11 (a, b, c, d, e, f, g)	0,19 ± 0,01 (b, c, d, e, f, g)	39,52 ± 1,45 (a, b)
CAY 2354	29,7 ± 0,63 (c, d, e)	0,31 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,73 ± 0,02 (a,b)	3,07 ± 0,19 (a, b, c, d, e, f, g, h)	0,17 ± 0,01 (b, c, d, e, f)	35,8 ± 1,84 (a)
CAY 2377	26,76 ± 2,3 ©	0,33 ± 0,02 (a)	0 ± 0 (a)	0,7 ± 0,07 (a,b)	2,05 ± 0,18 (a, b)	0,19 ± 0,02 (b, c, d, e, f, g, h)	34,1 ± 6,24 (a)
CAY 2379	28,19 ± 1,74 (c,d)	0,32 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,65 ± 0,02 (a,b)	1,82 ± 1,43 (a)	0,24 ± 0,03 (e, f, g, h, i)	36,66 ± 0,78 (a)
CAY 2488	33,82 ± 1,11 (e, f, g, h, i)	0,33 ± 0,01 (a)	0,14 ± 0,01 (b, c, d)	0,71 ± 0,03 (a,b)	3,19 ± 0,12 (b, c, d, e, f, g, h)	0,21 ± 0,02 (d, e, f, g, h, i)	42,24 ± 2,42 (a, b, c, d)
<i>S. cerevisiae</i>	1,86 ± 0,21 (a)	0,38 ± 0,02 (a)	0,09 ± 0,03 (a, b, c, d)	0,61 ± 0,06 (a,b)	2,59 ± 0,22 (a, b, c, d, e)	0 ± 0 (a)	53,35 ± 6,46 (b, c, d, e)
<i>S. pastorianus</i>	9,79 ± 0,76 (b)	0,52 ± 0,09 (a, b)	0,19 ± 0,13 (d)	0,9 ± 0,31 (b)	4,01 ± 1,33 (g, h)	0,16 ± 0,01 (b, c, d, e)	57,63 ± 0,68 (d, e)
Mosto Original	22,92	41,25	8,76	1,28	0,16	0	0,21

*Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A análise da concentração residual de maltose, glicose e frutose (tabela 5 e figura 15) mostra que todas as linhagens estudadas foram capazes de consumir esses açúcares, sendo a glicose o açúcar mais consumido pelas linhagens. CAY774 foi a linhagem que deixou o maior residual de maltose no mosto, seguindo das linhagens CAY839, CAY1155 e CAY175 que se diferenciaram de quase todas as linhagens estudadas, essa diferença não foi vista exceto para as linhagens CAY369 e CAY237. Em contrapartida, CAY774 foi a linhagem que mais consumiu a frutose. As linhagens que mais deixaram o residual de frutose foram, CAY842, CAY674b, CAY839 e a comercial *S. pastorianus*.

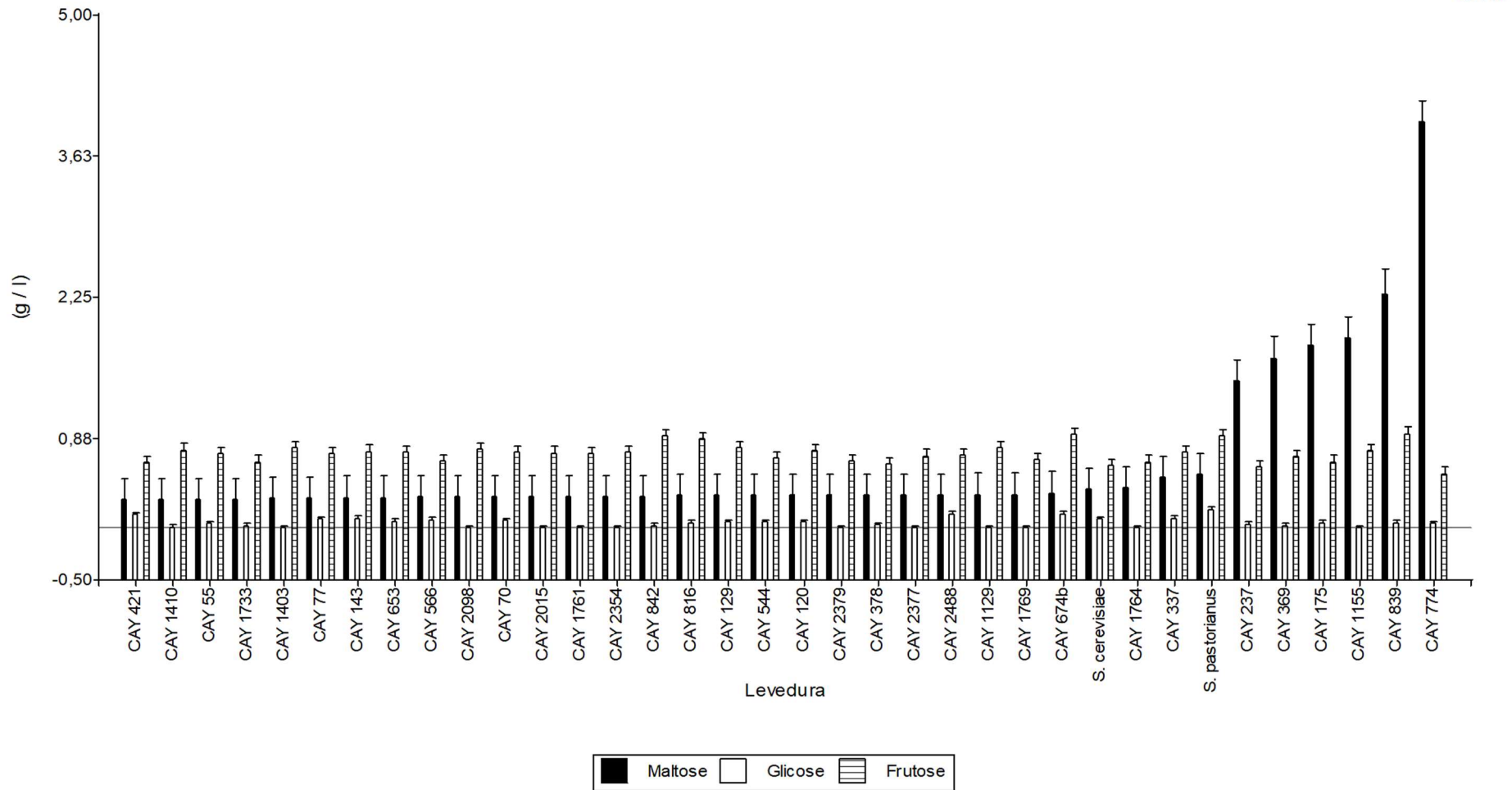


Figura 15 - Residual de maltose, glicose e frutose (g/l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. * A diferença estatística pode ser vista na tabela 5.

Uma melhor análise do gráfico de produção do glicerol pode ser feita ao separá-lo em dois grandes grupos, as linhagens que se agruparam com a linhagem CAY2379 (letra A), onde também se encontra a linhagem comercial *S. cerevisiae* e as linhagem que agruparam com a CAY674b (letra H), onde se encontra a linhagem comercial *S. pastorianus*. CAY674b produziu a maior quantidade de glicerol, média de $4,34 \pm 1,06$ g / l e a CAY2379 produziu o menor valor, uma média de $1,82 \pm 1,43$ g / l (tabela 5).

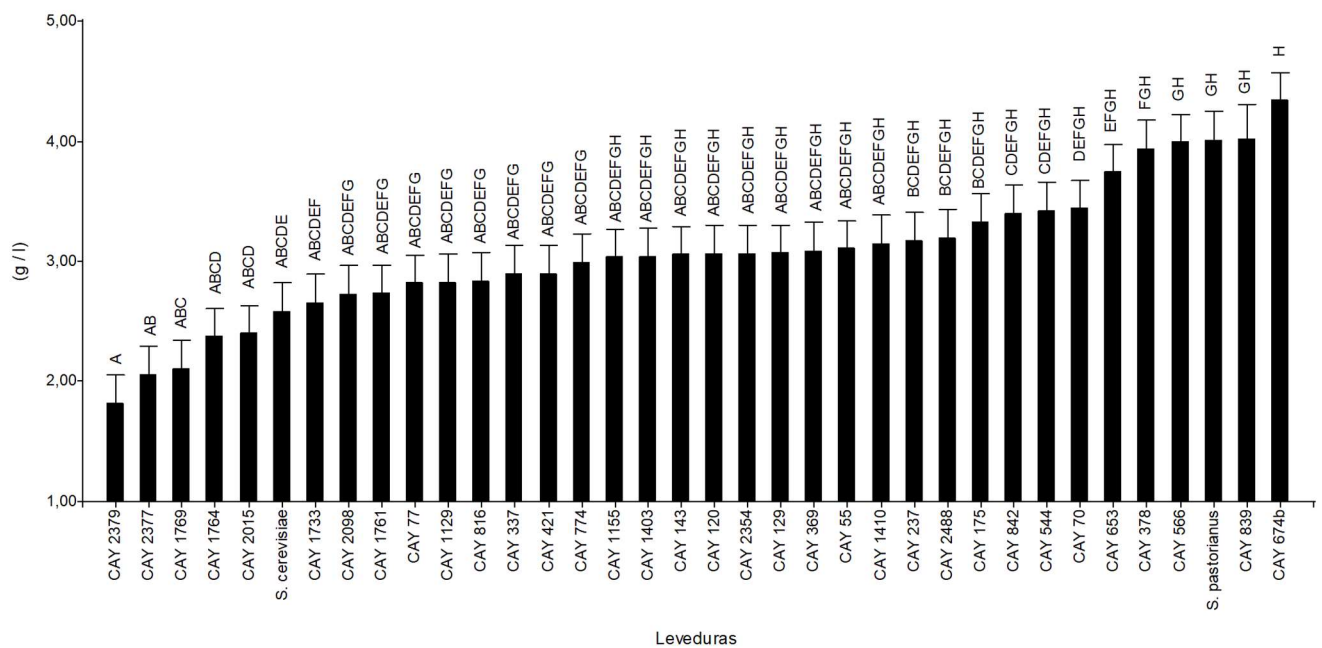


Figura 16 - Produção de glicerol (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Saccharomyces cerevisiae comercial, CAY1764 e CAY337 não produziram ácido acético. As linhagens CAY378, CAY129 e CAY566 não se diferenciaram estatisticamente entre si e produziram a maior quantidade de ácido acético. O limiar de percepção para o ácido acético é de 0,75 g/l, portanto, os valores encontrados para a maioria das linhagem estudadas podem não ser percebidas pelo olfato humano. As demais linhagens produziram uma média de

entre $0,11 \pm 0,01$ g / l e $0,29 \pm 0,03$ apresentando variedade de diferenças estatísticas entre si (figura 17).

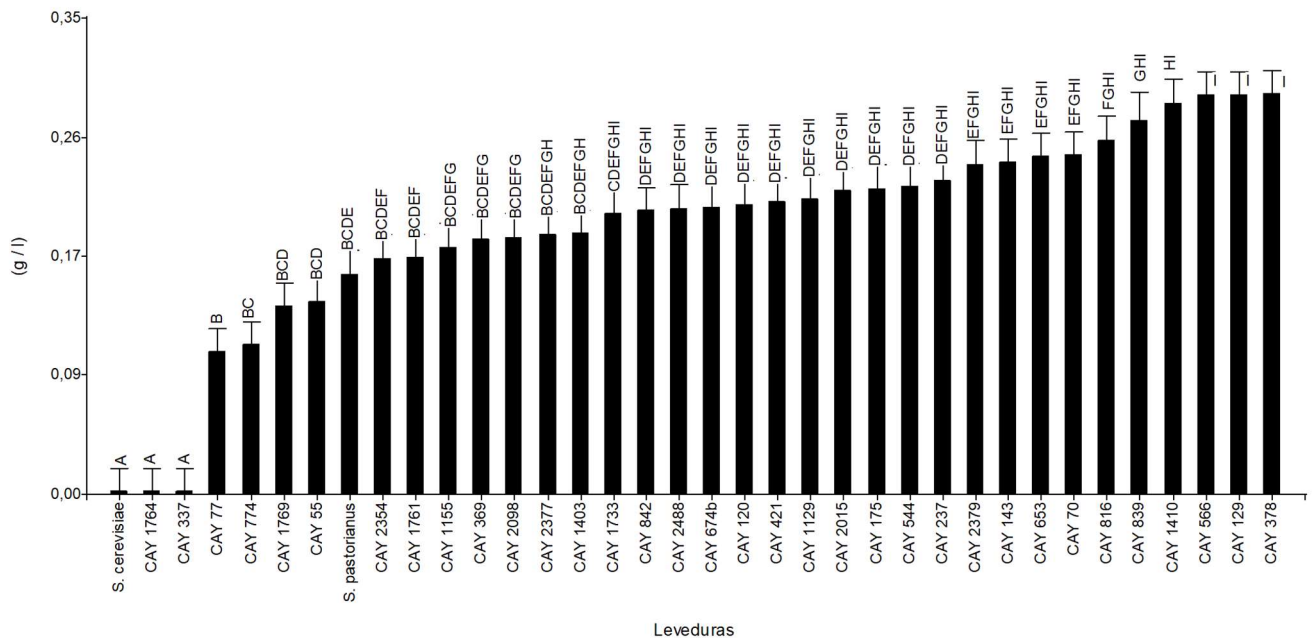


Figura 17 - Produção de ácido acético (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Quando analisado a produção de etanol, as linhagens pertencentes ao grupo E (não se diferenciaram estatisticamente) apresentaram uma média de produção de etanol de $45,07 \pm 1,37$ g / l a $60,99 \pm 25,4$ g / l. Fazendo uma comparação com o consumo de açúcares totais do mosto, pode-se notar que CAY674b não foi uma das linhagens que consumiram a maior quantidade dos açúcares totais do mosto cervejeiro ($42 \pm 1,24$ g / l), porém, foi capaz de produzir a maior quantidade de álcool. Pode-se notar na figura 18 que a maioria das linhagens estudadas se agruparam ao grupo A, relacionado as linhagens que produziram menores quantidades de álcool. Todas essas linhagens não se diferenciaram estatisticamente entre si e produziram uma concentração de etanol que variou de $34,1 \pm 6,24$ g / l (CAY2377) até $47 \pm 1,84$ g / l (CAY653).

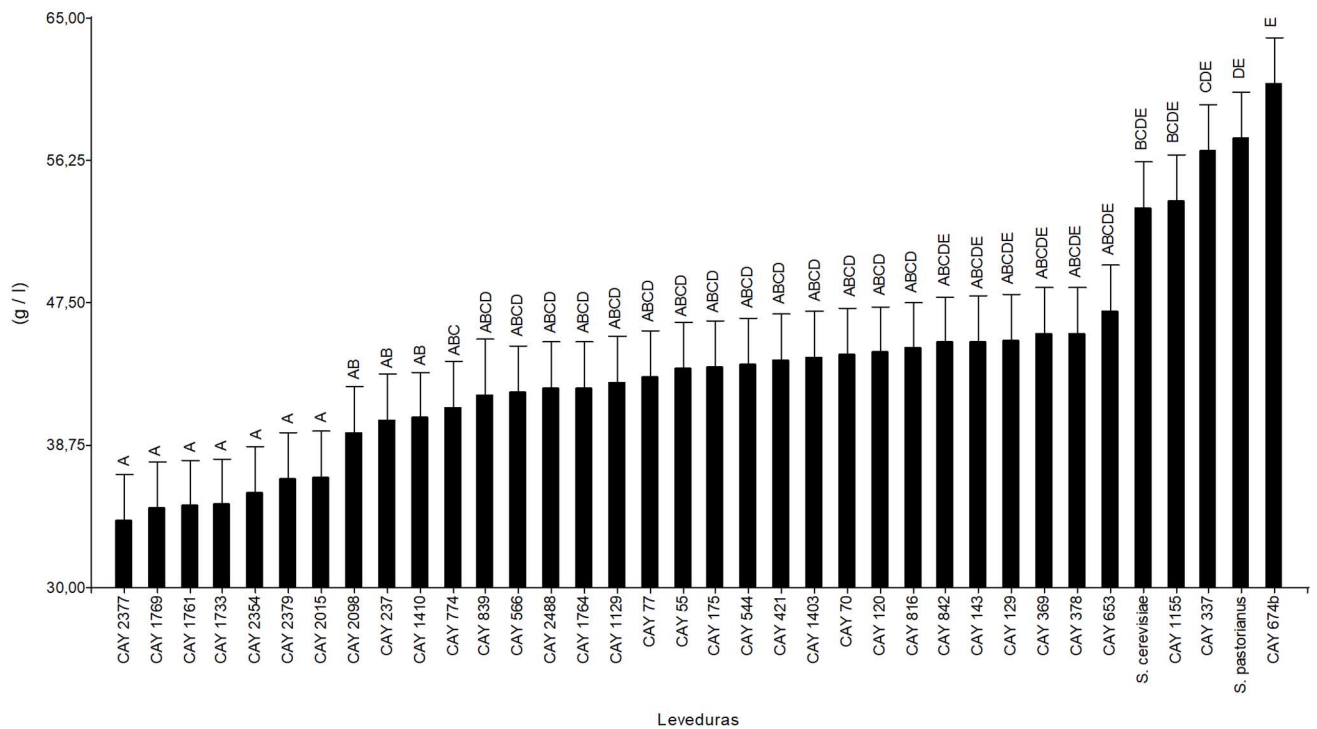


Figura 18 - Produção etanol (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens de comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) e as linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C. Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

5.5. Análise em cromatografia gasosa

A análise em cromatografia gasosa foi feita com a linhagem CAY337 e as linhagens comerciais de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (tabela 6). Os compostos 2-heptanona, Caproato de etila, 1-hexanol e Ácido benzílico não foram produzidos pela CAY337 e tampouco para as linhagens comerciais utilizadas como controles. Ao observar os compostos acetato de etila, isobutanol, álcool isoamílico e 2-fenil-etanol pode-se inferir que CAY337 produziu quantidades inferiores dos compostos quando comparado as quantidades vistas para *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*. Esses valores se diferenciaram estatisticamente em todos os compostos. O acetato de isoamila foi produzido somente pela CAY337 e a produção do caprilato de etila foi estatisticamente indiferente entre as leveduras estudadas.

Tabela 6 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pela linhagem CAY337 isolada de dorna de fermentação de cachaça.

Levedura	Acetato de etila	Acetato de isobutila	Isobutanol	Acetato de isoamila	2-heptano na	Alcool isoamílico	Caproato de etila
CAY337	37,47 ± 4,49 (a)	0,4 ± 0,03 (b)	58,43 ± 4,58 (a)	1,36 ± 0,23 (b)	0 ± 0	165,77 ± 13,84 (a)	0 ± 0
<i>S. pastorianus</i>	54,81 ± 8,42 (a,b)	0 ± 0 (a)	150,59 ± 27,73 (b)	0 ± 0 (a)	0 ± 0	524,04 ± 107,02 (b)	0 ± 0
<i>S. cerevisiae</i>	81,14 ± 13,05 (b)	0 ± 0 (a)	203,44 ± 45,49 (b)	0 ± 0 (a)	0 ± 0	661,52 ± 173,4 (b)	0 ± 0

Levedura	1-hexanol	Caprilato etila	Caprato etila	Succinato de dietila	Ácido benzílico	Ácido 2-fenil-etila	2-fenil-etanol
CAY337	0 ± 0	0,09 ± 0,01 (a)	0,12 ± 0,02 (a)	2,56 ± 0,15 (a)	0 ± 0	0,54 ± 0,06 (a)	29,28 ± 4,73 (a)
<i>S. pastorianus</i>	0 ± 0	0,15 ± 0,02 (a)	0,64 ± 0,04 (b)	6,3 ± 0,19 (a)	0 ± 0	0 ± 0 (a)	258,61 ± 43,51 (b)
<i>S. cerevisiae</i>	0 ± 0	0,18 ± 0,05 (a)	0,37 ± 0,14 (a,b)	16,66 ± 4,3 (b)	0 ± 0	4,4 ± 1,55 (b)	239,59 ± 65 (b)

*Compostos estão representado em mg / l.

A figura 19 mostra o gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos e faz uma correlação com a tabela 6. Na análise do CP1 e CP2 pose-se observar que CAY337 foi a única a produzir o acetato de isoamila, se mostrando distante em relação as outras linhagens em relação a produção desse composto. No geral, CAY337 produziu menores quantidades de compostos, sendo mais neutra que a linhagem comercial da mesma espécie e *S. pastorianus*. *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* produziram maiores quantidades dos compostos, sendo que *S. pastorianus* produziu maiores quantidades de 2-fenil-etanol e caprato etila e *S. cerevisiae* foi a levedura que produziu maiores quantidade de ácido 2-fenil-etila, succinato de dietila, acetato de etila, isobutanol, caprilato de etila e álcool isoamílico.

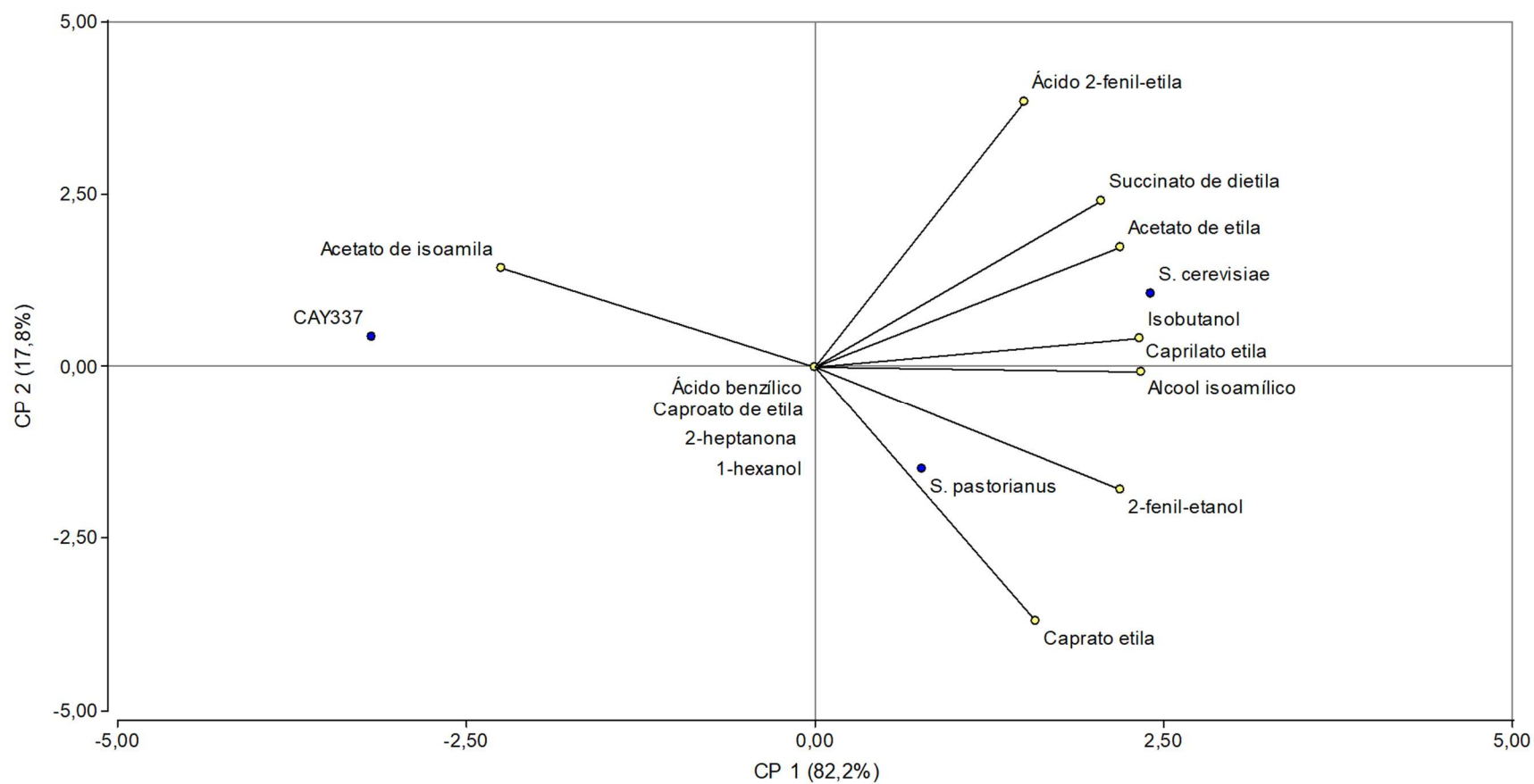


Figura 19 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (T58) e *S. pastorianus* (W3470) e a linhagem CAY337 isolada de dorna de fermentação de cachaça na temperatura de 20 °C.

6. DISCUSSÃO

Para fermentação de bebidas em grande escala, como na fabricação de cerveja, vinho e bebidas destiladas, são utilizadas culturas puras de linhagens previamente selecionadas de *Saccharomyces* spp., enquanto em processos de menor escala (artesanais), a fermentação espontânea é frequentemente desenvolvida pela microbiota indígena encontrada na matéria-prima (WALKER; STEWART, 2016). O presente estudo mostra uma série de evidências que comprova que a fermentação espontânea da cachaça é um excelente ambiente para triagem de leveduras com características cervejeiras. FIGUEIREDO e colaboradores (2017) mostraram que na fermentação da cachaça é possível encontrar leveduras com características para a produção de cervejas *lager*. Essas leveduras produziram compostos aromáticos desejáveis e apresentaram o perfil de floculação adequado para o estilo de cerveja.

6.1. Fermentação da maltose e verificação da produção de H₂S

A capacidade de fermentar a maltose é crucial para uma levedura cervejeira pelo fato de a maltose ser o açúcar mais disponível no mosto cervejeiro (LODOLO et al., 2008). Diante essa informação, o presente estudo iniciou a triagem com a verificação da fermentação desse açúcar e o tempo gasto para o consumo. Das 840 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça, 533 foram capazes de fermentar a maltose na temperatura de 20 e 10 °C, que são as temperaturas mais comumente encontradas para a produção da cerveja. Essas linhagens também foram selecionadas pela capacidade de fermentar a maltose no mesmo e/ou mais rapidamente do que as linhagens controles/comerciais. O metabolismo de maltose pela *S. cerevisiae* depende de diversos fatores como, o número de cópias dos genes dos transportadores, sua indução e ativação dos mesmo pela glicose (STAMBUK; DE ARAUJO, 2001), quantidade adequada de ergosterol na membrana citoplasmática (GUIMARÃES; VIRTANEN; LONDESBOROUGH, 2006) e fontes de nitrogênio do meio (BATISTOTE; HELENA DA CRUZ; ERNANDES, 2006). Diante destas informações, esses fatores podem ser responsáveis pela não fermentação ou demora na fermentação da maltose pelas demais linhagens de *S. cerevisiae*.

Durante a biossíntese do aminoácido metionina, leveduras produzem o sulfeto de hidrogênio (H₂S). Embora seja um passo importante no metabolismo celular, pequenas quantidades de H₂S são prejudiciais, afetando as características organolépticas das bebidas (SAERENS et al., 2010). No presente trabalho, 52 linhagens foram selecionadas por não produzirem o H₂S. Na maioria dos estilos de cerveja o H₂S pode ser considerado como *off-*

flavour (perfil sensoriais indesejável) e sua percepção na bebida não é agradável ao paladar. Existem linhagens já inseridas no mercado que produzem o sulfeto de hidrogênio em pequenas quantidades e que são aceitas pelos consumidores quando empregadas nos estilos adequados. Mesmo que uma levedura produza o H₂S, ele será perceptível ao olfato humano somente quando atingir uma concentração maior do que o limite sensorial de 0,005 mg / l. Acima dessa concentração o H₂S transmite um cheiro de ovo podre (sulfuroso) e mascara fortemente os caracteres desejáveis na cerveja (OKA et al., 2008). Por este motivo, optou-se por continuar os testes com as linhagens que não produziram o composto. A produção do H₂S pelas leveduras acontece no período de fermentação ativa, porém, esse composto tende a diminuir na fase final da fermentação, quando a taxa de CO₂ está baixa e existe pouca quantidade de açúcares fermentescíveis. Com a diminuição dos açúcares a levedura faz a absorção do H₂S e o tempo necessário para o H₂S diminuir abaixo do limiar sensorial está relacionado ao número de células de levedura suspensas (OKA et al., 2008).

6.2. Resistencia aos estresses estudados

O processo de produção da cachaça é considerado um ambiente estressante devido a competição por nutrientes entre os microrganismos, exposição diária a alta concentração de etanol e pressão osmótica, ausência de controle de temperatura e reutilização contínua do inóculo sem tratamento entre os ciclos fermentativos (FARIA-OLIVEIRA et al., 2015). Devido a esses fatores, a fermentação alcoólica da cachaça seleciona naturalmente os microrganismos capazes de suportar diferentes variações físicas e químicas presentes no ciclo de produção da bebida. Essa capacidade de suportar as variações estressantes do processo de produção da cerveja, foi encontrado nas linhagens de *S. cerevisiae* do presente estudo. Somente três linhagens de *S. cerevisiae* não apresentaram crescimento à temperatura de 10 °C e todas as outras linhagens testadas foram capazes de crescer nas temperaturas de 16, 25 e 30 °C. Todas as linhagens testadas foram capazes de crescer nas concentrações de 20, 25 e 30% de glicose. Somente uma linhagem não foi capaz de multiplicar em pH 2,5 e 3,0.

Para o teste de tolerância às concentrações de etanol foi visto que o controle comercial de *S. pastorianus* não foi capaz de crescer a 8% de etanol. Esse resultado foi similar aos encontrados por Belloch e colaboradores (2008), onde a linhagem para a produção de cerveja *lager* foi capaz de crescer até a concentração de 5% de etanol. As linhagens em estudo apresentaram um comportamento semelhante ao encontrado para a linhagem comercial de *S. cerevisiae* utilizada para a produção de cerveja que foi capaz de crescer até a concentração de

12% de etanol. Sessenta e quatro por cento das linhagens apresentaram crescimento até 20% de etanol. O etanol produzido durante a fermentação altera a polaridade da membrana celular e em altas concentrações é capaz de reduzir a multiplicação e a viabilidade da biomassa (LYND et al., 1991). A sobrevivência das células a essas condições estressantes depende de sua capacidade de se adaptar rapidamente às mudanças ambientais presentes nas dornas de fermentação. Deste modo, é de grande interesse avaliar linhagens indígenas de *S. cerevisiae* já utilizadas por destilarias de cachaça, uma vez que essas células foram selecionadas em meios estressantes ao longo dos anos. A escolha da melhor linhagem não se correlaciona necessariamente apenas com a eficiência da produção de álcool, mas também com a resistência aos estresses presentes no ambiente de fermentação (DA SILVA; BATISTOTE; CEREDA, 2013).

Os resultados encontrados para as variações de temperatura (10, 16, 20, 25 e 30 °C) e concentrações de glicose (20, 25, e 30%) também foram similares aos do estudo de Belloch e colaboradores (2008), onde as linhagens estudadas foram capazes de se multiplicar nestas condições quando comparadas as linhagens comerciais de cervejas *ale* e *lager*, e vinho. Atualmente, o mercado cervejeiro é composto por linhagens capazes de fermentar em temperaturas pré-definidas como é o caso de linhagens de *S. cerevisiae* destinadas para a produção de cervejas com temperatura de fermentação variando de 18 e 25 °C. *S. pastorianus*, que é utilizada na indústria cervejeira para a produção de cervejas lagers, fermenta em temperaturas de 8 a 12 °C. Uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de fermentar o mosto cervejeiro em temperaturas baixas, pode oferecer uma cerveja *lager* com características mais esterificadas, características dessa levedura.

6.3. Análise dos açúcares consumidos por meio da fermentação em mosto cervejeiro

Das quarenta e uma linhagens testadas em fermentação de bancada utilizando o mosto cervejeiro, sete não foram capazes de consumir mais de 30 g / l dos açúcares do mosto. Três delas, CAY337, CAY1155 e CAY1764, consumiram mais de 45 g / l dos açúcares totais, incluindo a maltotriose que é um açúcar incomum no metabolismo entre linhagens de *S. cerevisiae* (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 2011). Estudos anteriores foram capazes de selecionar linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a produção de cervejas especiais, mostrando que esse ambiente é propício para a buscas de leveduras cervejeiras. Porém, as linhagens de *S. cerevisiae* encontradas nesses estudos não foram capazes de

fermentar a maltotriose, o segundo açúcar mais comumente encontrado no mosto cervejeiro (MONTADON, 2015; ARAÚJO et al., 2018). A linhagem CAY337 foi isolada em uma cachaçaria da cidade de Jaboticatubas no ano de 1995, a CAY1155 foi isolada de uma destilaria de Montes Claros também no ano de 1995 e a CAY1764 isolada em uma cachaçaria da região de Viçosa no ano de 1998.

A capacidade de CAY337, CAY1155 e CAY1764 terem consumido a maior quantidade dos açúcares disponíveis no mosto pode estar relacionado ao consumo da maltotriose, essa capacidade não foi vista para nenhuma outra levedura estudada. A maltotriose não é um açúcar relacionado ao dulçor da cerveja e está relacionado ao corpo da bebida. Os outros açúcares como, glicose e frutose foram amplamente metabolizados por todas as linhagens. As leveduras consomem os açúcares do mosto de uma maneira sequencial, complexa e altamente regulada. Primeiramente é consumido a glicose e frutose (monossacarídeos), seguido da sacarose e maltose (dissacarídeos) e posteriormente a maltotriose (trissacarídeo). Uma quantidade muito pequena de maltotriose é usada para a formação de polissacarídeos de reserva (glicogênio e trealose). Essa sequência de consumo dos açúcares é consequência da via de repressão de glicose ou via de repressão catabólica (IORIZZO et al., 2021; MENESES; HENSCHKE; JIRANEK, 2002).

6.4. Análise da produção de glicerol, ácido acético e etanol

O glicerol contribui para o corpo e fornece um sabor levemente adocicado para as bebidas fermentadas, influenciando na intensidade do sabor. Como um subproduto principal, o glicerol não só desempenha papéis críticos na osmorregulação da levedura e no balanceamento redox, mas também atua como o competidor do carbono contra o etanol na fermentação alcoólica. Portanto, o aumento do rendimento do glicerol beneficia tanto o sabor quanto a redução do etanol para as bebidas fermentadas (ZHAO; PROCOPIO; BECKER, 2015). O limiar de percepção do glicerol é acima de 10 g / l para as cervejas (BIGGS et al., 2004), portanto, a concentração produzida pelas leveduras do presente estudo não alcançou o valor necessário para ser percebido ao paladar humano. A maior concentração de glicerol foi visto para CAY674b que produziu uma média de 4,34 g / l, esse valor não se diferenciou estatisticamente para grande parte da linhagens estudadas, principalmente para *S. pastorianus*.

Apesar do ácido acético estar presente em alguns estilos de cervejas ácidas, ele é considerado um *off-flavour*. Na maioria das vezes esse composto é produzido por bactérias ou leveduras das espécies *Debaryomyces hansenii* e *Lachancea thermotolerans* (IORIZZO et al.,

2021). Também pode ser produzido em menores concentração por *S. cerevisiae*. A concentração de ácido acético produzido por 58 % da leveduras estudadas foi maior que o visto para a levedura comercial *S. pastorianus* que produziu uma média de 0,16 g / l (160 ppm) do composto. Esses valores são superiores ao valor disponível na literatura para as cervejas ale e lagers que é entre 60-140 ppm (WITRICK; PITTS; O'KEEFE, 2020).

A produção de etanol não se diferenciou estatisticamente para a maioria das linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça. Pode-se verificar também que mesmo não sendo estatisticamente diferentes em relação à produção de etanol, *S. pastorianus* produziu uma quantidade deste composto superior a de *S. cerevisiae*. Quando comparado os estilos de cervejas que cada uma dessas linhagens produzem é observado que as cervejas ale produzidas com *S. cerevisiae*, na maioria das vezes apresentam uma concentração de etanol superior às cervejas lager produzidas com a levedura *S. pastorianus*. Entretanto, a concentração de açúcares no mosto cervejeiro para a produção de cervejas ales é maior em comparação com mosto para a fermentação de cervejas lagers e por isso a levedura tem maior quantidade de açúcares disponíveis no mosto cervejeiro para ser convertido em etanol e outros compostos.

6.5. Análise da produção dos compostos aromáticos produzidos pela levedura

A parte volátil da cerveja inclui mais de 800 compostos diferentes, mas apenas alguns deles são conhecidos por serem ativos para o sabor (OLANIRAN et al., 2017). Grande parte desses compostos, diferentes dos compostos aromáticos presentes no malte e no lúpulo, são sintetizados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e têm importante impacto no aroma e no sabor da cerveja (PIRES et al., 2014). Os ésteres contribuem para uma ampla gama de sabores frutados na composição de bebidas fermentadas (IORIZZO et al., 2021). Por mais que a linhagem CAY337 apresentasse um perfil aromático mais neutro em comparação com as linhagens comerciais, esta foi a única a produzir os ésteres acetato de isobutila (aroma frutado) e o acetato de isoamila (aroma de banana). Em relação aos álcoois superiores, as linhagens comerciais produziram maiores quantidades em relação a CAY337. Uma linhagem com características neutras pode ser utilizada em uma variedade de estilos de cervejas e até mesmo pode-se pensar na utilização dessa linhagem para a produção do estilo de cervejas lagers. Esse estilo apresenta um perfil sensorial neutro (o que foi visto para CAY337) e é produzido em baixas temperaturas (a linhagem apresentou tolerância aos teste de estresse em baixas temperaturas).

7. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo mostraram que dornas de fermentação de cachaça são uma excelente fonte de linhagens de *S. cerevisiae* com características cervejeiras. Foi possível verificar também que essas linhagens foram “pré-selecionadas” na fermentação espontânea da cachaça, onde é encontrado grande variações de pH, concentração de açúcares, temperaturas, etanol e grande competitividade por nutrientes.

Grande parte de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça são capazes de produzir o H₂S em níveis superiores ao encontrado na linhagem comercial estabelecida como controle negativo. Entretanto, é possível fazer a seleção de linhagens com baixa produção desse composto.

As leveduras oriundas de dornas de fermentação de cachaça são tolerantes a uma ampla variação de condições estressantes, tais como variações de temperatura, pH, glicose e etanol e apresentaram um perfil fermentativo semelhantes ou melhor que as linhagens cervejeiras comerciais.

Em relação ao consumo dos açúcares do mosto cervejeiro, as linhagens foram capazes de fermentar todos os açúcares analisados e três delas (CAY337, CAY1155 e CAY1765) se caracterizaram pela fermentação da maltotriose. CAY337 produziu baixas concentrações de compostos aromáticos, sendo assim uma linhagem com possibilidades de aplicação em uma vasta quantidade de estilos de cerveja.

II

Obtenção de híbridos entre *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* para melhorar a qualidade de cerveja, cachaça e vinho

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Microrganismos utilizados para a obtenção de híbridos

Para a obtenção dos híbridos foram utilizadas diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, sendo elas: *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223, previamente caracterizada como boa fermentadora (MONTANDON, 2016); UFMG-CM-Y030 e CAY1031 (ambas licenciadas pela Lallemand), utilizadas para o processo de produção de cachaça. Esses microrganismos pertencem à Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Também foram utilizados os microrganismos provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Biotecnologia dos Alimentos, liderado pela prof. Amparo do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos (IATA) - Espanha. Os microrganismos utilizados são duas linhagens industriais vínicas de *S. cerevisiae*, CIEN5 e CIEN12, e *S. kudriavzevii* CR90F4 e CA111E2. Os isolados de *S. cerevisiae* foram submetidos à hibridação com a linhagem criotolerante de *S. kudriavzevii*. As linhagens comerciais de *S. pastorianus* W3470 (Fermentis) e a *S. cerevisiae* T58 (Fermentis) foram utilizadas como controles industriais cervejeiros (tabela - 7).

Tabela 7 – Linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* utilizadas para o cruzamento espontâneo visando a obtenção de híbridos.

Linhagens	Uso do híbrido
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-CM-Y223 x <i>S. kudriavzevii</i> CA111E2	Cerveja
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-CM-Y030 x <i>S. kudriavzevii</i> CR90F4	Cachaça
<i>S. cerevisiae</i> CAY1031 x <i>S. kudriavzevii</i> CR90F4	Cachaça
<i>S. cerevisiae</i> CIEN5 x <i>S. kudriavzevii</i> CR90F4	Vinho
<i>S. cerevisiae</i> CIEN12 x <i>S. kudriavzevii</i> CR90F4	Vinho

8.2. Preservação das leveduras

Todos os híbridos foram preservados em caldo GYMP (p/v: glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂PO₄ 0,2%) com 20% (v/v) de glicerol em criotubos e estocados em ultrafreezer a -80°C. Os híbridos gerados foram depositados na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG e na coleção do IATA.

8.3. Geração de colônias auxotróficas naturais de leveduras parentais

Para a seleção de isolados auxotróficos foi utilizada a metodologia proposta por Zarett & Sherman (1985), parcialmente modificada por Pérez-Través e colaboradores (2012). As

leveduras parentais utilizadas no estudo, *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223, UFMG-CM-Y030, CAY1031, CIEN5 e CIEN12) e *S. kudriavzevii* (CR90F4 e CA111E2), foram cultivadas em 15 mL de meio YPD (p/v: extrato de levedura 0,5%, peptona bacteriológica 0,5%, glicose 2%) durante 5 dias a 28 °C. Em seguida, 200 µL de cada cultura foram plaqueados em meio ágar α -aminoadípico (α -AA) (p/v: YNB 0,17%, α -AA 0,2%, lisina 0,003%, glicose 2%, ágar 2%), ágar ácido fluoroorótico (5-FOA) (p/v: YNB 0,17 %, 5-FOA 0,1%, uracila 0,001%, prolina 0,1 %, glicose 2%, ágar 2%) e ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA) (p/v: YNB 0,17%, 5-FAA 0,05%, glicose 5%, ágar 2%), para selecionar colônias mutantes de *lys*⁻, *ura3*⁻ e *trp*⁻ naturais, respectivamente. Um mililitro de cada cultura foi inoculado novamente em 15 mL de meio YPD e incubado nas mesmas condições. Este processo foi repetido quatro vezes. As colônias que crescerem nos meios α -AA, 5-FOA e 5-FAA foram repicadas novamente em meio YPD para posterior confirmação da presença da auxotrofia. As células foram cultivadas em caldo YPD durante 24 horas e em seguida cultivadas em caldo de inanição (p/v: YNB sem aminoácidos 0,1% e glicose 0,1%) durante 4 horas a 28 °C. Subsequentemente, alíquotas de 5µL foram pipetadas sobre placas de YPD, meio mínimo (MM) (p/v: YNB sem aminoácidos 0,17%, glicose 2% e ágar 2%) e MM suplementado com prolina (0,1% p/v) e uracila (0,001% p/v), lisina (0,003% p/v) ou triptofano (0,05% p/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 °C.

8.4. Cruzamento espontâneo “rare-mating”

O procedimento foi feito como proposto por Spencer & Spencer (1996) e Pérez-Través e colaboradores (2012). As leveduras que continham os marcadores auxotróficos foram cultivadas separadamente em 25 ml de caldo YPD durante 48 horas a 28 °C. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em meio YPD. Pares das leveduras a serem hibridizadas foram misturadas no mesmo tubo e 200 µL destas misturas foram inoculados em 2 ml de caldo YPD. Após 5, 7 e 10 dias de incubação estática em posição inclinada a 28 °C, as células foram centrifugadas a 3.000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente e lavadas com água destilada estéril. Após esse procedimento, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio de inanição e incubadas durante 2 horas a 28 °C. Uma alíquota de 200 µl foi adicionada em meio mínimo e incubada a 28 °C. Para confirmação da hibridação foram feitas análises moleculares utilizando genes nucleares codificadores da proteína MAG₂, GSY₁ e KEL₂, como descrito no item 8.5.2.

8.5. Análises moleculares

8.5.1. Extração do DNA total

O DNA genômico total das leveduras foi obtido de acordo com os procedimentos de Querol e colaboradores (1992) com algumas modificações. As leveduras foram cultivadas em Eppendorf de 1,5 mL com 1 mL de YPD durante 48 horas a 28 °C e sob agitação 100 xg. As células crescidas foram centrifugadas a 7.000 xg por 5 minutos e suspensas em 500 µL de solução sorbitol (1M de sorbitol, 0,1M de EDTA e pH 7,5), 30 µL de Zymolyase 20 T (1 mg / ml) e incubadas a 37 °C por 20 minutos, a fim de obter esferoplastos. Os esferoplastos foram centrifugados a 7.000 xg por 3 minutos e suspensos em 500 µL de solução de Tris HCl (Tris HCl 50 mM e EDTA 20 mM com pH 7,4) e 13 µL de dodecilsulfato de sódio a 10% e incubadas a 65 °C durante 5 minutos. Imediatamente, foram adicionados 200 µL de acetato de potássio 5 M e os tubos foram colocados em gelo durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA foi precipitado pela adição de isopropanol (v/v) e colocados em gelo por mais 10 minutos. Após o processo a frio, o DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 25µL de água mQ estéril.

8.5.2. Análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição dos produtos de DNA amplificado (PCR-RFLP)

A natureza híbrida entre as espécies do gênero de *Saccharomyces* foi confirmada pela amplificação por PCR dos genes nucleares codificadores da proteína MAG₂ (*Forward* 5'-ATGGTAGAACCGGATATGCAGAARAARGC – Reverse 5'-AGCTCCAAGGAATTAGATACACCRCAITTCAT, GSY₁ (*Forward* 5'-ATTGGAAAAAGAATTTTCGAGCAYACRATGAG – Reverse 5'-AATTTCTTGCCACCGGCAAGGGTATTCATATT) e KEL₂ (*Forward* 5'-TATCTTTTCAATATTAATTCTTAYAARTGGAC – Reverse 5'-GCAGTTTCAAGTTCYTTYTGYTG), seguido da análise RFLP utilizando a enzima de restrição *MspI* como proposto por González e colaboradores (2008). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X (Fermentas), 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM (Nzytech genes y enzimas, Portugal), 4 µL de dNTP 2,5 mM, 1 µL dos iniciadores a 50µmol.µL⁻¹ (MWG Biotech), 2 µL de DNA a 100-250 ng, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U.µL⁻¹ (Nzytech genes y enzimas) e 34,25 µL de água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Eppendorf flexlid nexus SXle.

O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 2 minutos de anelamento a 56 °C, 2 minutos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Os *amplicons* foram corados pela adição de RedSafe (Intron Biotechnology, USA) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Gelprincer Plus). Um padrão de peso molecular de DNA de 100 e 50 pb (Thermo Scientific) serviu como um padrão. Quinze microlitros dos produtos de PCR foram digeridos com 5 µL da enzima de restrição (Thermo Scientific) por 2 horas a 37 °C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 3% (Pronadisa) em tampão TBE 0,5X. Uma combinação de padrões moleculares de DNA de 50 pb e 100 pb (Roche Molecular Biochemicals) serviu como padrão de tamanho de DNA.

8.5.3. Análise do polimorfismo do fragmento de restrição mitocondrial de DNA (mtDNA-RFLP)

A análise de restrição de DNA mitocondrial foi realizada para a caracterização das leveduras de acordo com o método de Querol e colaboradores (1992) utilizando a endonuclease *Hinfi* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha). O DNA foi extraído de acordo com o item 4.5.1. e em seguida 20 µL do DNA foi digerido com 1 µL de enzima *Hinfi* acrescido de 2 µL de tampão 10X (Thermo Scientific) e 1 µL de RNase (Thermo Scientific) por 2 horas a temperatura de 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1% (Pronadisa) em tampão TBE 0,5X. Os *amplicons* foram corados pela adição de RedSafe (Intron Biotechnology, USA) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Gelprincer Plus). O padrão de peso molecular Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific) foi utilizado.

8.5.4. Análise randômica de DNA polimórfico amplificado (RAPD)

A análise de DNA polimórfico para confirmação da estabilidade do híbrido foi feita de acordo com Fernandez-Espinar e colaboradores (2003) e Corte e colaboradores (2005). Para essa análise foi realizada uma reação de PCR utilizando o iniciador R3 (5'-ATG- CAGCCAC-3') em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão 10X (Thermo Scientific), 1,75 µL de MgCl₂ 50 mM (Nzytech genes y enzimas), 2 µL de dNTP 2,5 mM, 0,1 µL do iniciador a 50µmol.µL⁻¹ (MWG Biotech), 10 µL de DNA a 10 ng, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U.µL⁻¹ (Nzytech genes y enzimas) e 8,45 µL de água ultrapura esterilizada. As reações de PCR

foram realizadas utilizando o termociclador Eppendorf flexlid nexus SX1e. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 36 °C, 2 minutos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Os amplicons foram corados pela adição de RedSafe (Intron Biotechnology, USA) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Gelprincer Plus). Foi utilizado um padrão de peso molecular de DNA de 100 e 50 pares de base (Thermo Scientific).

8.5.5. Análise da amplificação do DNA polimórfico inter- δ

Para a comprovação da estabilidade híbrida, também foi realizada amplificação da região inter- δ de acordo com Legras e Karst (2003), utilizando os iniciadores delta 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') e delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'). A reação de PCR consistiu de um volume final de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão 10X (Fermentas), 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM (Fermentas), 2,5 μ L de dNTP 2,5 mM, 0,5 μ L de cada iniciador a 50 μ M (MWG Biotech), 20 μ L de DNA a 10 ng, 0,2 μ L de Taq DNA Polimerase 1,25 U. μ L⁻¹ (Fermentas) e 15,3 μ L de água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Eppendorf flexlid nexus SX1e. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento a 46 °C, 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Os amplicons foram corados pela adição de RedSafe (Intron Biotechnology, USA) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Gelprincer Plus). Foi utilizado um padrão de peso molecular de DNA de 100 e 50 pb (Thermo Scientific).

8.6. Estabilização genética do híbrido

8.6.1. Estabilização dos híbridos por meio da esporulação

A estabilidade dos híbridos obtidos foi verificada por meio da análise molecular dos esporos dissecados dos híbridos. A esporulação da levedura foi induzida por incubação em meio acetato (p/v: CH₃COONa 1%, glicose 0,1%, extrato de levedura 0,125% e ágar 2%) por 5 a 7 dias a 28 °C, como descrito por Pérez-Través e colaboradores (2012 e 2014). Após a esporulação, uma quantidade de células foi inoculada em 100 μ l de glucuronidase (Sigma) e

mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos para que as paredes das ascas fossem lisadas. Após a digestão preliminar das paredes das ascas, os esporos foram dissecadas em meio YPD utilizando um micromanipulador Singer MSM Manual e mantidos na temperatura de 25°C por até 5 dias. Os esporos viáveis foram plaqueados em um novo meio YPD e posteriormente criopreservados. A comprovação da estabilidade híbrida dos esporos foi confirmada pela PCR-RFLP descrita no item 8.5.2 (GONZÁLEZ et al., 2007). A análise do perfil de restrição do mtDNA foi realizada conforme o item 8.5.3.

8.6.2. Estabilização dos híbridos por meio de fermentação

A verificação da estabilização genética do híbrido também foi feita por fermentação em mosto como descrito anteriormente por Pérez-Través e colaboradores (2012) com algumas modificações. Os híbridos obtidos por meio da técnica descrita no item 8.6.1 foram inoculados individualmente em 20 ml de mosto (cachaça e vinho em mosto sintético, e cerveja em mosto preparado com extrato de malte como descrito no item 8.7) e incubados a 25 °C sem agitação. Após a fermentação por aproximadamente 5 dias, alíquotas de 1 ml foram inoculadas em 20 ml de mosto e posteriormente incubadas novamente na temperatura de 25 °C. Após cinco fermentações sucessivas, 200 µl do meio de fermentação foi plaqueado em YPD e incubado a 25 °C. Dez colônias foram selecionadas aleatoriamente e realizou-se as análises moleculares da região inter- δ (item 8.5.5) e RAPD-R3 (item 8.5.4). Foram considerados híbridos geneticamente estáveis as colônias que mantiverem o mesmo padrão para os testes moleculares em comparação com as linhagens originais (parentais).

8.7. Mostos utilizados nas fermentações em escala laboratorial

8.7.1. Mosto de cerveja

A preparação do mosto cervejeiro foi feita de acordo com o item 4.3.1.

8.7.2. Mosto sintético de cachaça

O mosto sintético utilizado para a fermentação da cachaça foi desenvolvido pela equipe de pesquisa da professora Amparo Querol (dados ainda não estão publicados). A elaboração do mosto sintético de cana de açúcar foi delineada seguindo os parâmetros de Prati e Camargo (2008). O caldo de cana preparado da seguinte maneira (p/v) glicose 10%; frutose 10%; sacarose 20,1%; ácido cítrico 1-hidratado 0,8%; DL-ácido málico 0,18%; Minerais: KH_2PO_4 0,075%; K_2SO_4 0,05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0155%; NaCl 0,02%; NH_4Cl

0,0276%; Aminoácidos: tirosina 0,074%; isoleucina 0,173%; ácido aspártico 0,411%; ácido glutâmico 0,440%; arginina 0,180%; leucina 0,337%; treonina 0,016%; glicina 0,318%; glutamina 3,84%; alanina 0,293%; valina 0,284%; metionina 0,036%; fenilalanina 0,173%; serina 0,22%; histidina 0,066%; lisina 0,118%. A composição de aminoácidos e NH_4Cl foi baseado no estudo de Du Toit e colaboradores (1984). A composição de vitaminas e oligoelementos foi obtida a partir do meio descrito por Verduyn e colaboradores (1992). Essa mistura também contém ferro, elemento naturalmente presente no mosto de cana-de-açúcar. Vitaminas: Myoinositol 2,5%; pantotenato de cálcio 0,1%; tiamina hidrocloreto 0,1%; ácido nicotínico 0,1%; piridoxina hidrocloreto 0,1%; biotina 0,05 %; ácido 4-aminobenzoico 0,02%; Oligoelementos: Na_2EDTA 1,5%; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,45%; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03%; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,03%; Na_2MoO_4 0,04%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,5%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3%; H_3BO_3 0,1%; KI 0,01% e fatores de anaerobiose: ergosterol 0,001% e Tween 80 0,042% dissolvido em etanol. Em seguida o pH foi ajustado para 5,4 com NaOH (1M) e a solução filtrada com filtro estéril com poro de diâmetro de 0,22 μm .

8.7.3. Mosto sintético de vinho

As fermentações em escala laboratorial de vinho foram realizadas em mostos sintéticos com base na receita de Rossigno e colaboradores (2003). O mosto foi preparado da seguinte maneira (p/v): glicose 10%; frutose 10%; ácido cítrico 1-hidratado 0,05%; L(+)-ácido tartárico 0,3%; DL-ácido málico 0,5%; KH_2PO_4 0,075%; K_2SO_4 0,05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0155%; NaCl 0,02%; NH_4Cl 0,0276%; Aminoácidos: tirosina 0,15%; triptofano 1,34%; isoleucina 0,25%; ácido aspártico 0,34%; ácido glutâmico 0,92%; arginina 2,83%; leucina 0,37%; treonina 0,58%; glicina 0,14%; glutamina 3,84%; alanina 1,12%; valina 0,34%; metionina 0,24%; fenilalanina 0,29%; serina 0,6%; histidina 0,26%; lisina 0,13%; cistina 0,15%; prolina 4,61; Vitaminas: Mioinositol 0,2%; pantotenato de calcio 0,015%; tiamina hidrocloreto 0,025%; ácido nicotínico 0,02%; piridoxina hidrocloreto 0,0025%; biotina 0,003 mg / l; Oligoelementos: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4%; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4%; $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1%; KI 0,1%; $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04%; H_3BO_3 0,1%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1% e fatores de anaerobiose: ergosterol 1,5%; ácido oleico 0,5%; Tween 80 0,05% dissolvido em etanol. Em seguida o pH foi ajustado para 3,3 com NaOH (1M), e então a solução foi filtrada com filtro estéril com diâmetro de 0,22 μm .

8.8. Fermentações em escala laboratorial

As fermentações em escala laboratorial e os métodos para análise dos compostos produzidos foram feitas de acordo com os itens 4.3, 4.4 e 4.5.

9. RESULTADOS

9.1. Híbridos cervejeiros

No presente trabalho foi feito o cruzamento espontâneo entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* por meio de mutantes auxotróficos para lisina, uracila e triptofano. Para que ocorresse a hibridação, foi necessário encontrar pares complementares de mutantes auxotróficos, para que posteriormente fosse possível fazer a hibridação. Após sucessivas fermentações e plaqueamento em meio mínimo foi possível obter mutantes da linhagem *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223 para lisina e triptofano, mutantes para triptofano para a linhagem CAY337 e mutantes de lisina para a linhagem UFMG-CM-Y030. Para as linhagens de *S. kudriavzevii* foi obtido o mutante para lisina da CA111E2 e triptofano para CR90F4 (tabela - 8). Após a obtenção dos mutantes auxotróficos foi realizada uma análise do DNA mitocondrial para confirmar que os mutantes auxotróficos apresentam o perfil mitocondrial idêntico ao da linhagem original.

Tabela 8 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos cervejeiros.

		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-CM-Y223			<i>S. cerevisiae</i> CAY337			<i>S. cerevisiae</i> UFMG-CM-Y030		
		<i>lys-</i>	<i>ura-</i>	<i>trp-</i>	<i>lys-</i>	<i>ura-</i>	<i>trp-</i>	<i>lys-</i>	<i>ura-</i>	<i>trp-</i>
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	CA 111 E2	<i>lys-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
		<i>ura-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
		<i>trp-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>S. kudriavzevii</i>	CR 90 F4	<i>lys-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
		<i>ura-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
		<i>trp-</i>	■	■	■	■	■	■	■	■

*Células com tracejado informa que não foi obtido o mutante auxotrófico para aquele determinado aminoácido.

Para que ocorresse a hibridação entre as linhagens auxotróficas, pares complementares das linhagens de interesse para hibridação foram crescido juntos e plaqueados em meio mínimo. As colônias crescidas foram consideradas híbridas. Não foram obtidos híbridos a partir do cruzamento entre as linhagens mutantes auxotróficas CR 90 F4 (*trp-*) x UFMG-CM-Y223 (*lys-*) e CA 111 E2 (*lys-*) x UFMG-CM-Y030 (*trp-*), o que é comum nessa técnica devido ao fato de não ocorrer nenhuma manipulação externa. Essas tentativas de cruzamento estão sinalizadas com um X na tabela 10.

Para confirmação da hibridação entre as linhagens UFMG-CM-Y223xCA111E2 e UFMG-CM-Y030xCR90F4 foi feita a amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY₁ e MAG₂. A confirmação do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2 pode ser visualizada na figura 20. A primeira amostra apresenta o mesmo padrão de bandejamento das duas linhagens parentais que estão na terceira e quarta canaleta e a segunda amostra apresenta um perfil de bandejamento igual somente a linhagem parental de *S. kudriavzevii*, confirmando a hibridação somente na primeira amostra.

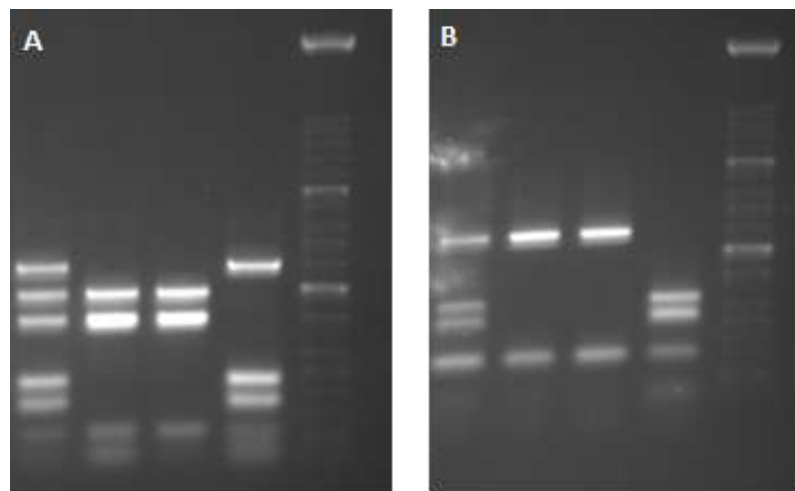


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose confirmando a hibridação da linhagem UFMG-Y223xCA111E2 através da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY₁ e MAG₂. **A)** Ordem do gel: 1º- possível híbrido, 2º-possível híbrido, linhagem parental de *S. kudriavzevii*, linhagem parental de *S. cerevisiae* e padrão de peso molecular; **B)** MAG₂ – sequência igual ao GSY₁.

Para o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4 foi feito a confirmação de hibridação para três linhagens. A figura 21 mostra o gel de eletroforese da PCR-RPLP utilizando o iniciador GSY₁ e MAG₂. A ordem disposta no gel de eletroforese é a seguinte: padrão de peso molecular, linhagem parental de *S. cerevisiae*, linhagem parental de *S. kudriavzevii*, os três possíveis híbridos e novamente o padrão de peso molecular seguido da mesma ordem das amostras. A primeira seção de canaletas é com a utilização do iniciador GSY₁ e a segunda com iniciador MAG₂. Desse modo, pode-se observar que os três híbridos apresentaram o mesmo padrão de bandejamento das duas linhagens parentais, confirmando a hibridação nas três linhagens obtidas. Para separação e organização, as amostras foram nomeadas por UFMG-CM-Y030xCR90F4(1), UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) e UFMG-CM-Y030xCR90F4(3).

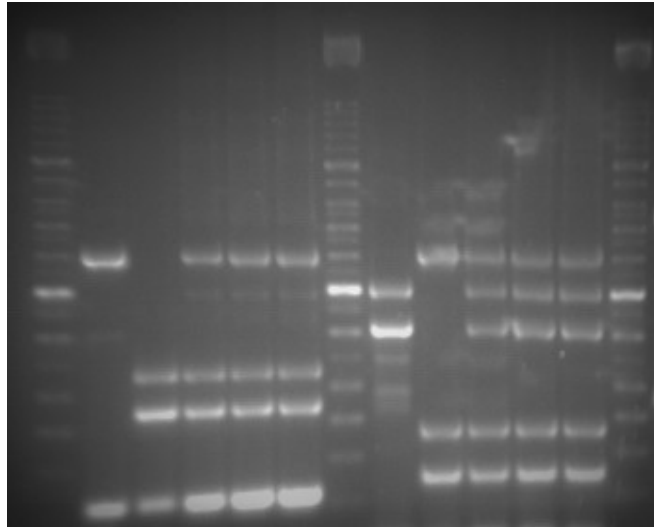


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose confirmando a hibridação da linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4 por meio da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY₁ e MAG₂. Ordem das amostras: Padrão de peso molecular, parental de *Saccharomyces cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii*, os três possíveis híbridos e novamente o padrão de peso molecular seguido da mesma ordem das amostras anteriores. A primeira seção de amostras antes do padrão de peso molecular central é utilizando o iniciador GSY₁ e posteriormente o iniciador MAG₂.

9.1.1. Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2

Após a confirmação de hibridação pela técnica de RFLP, foram feitos diversos testes para atestar a estabilidade do híbrido gerado. Dentre estes testes, foi realizada a caracterização molecular das colônias originadas a partir dos esporos gerados pelos híbridos. Esses esporos foram dissecados e plaqueados em meios de cultura e, após o crescimento das colônias de leveduras as mesmas foram caracterizadas por meio da utilização dos iniciadores GSY₁, KEL e MAG₂ utilizando a técnica PCR-RFLP (tabela - 9). Dentre os 243 esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2, somente 13 foram viáveis e cresceram em meio YPD.

Tabela 9 – Resumo dos testes para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2.

Esporos	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	KEL ₁ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	inter- δ	RAPD-R3	
1	CK	C	CK	Y223	*	Iguais	Iguais
2	CK	C	CK	Y223			
3	CK	C	CK	Y223			
4	CK	C	C	Y223	*	Iguais	Iguais
5	CK	C	CK	Y223			
6	C	CK	CK	Y223	*	Iguais	Iguais
7	CK	C	CK	Y223			

Esporos	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	KEL ₁ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	inter- δ	RAPD-R3	
8	CK	C	CK	Y223			
9	CK	C	CK	Y223			
10	CK	C	CK	Y223			
11	CK	C	CK	Y223			
12	C	C	C	Y223			
13	CK	C	CK	Y223	*	Iguais	

*CK: *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* C: *S. cerevisiae* e K: *S. kudriavzevii*. GSY₁, KEL e MAG₂: iniciadores codificadores do gene que amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. Padrões moleculares obtidos por mtDNA-RFLP (mtDNA), polimorfismos de DNA de sequência interdelta (δ -PCR) e análise de RAPD utilizando o iniciador R3 (RAPD-R3). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

Os iniciadores GSY₁, KEL e MAG₂ amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. A tabela 9 mostra a diferenciação entre os esporos. Os esporos que foram caracterizados como CK apresentaram o perfil de bandeamento das espécies *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*, e aqueles que foram caracterizados somente com uma das letras, C ou K apresentaram o perfil de bandeamento de *S. cerevisiae* ou *S. kudriavzevii*, respectivamente. Como a técnica de hibridação espontânea ocorre de forma aleatória, esse processo é importante para a caracterização dos híbridos e confirmação de sua estabilidade. O esporo 12 apresentou somente o alelo característico de *S. cerevisiae* para todas as regiões estudadas, portanto, o isolado foi descartado para os outros testes, já que está característica pode nos informar que a levedura potencialmente híbrida perdeu suas características ou voltou a sua forma parental após a dissecação dos esporos.

Na figura 22 observar-se os géis de eletroforese das três análises RFLP's, GSY₁, MAG₂ e KEL₁ que foram utilizados para a elaboração da tabela 9, fazendo a comparação de bandeamento das linhagens parentais e caracterizando os esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2. Outra forma de caracterização das colônias originadas dos esporos foi por meio da análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial, onde todos os esporos estudados apresentam o perfil de restrição do DNA mitocondrial igual a linhagem parental de *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223.

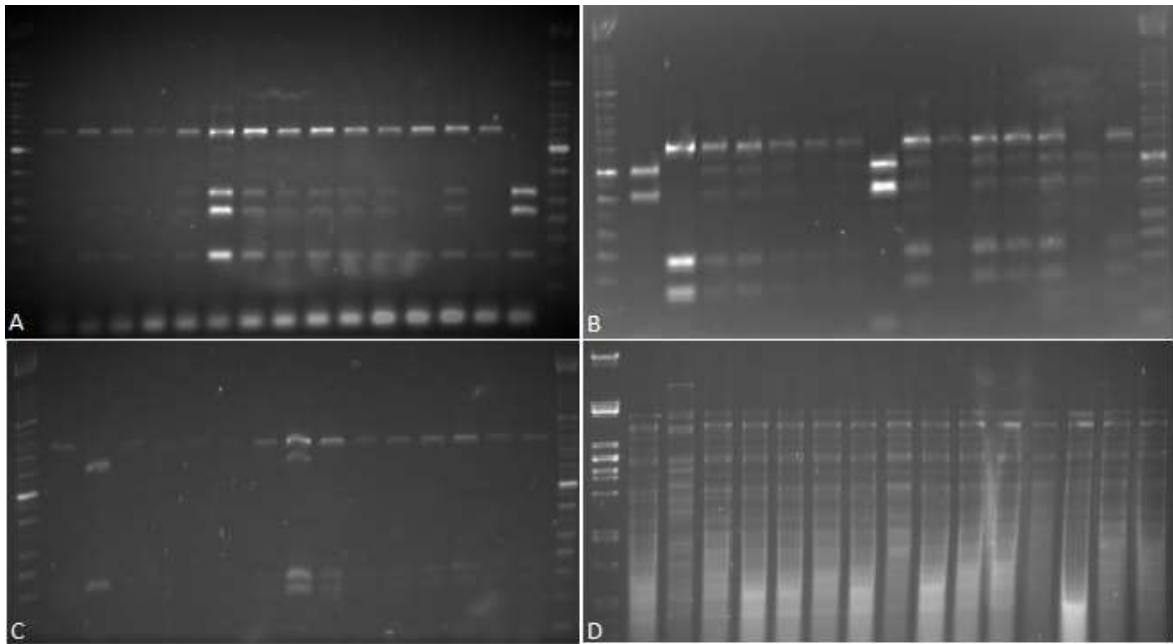


Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2 utilizando os genes codificadores de proteínas GSY₁, KEL e MAG₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial. **A)** GSY₁ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, 13 esporos viáveis do híbrido, levedura parental de *Saccharomyces cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e padrão de peso molecular. **B)** MAG₂ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii*, 13 esporos viáveis do híbrido e novamente o padrão de peso molecular. **C)** KEL – ordem das amostras igual ao MAG₂ e **D)** DNA mitocondrial – ordem das amostras igual ao MAG₂.

Após a caracterização das colônias de levedura originadas dos esporos foi feito um agrupamento entre as linhagens que apresentaram o mesmo padrão de bandejamento para os iniciadores GSY₁, MAG₂ e KEL₁. Em seguida selecionou-se os esporos 1, 4, 6 e 13, sendo que o esporo 1 e 13 apresentaram o mesmo perfil de bandejamento (tabela 8). Foram realizadas sucessivas fermentações em extrato de malte com as 4 colônias originadas dos esporos selecionados e em seguida uma alíquota de 200 µL foi plaqueada em meio YPD e selecionou-se 10 colônias para confirmação da estabilidade após a fermentação. Para a confirmação de estabilidade das colônias foi feito a PCR inter- δ e a PCR-RAPD com o iniciador R3. Os géis de eletroforese para a confirmação de similaridade entre as colônias isoladas e o híbrido original encontram-se na figura 23.

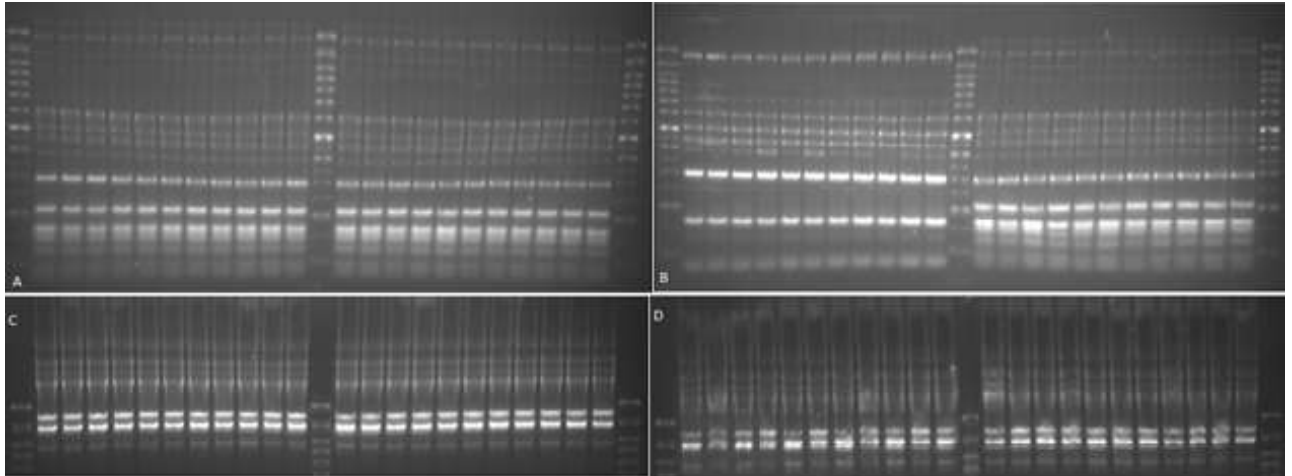


Figura 23 – Confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2. **A)** inter- δ das colônias do esporo 1 e 4. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 1 isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 4 isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **B)** inter- δ das colônias dos esporos 6 e 13. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 6 isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, 10 colônias originadas do esporo 13 isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **C)** RAPD-R3 das colônias do esporo 1 e 4, seguindo a mesma ordem da letra A. **D)** RAPD-R3 das colônias do esporo 6 e 13, seguindo a mesma ordem da letra B.

Como mostrado na figura 23, todas as colônias isoladas da fermentação apresentaram o mesmo padrão de bandejamento do híbrido original, atestando que o híbrido é estável mesmo após sucessivas fermentações em mosto cervejeiro.

9.1.2. Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4

Os três híbridos entre as linhagens UFMG-CM-Y030xCR90F4 passaram por indução da esporulação, porém, somente a linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) foi capaz de esporular em meio acetato potássico. Foram dissecados 71 esporos do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) e 23 esporos viáveis foram obtidos (tabela - 10). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

Tabela 10 – Caracterização e estabilização do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2).

Esporos	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	KEL ₂ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	Inter- δ	RAPD-R3	
1A	CK	CK	CK	UFMG-CM-Y030	*	iguais	Iguais
1B	CK	CK	CK	UFMG-CM-Y030			
2A	CK	C	C	UFMG-CM-Y030	*	iguais	Iguais
2B	CK	C	C	-			

3A	CK	C	CK	-	*	iguais	Iguais
3B	C	C	CK	UFMG-CM-Y030	*	iguais	Iguais
5A	CK	C	C	UFMG-CM-Y030			
5B	CK	C	C	-			
6A	CK	C	C	UFMG-CM-Y030			
7	C	CK	CK	UFMG-CM-Y030	*	iguais	Iguais
8	C	C	CK	UFMG-CM-Y030			
9	CK	C	C	UFMG-CM-Y030			
10	CK	C	CK	UFMG-CM-Y030			
11A	CK	C	C	-			
11B	CK	C	C	-			
12A	CK	-	-	-			
13A	CK	CK	CK	UFMG-CM-Y030			
14A	CK	-	C	-			
15A	CK	C	C	-			
16A	CK	C	CK	UFMG-CM-Y030			
16B	CK	CK	C	UFMG-CM-Y030	*	Iguais	Diferentes
16C	CK	CK	C	UFMG-CM-Y030	*	Iguais	Iguais
17	CK	CK	CK	UFMG-CM-Y030			

*CK: *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* C: *S. cerevisiae* e K: *S. kudriavzevii*. GSY₁, KEL e MAG₂: iniciadores codificadores do gene que amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. Padrões moleculares obtidos por mtDNA-RFLP (mtDNA), polimorfismos de DNA de sequência interdelta (δ -PCR) e análise de RAPD utilizando o iniciador R3 (RAPD-R3). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

A caracterização e agrupamento dos esporos viáveis pela técnica de PCR-RFLP estão apresentados resumidamente na tabela 10. Os géis de eletroforese para comparação e confirmação de bandamento podem ser vistos na figura 24. O agrupamento dos esporos foi feito da mesma forma que foi feito para o híbrido anterior, sendo selecionados os esporos 1A, 2A, 3A, 3B, 7, 16B e 16C. Na análise do DNA mitocondrial (figura 24), para algumas linhagens originadas dos esporos não se obteve resultado da tentativa de digestão enzimática do DNA e com isso, não foi possível caracteriza-los de acordo com a linhagem parental. Para as linhagens onde foi possível a digestão do DNA, os perfis resultantes foram similares á linhagem parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y030.

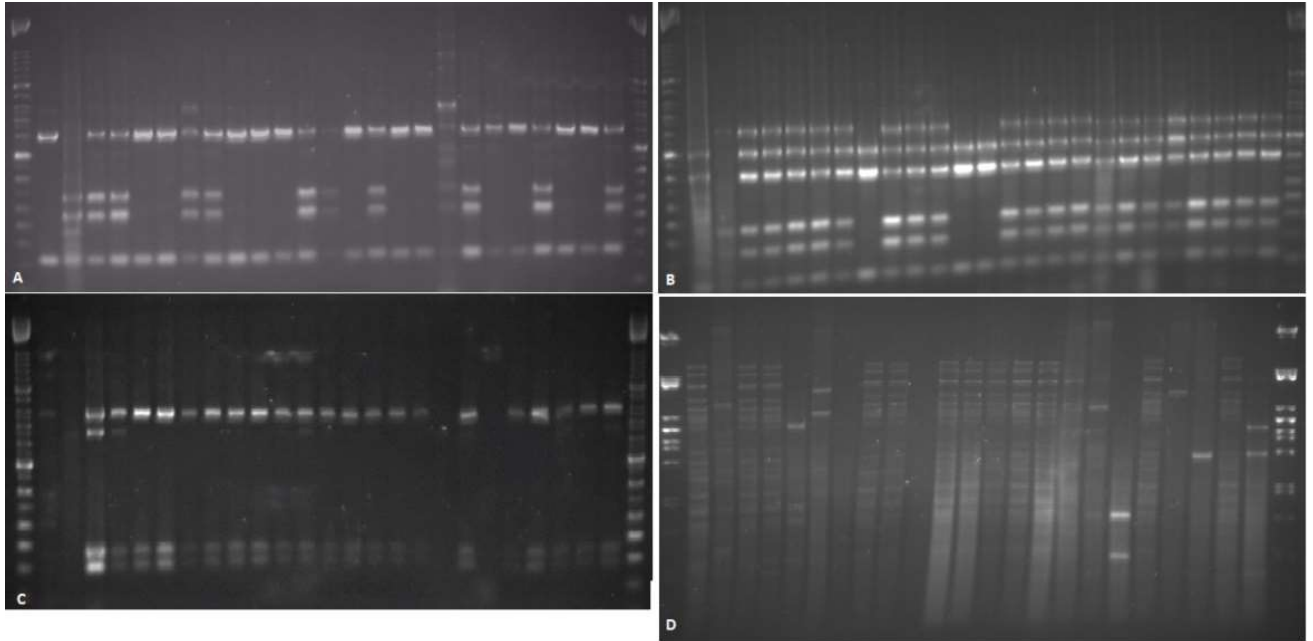


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) utilizando os genes codificadores de proteínas GSY₁, KEL e MAG₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial. **A)** GSY₁ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *Saccharomyces cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii*, 23 esporos viáveis do híbrido e padrão de peso molecular. **B)** MAG₂ – ordem das amostras igual ao GSY₁. **C)** KEL – ordem das amostras igual ao GSY₁. **D)** DNA mitocondrial – ordem das amostras igual ao GSY₁.

Após sucessivas fermentações e isolamento das colônias, observou-se que todas as colônias originárias do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2) apresentaram o mesmo padrão de bandejamento do híbrido original na análise polimórfica inter- δ . Somente o esporo 16B não apresentou os mesmos padrões de bandejamento do híbrido original para a PCR RAPD-R3, sendo portanto descartado dos próximos experimentos (figura 25). A incapacidade de se manter estável, não apresentando o mesmo perfil genético do híbrido original após a esporulação caracteriza um híbrido incapaz de ser inserido futuramente no mercado.

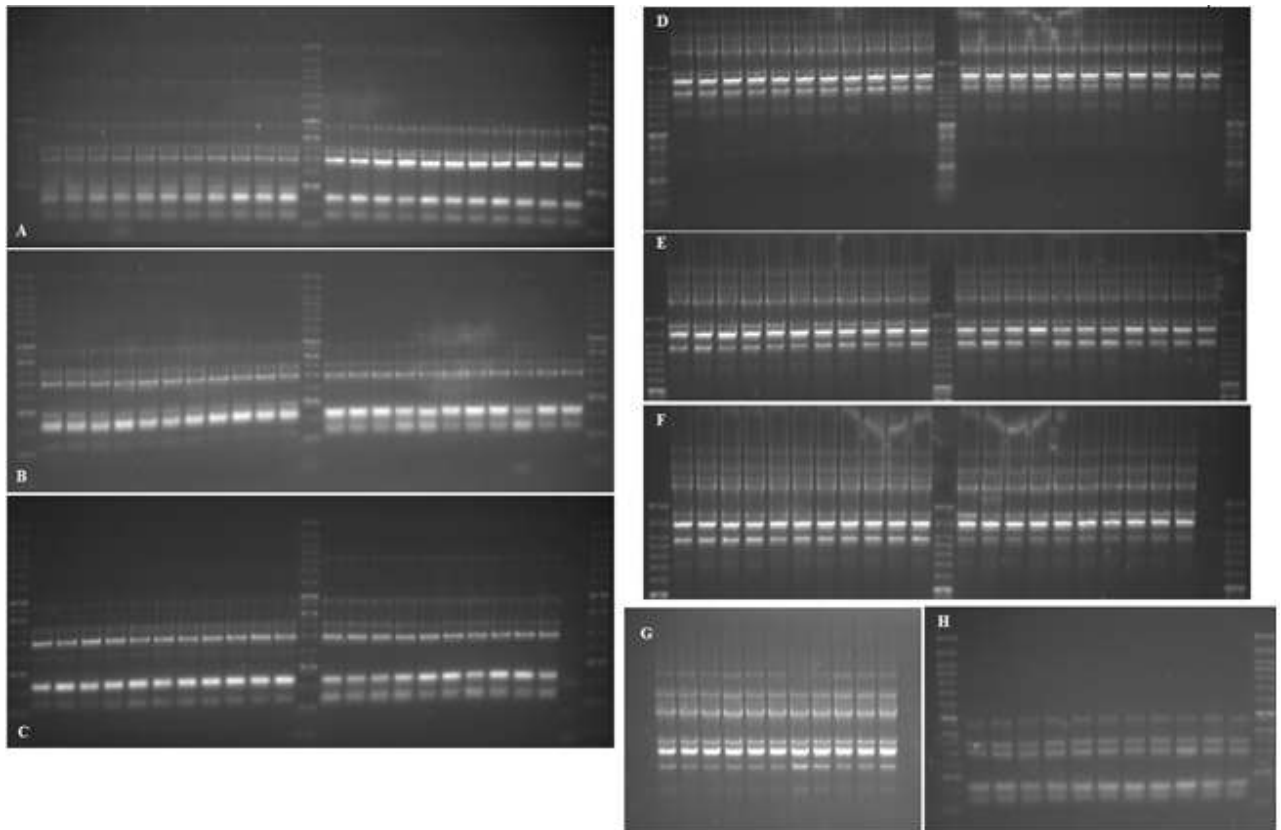


Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose da estabilidade do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2). **A)** Inter- δ das colônias do esporo 1A e 2A. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 1A isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, 10 colônias originadas do esporo 2A isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **B)** Inter- δ das colônias dos esporos 3A e 3B. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 3A e 3B. **C)** Inter- δ das colônias dos esporos 7 e 16B. Ordem das amostras similar a letra B. **D)** RAPD-R3 das colônias do esporo 1A e 2A. Mesma ordem das amostras que a letra A. **E)** RAPD-R3 das colônias do esporo 3A e 3B. Mesma ordem das amostras que a letra B. **F)** RAPD-R3 das colônias do esporo 7 e 16B. Mesma ordem das amostras que a letra C. **G)** Inter- δ das colônias do esporo 16C. Ordem das amostras: híbrido original e 10 colônias originadas do esporo 16C. **H)** RAPD-R3 das colônias do esporo 16C. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 16C e o padrão de peso molecular.

9.1.3. Fermentação em escala laboratorial dos híbridos cervejeiros

O teste de fermentação em escala laboratorial foi feito com as linhagens parentais, os híbridos que se mostraram estáveis e com duas linhagens controles industriais (tabela 11). A linhagem UFMG-CM-Y030 é utilizada para a produção de cachaça, entretanto, Montandon (2016) mostrou que essa linhagem apresentou características cervejeiras e portanto também foi utilizada para a produção dos híbridos cervejeiros.

Tabela 11 – Híbridos utilizados para a fermentação do mosto cervejeiro em escala laboratorial

Linhagens para a fermentação de bancada	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T58 (Fermentis)	
<i>S. pastorianus</i> W3740 (Fermentis)	
UFMG-CM-Y223	UFMG-CM-Y030
CA111E2	CR90F4
UFMG-CM-Y223xCA111E2-1	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-1A
UFMG-CM-Y223xCA111E2-4	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-2A
UFMG-CM-Y223xCA111E2-6	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-3A
UFMG-CM-Y223xCA111E2-13	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-3B
	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-7
	UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)-16C

Híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2

A figura 26 mostra o acompanhamento da fermentação em escala laboratorial utilizando os híbridos das linhagens UFMG-CM-Y223xCA111E2 e as linhagens comerciais de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*. É mostrado na figura que a fermentação vigorosa iniciou após 24 horas da inoculação das leveduras estudadas e controles. A linhagem comercial de *S. cerevisiae* T58 apesar de ser amplamente utilizada para fermentações nas temperaturas de 20 °C, é também utilizada na fermentação de alguns estilos de cervejas *lagers* na temperaturas de 10°C, portanto, a capacidade dessa levedura em fermentar em baixas temperaturas é difundida no meio cervejeiro.

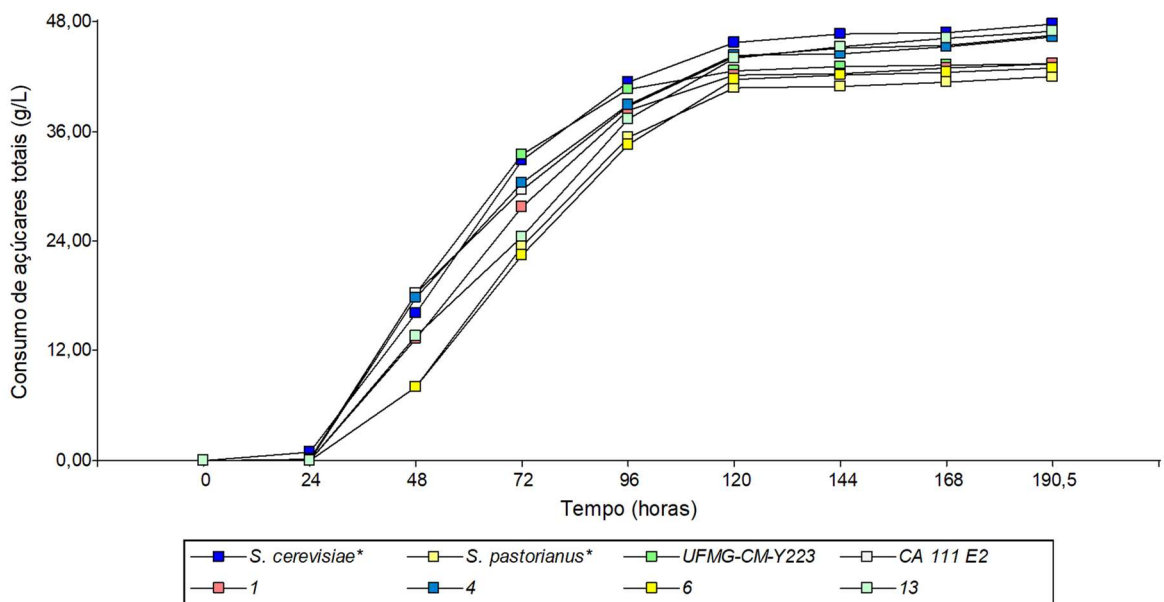


Figura 26 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) na temperatura de 10 °C em intervalos de 24 horas. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-

Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13).

A linhagem que apresentou o maior consumo de açúcares do mosto em (g / l) foi a linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(13), com um consumo médio de 47,68 g / l. No entanto, esse consumo não foi estatisticamente significativo quando comparado à linhagem de *S. cerevisiae* comercial, a linhagem parental *S. kudriavzevii* CA111E2 e a linhagem híbrida UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) que consumiram 47,64, 46,42 e 46,27 g / l, respectivamente. A linhagem comercial de *S. pastorianus* foi a que menos consumiu os açúcares do mosto cervejeiro, 41,93 g / l. Esse valor não foi estatisticamente significativo em relação à linhagem parental de *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223 e aos híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) (figura 27).

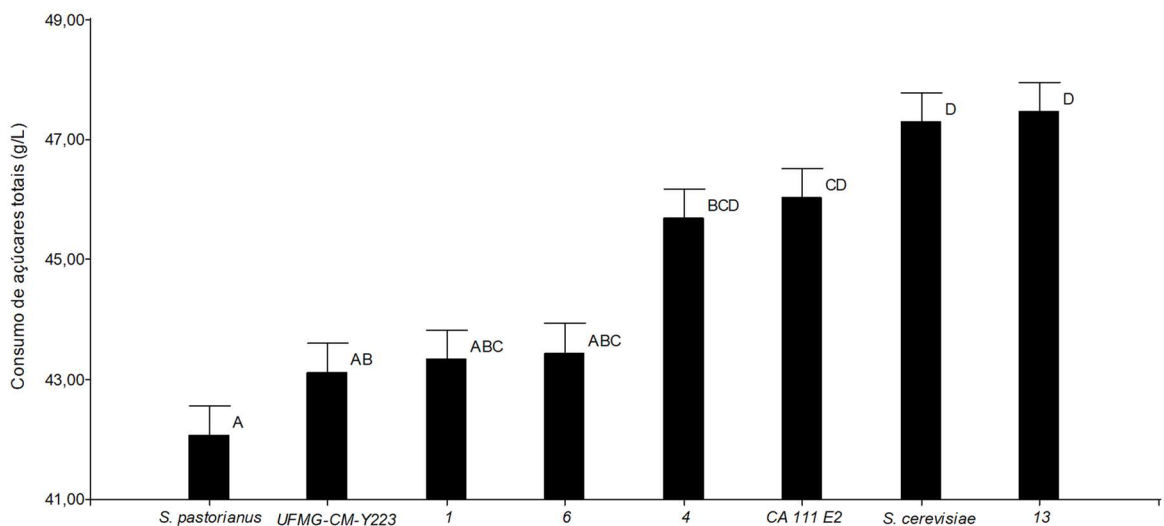


Figura 27 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

O tempo necessário para iniciar a fermentação (período de latência) do mosto cervejeiro pelas linhagens estudadas foi inversamente proporcional à quantidade de açúcares consumido no mosto cervejeiro. Linhagens que consumiram a maior quantidade de açúcares totais do mosto cervejeiro até o tempo de 190,5 horas de fermentação, apresentaram um tempo de

latência menor em comparação com as linhagens que consumiram menor quantidade dos açúcares (g / l). A linhagem parental *S. kudriavzevii* CA111E2, os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e, a linhagem *S. cerevisiae* comercial apresentaram período de latência estatisticamente menor que as demais linhagens estudadas com o período de latência de 8:00 , 8:00 , 8:30 e 10:00 horas, respectivamente (figura 28).

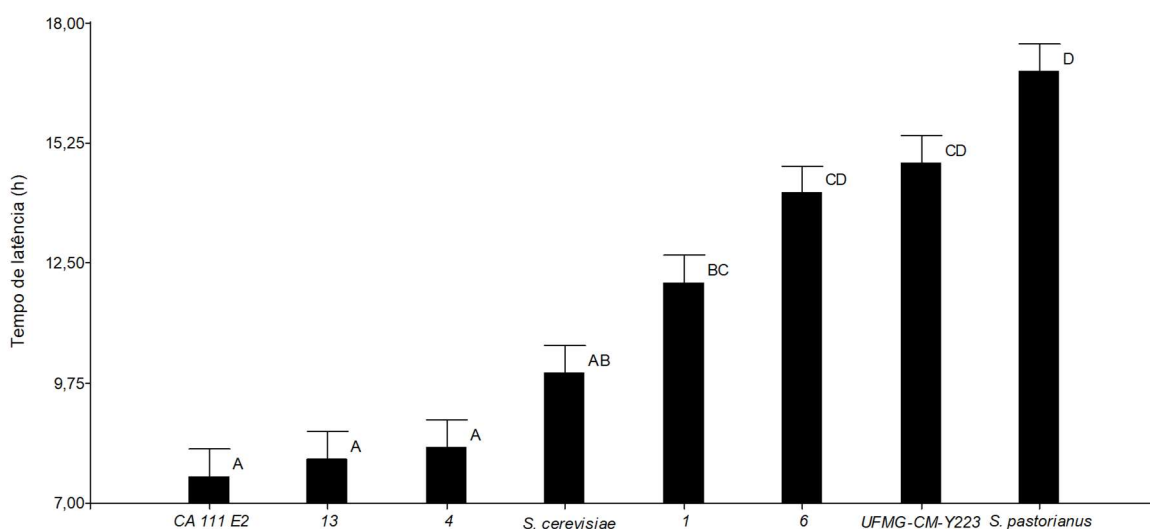


Figura 28 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 10 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Na análise de fermentação dos híbridos entre as linhagens UFMG-CM-Y223xCA111E2 na temperatura de 20 °C, foi evidente que estas leveduras iniciaram o processo de fermentação antes de 24 horas, diferente do que ocorreu na temperatura de 10 °C onde a fermentação foi iniciada após 24 horas. A linhagem parental *S. kudriavzevii* CA111E2 iniciou o processo de fermentação após as 24 horas, diferente das demais linhagens analisadas (figura – 29). A *S. kudriavzevii* CA111E2 é um levedura utilizada em fermentações de baixa temperatura como, por exemplo o vinho e portanto, essa característica era esperada.

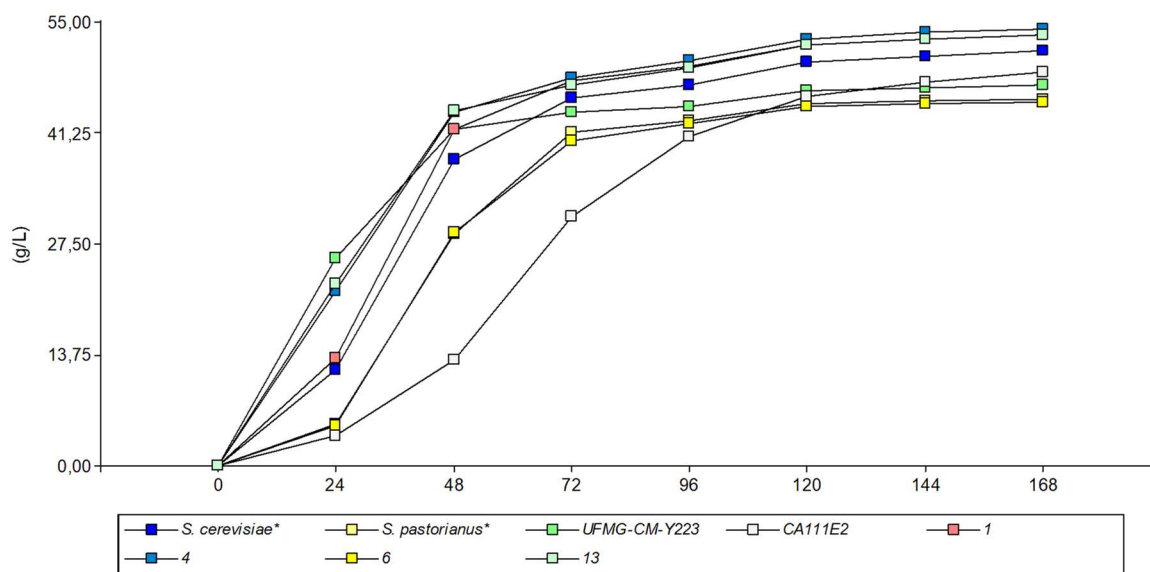


Figura 29 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C em intervalos de 24 horas. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13).

A linhagem capaz de metabolizar a maior quantidade de açúcares na temperatura de 20 °C foi a linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) que consumiu 54,10 g / l de açúcares no período de 168 horas de fermentação. Esse valor é estatisticamente similar para o consumo de açúcares das linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) que consumiram 53,43 e 53,38 g / l, respectivamente. A linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) foi diferente estatisticamente das linhagens comerciais e das linhagens parentais. A linhagem que consumiu a menor quantidade de açúcares do mosto foi a linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) (46,00 g / l), porém, não foi estatisticamente diferente da linhagem comercial de *S. pastorianus* (45,43 g / l) e seu parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223 (47,14 g / l). A figura 30 mostra que as linhagens híbridas [exceto a linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(6)] apresentaram um perfil de fermentação superior ao das linhagens parentais, mostrando que esses híbridos apresentaram vigor fermentativo.

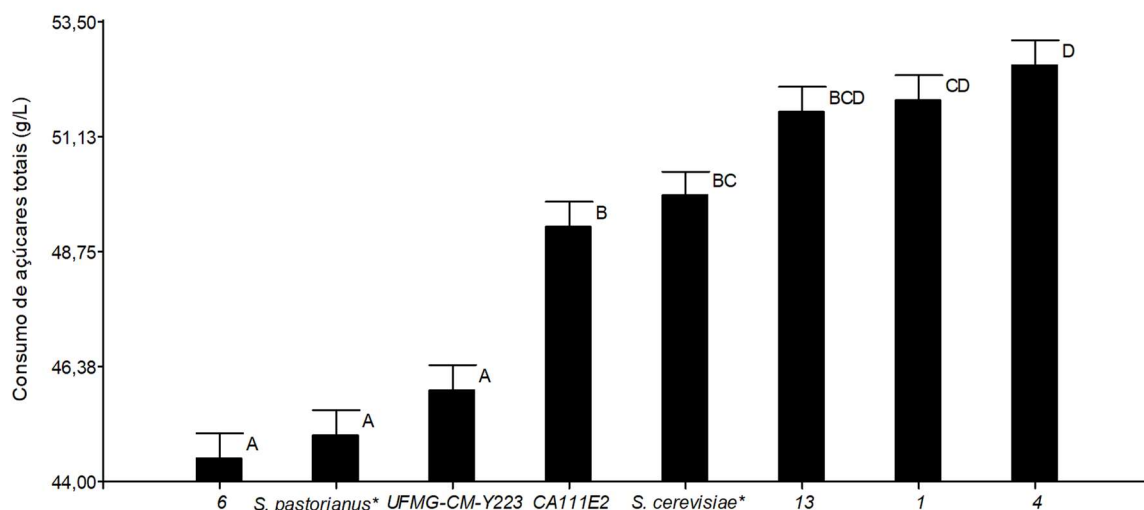


Figura 30 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

As linhagens que apresentaram o menor tempo para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro foram as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) e a linhagem parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223 com a média de tempo de 4 horas. O tempo de latência para essas leveduras não foi estatisticamente diferentes. A linhagem UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), foi o segundo híbrido a consumir a maior quantidade de açúcares do mosto e apresentou um tempo de latência de 7 horas e 50 minutos, sendo este período diferente estatisticamente do tempo dos outros híbridos testados (figura 31).

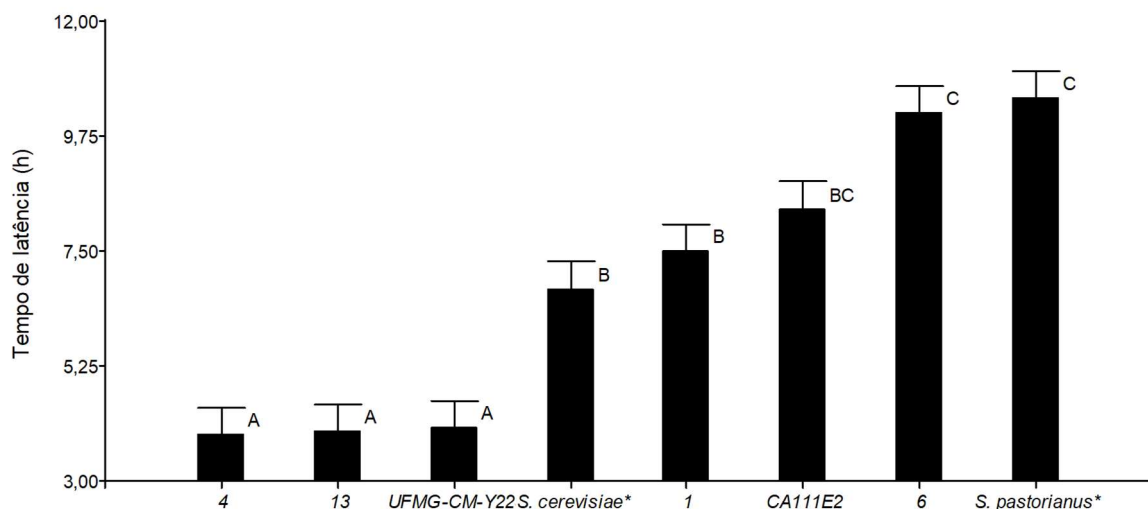


Figura 31 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y223: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CA111E2: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), 4 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), 6 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e 13 - UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2)

Na fermentação a 10 °C para o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2), as linhagens híbridas UFMG-CM-Y030xCR90F4(1A) e UFMG-CM-Y030xCR90F4(2A) iniciaram o processo de fermentação somente após 96 horas de inoculação (figura 32). Essa demora no início da fermentação não é vantajoso para as cervejarias e pode facilitar a contaminação por microrganismos indesejáveis. Portanto, essas linhagens não seguiram para as etapas seguintes. As outras linhagens estudadas iniciaram o processo de fermentação em 48 horas de fermentação.

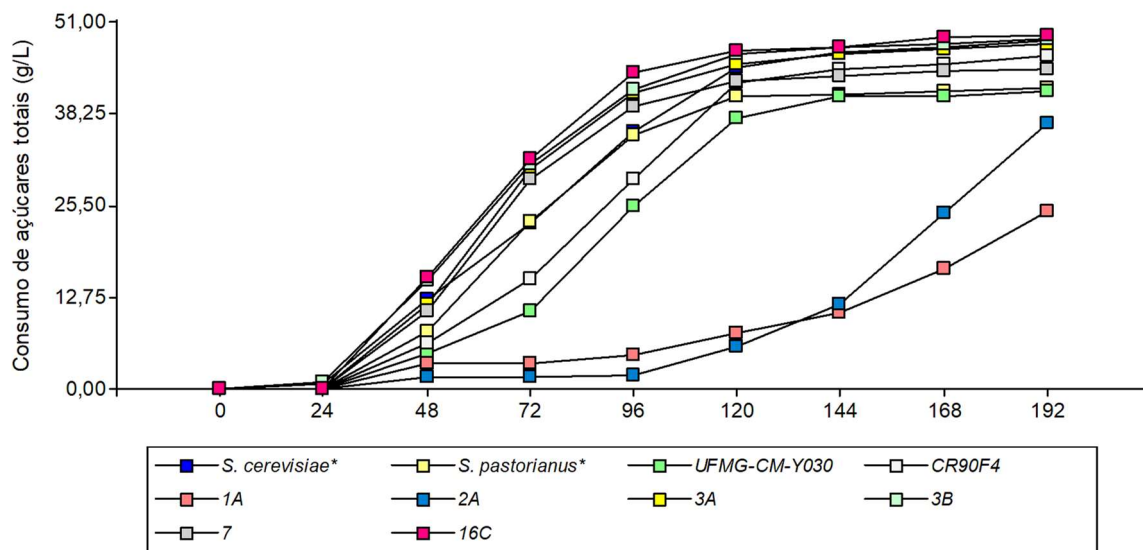


Figura 32 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C em intervalos de 24 horas. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(1A), 2A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(2A), 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CM-Y030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C).

A linhagem comercial de *S. cerevisiae* consumiu a maior média dos açúcares totais, 49,36 g / l. No entanto, essa quantidade não apresentou diferença significativa em relação às quantidades consumidas pelas linhagens híbridas UFMG-CM-Y030xCR90F4(16C), UFMG-CM-Y030xCR90F4(3B) e UFMG-CM-Y030xCR90F4(3A) e pela linhagem parental *S. kudriavzevii* CR90F4 que consumiram respectivamente, 49,14 , 48,57, 46,21 e 47,93 g / l. A linhagem comercial *S. pastorianus* consumiu a menor quantidade de açúcar, 41,93 g / l. Esse valor foi estatisticamente igual aos encontrados para as linhagens UFMG-CM-Y030, UFMG-CM-Y030xCR90F4(7), UFMG-CM-Y030xCR90F4(3A) e para a parental *S. kudriavzevii* CR90F4 (figura 33).

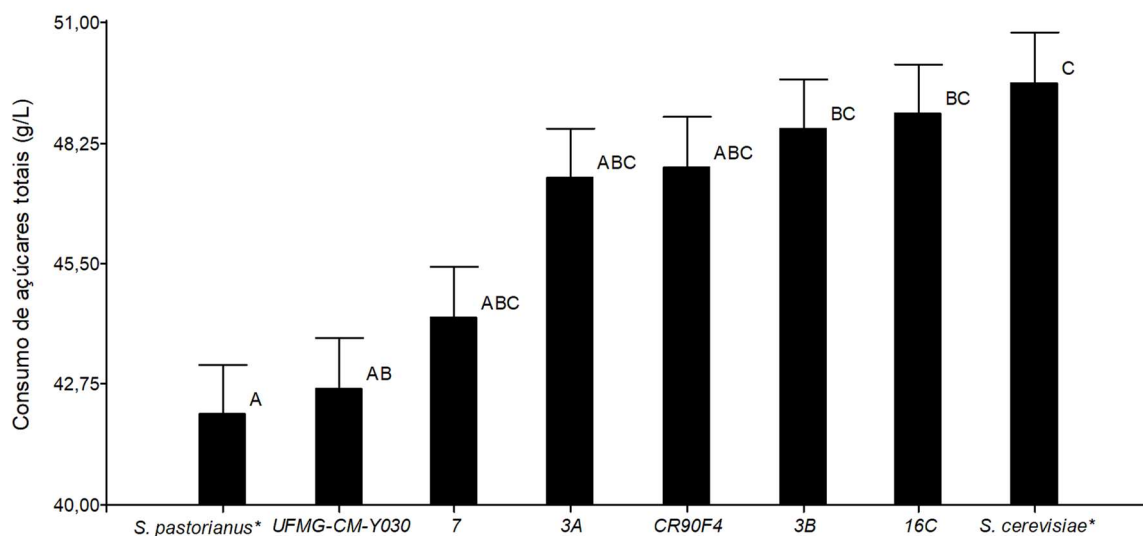


Figura 33 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 10 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CMY030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A linhagem comercial de *S. cerevisiae* apresentou o menor tempo de latência (9 horas e 42 minutos). Esse valor foi similar estatisticamente para todas as linhagens, exceto para a linhagem parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y030 que apresentou um período de latência de 24 horas e 44 minutos (figura 34).

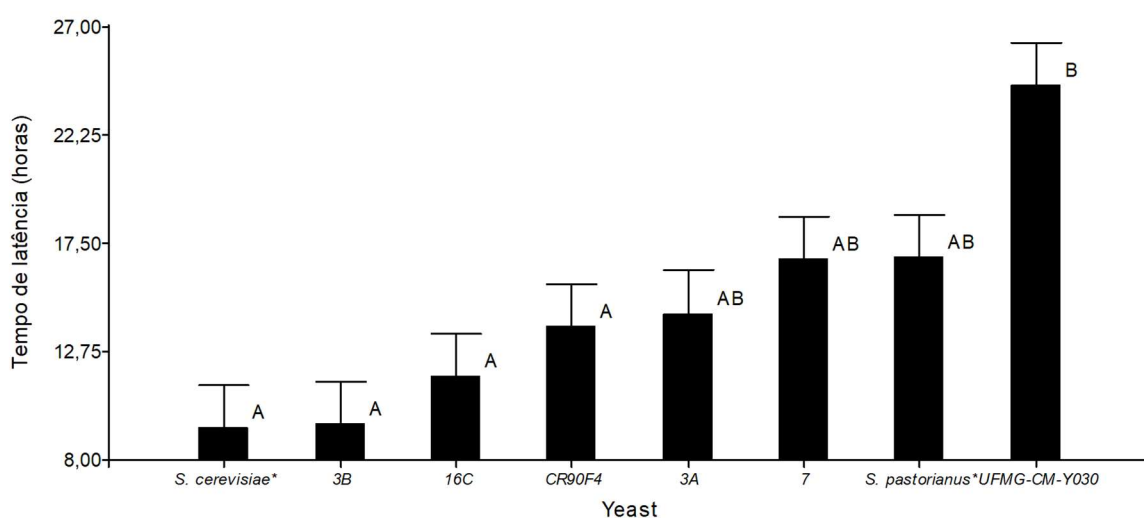


Figura 34 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 10 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-

Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CMY030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Para a fermentação na temperatura de 20 °C em mosto cervejeiro, o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(1A) não foi capaz de alcançar uma fermentação vigorosa e tampouco alcançou o consumo de 11 g / l dos açúcares do mosto (figura 35). Isto mostra que este híbrido não fermenta bem em ambas as temperaturas, sendo também descartado para as próximas etapas do trabalho.

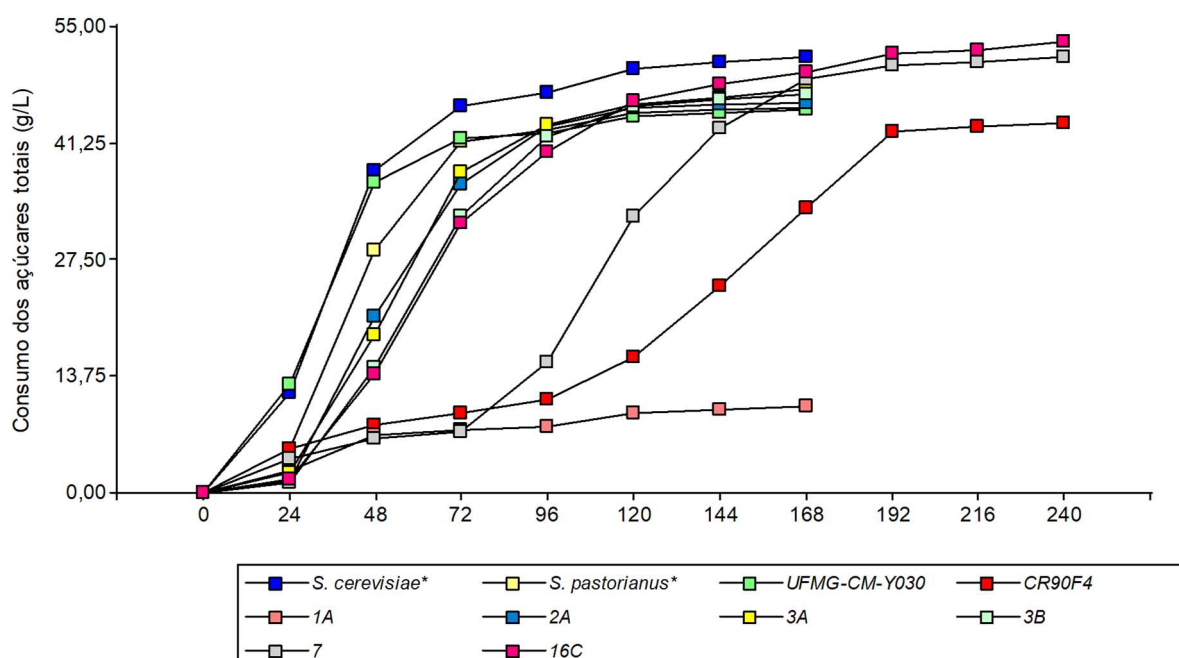


Figura 35 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C em intervalos de 24 horas. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 1A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(1A), 2A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(2A), 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CM-Y030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C).

As duas linhagens que foram capazes de consumir a maior quantidade de açúcares do mosto foram UFMG-CM-Y030xCR90F4(7), com um consumo de 51,38 g / l e UFMG-CM-Y030xCR90F4(16C) que consumiu 57,14 g / l (figura 36). Essas duas linhagens não apresentaram diferença significativa quando comparado a quantidade de açúcares consumidos por elas, porém, esses valores foram diferentes de todas as outras linhagens testadas, incluindo

as linhagens comerciais e parentais. Apesar do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(2A) não apresentar uma boa fermentação e consumo de açúcares na temperatura de 10 °C, ele mostrou resultados significativos na temperatura de 20 °C.

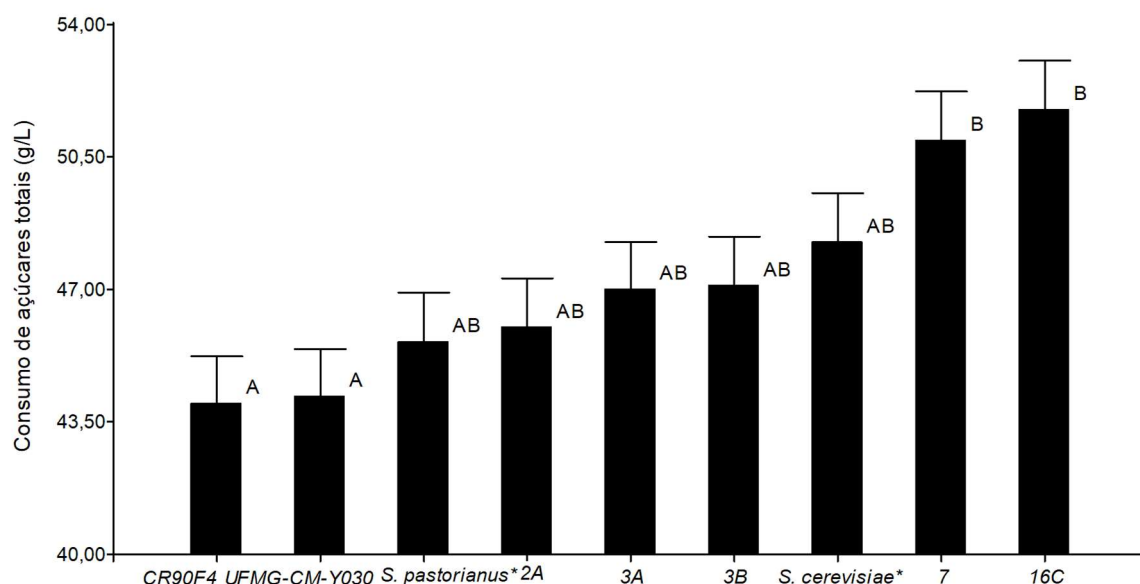


Figura 36 – Consumo de açúcares totais do mosto cervejeiro (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 20 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CMY030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A figura 37 mostra que não houve diferença estatística entre os valores do tempo de latência em relação as linhagens parentais, comerciais e o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4(16C). Estas foram as linhagens que demoraram menos tempo para iniciar o processo de fermentação do mosto cervejeiro (figura 37). A linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4(7) apresentou o maior tempo de latência (23:09 horas), porém, após 72 horas a levedura foi capaz de se adaptar ao mosto.

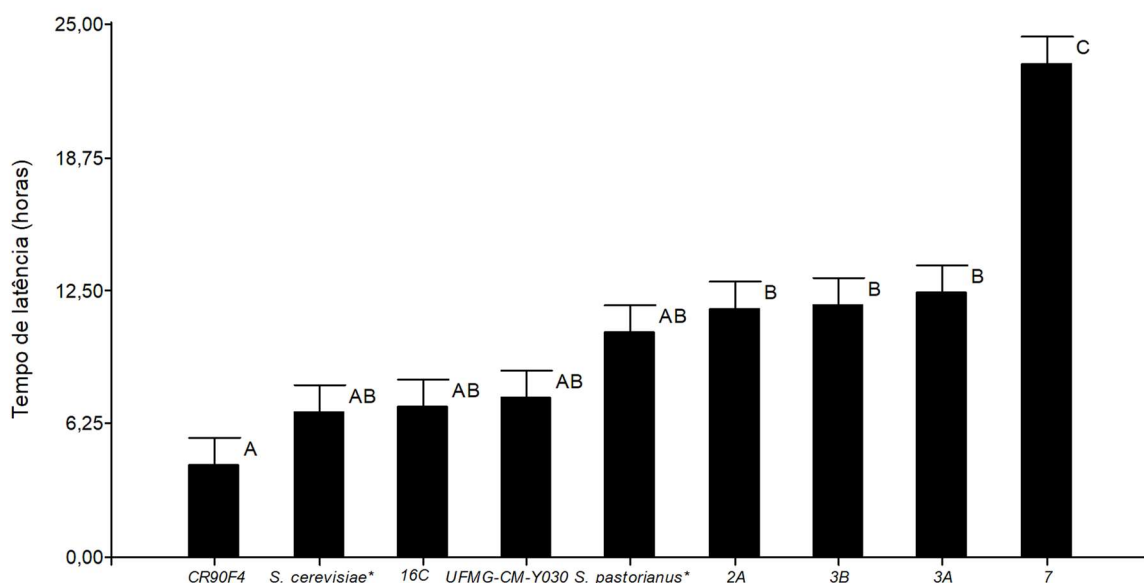


Figura 37 – Tempo necessário para iniciar a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*: controles de leveduras comerciais; UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CM-Y030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

9.1.4. Determinação de ácidos, açúcares e álcoois dos híbridos cervejeiros

Híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2

A determinação do residual de açúcares e concentração da produção de glicerol, ácido acético e etanol foi feita por meio da análise da fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C. A tabela 12 e a figura 38 mostram os valores do residual de açúcares e concentração dos compostos para as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas na temperatura de 20 °C. As linhagens parentais não foram capazes de fermentar a maltotriose, porém, os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2 (1), UFMG-CM-Y223xCA111E2 (4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2 (13) apresentaram a habilidade em fermentar esse açúcar que é o segundo mais abundante no mosto cervejeiro.

Tabela 12 – Residual de açúcares, glicerol, ácido acético e etanol (g / l) no final da fermentação do mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas na temperatura de 20 °C.

Leveduras	Maltotriose	Maltose	Glicose	Frutose	Glicerol	Ac. Acético	Etanol
1	4,37 ± 0,69 (a)	0,49 ± 0,01 (a)	0,03 ± 0,02 (a,b)	0,59 ± 0,02 (a)	3,9 ± 0,15 (a)	0,26 ± 0,03 (a)	48,77 ± 0,71 (d)
13	5,64 ± 0,64 (a)	0,5 ± 0,13 (a)	0,03 ± 0,01(a,b)	0,54 ± 0,09 (a)	3,3 ± 0,34 (a)	0,27 ± 0,02 (a)	47,07 ± 1,59 (d)
4	4,86 ± 1,02 (a)	0,49 ± 0,03 (a)	0,05 ± 0,01 (b)	0,45 ± 0,22 (a)	2,68 ± 1,36 (a)	0,29 ± 0,02 (a)	49,02 ± 0,36 (d)
6	32,32 ± 0,58 ©	0,3 ± 0,01 (a)	0,01 ± 0,004(a,b)	0,61 ± 0,03 (a)	2,96 ± 0,05 (a)	0,31 ± 0,03 (a)	38,44 ± 0,76 (b)
CA111E2	31,21 ± 1,86 ©	36,43 ± 2,6 (b)	0 ± 0 (a)	0,56 ± 0,07 (a)	2,33 ± 0,1 (a)	0,58 ± 0,5 (a)	17,33 ± 0,46 (a)
Y223	20,68 ± 2,06 (b)	0,37 ± 0,02 (a)	0,01 ± 0,01 (a)	0,7 ± 0,04 (a)	2,6 ± 0,15 (a)	0,11 ± 0,01 (a)	43,73 ± 0,21 ©

A linhagem parental de *S. kudriavzevii* não foi capaz de fermentar a maltotriose com a mesma eficiência das outras linhagens, e ao final do processo de fermentação apresentou um residual de $31,21 \pm 1,86$ g / l. Essa linhagem é utilizada em processos fermentativos da produção de vinhos, sendo esse açúcar não encontrado no mosto vínico. A glicose e a frutose foram metabolizadas pelas linhagens parentais e seus híbridos.

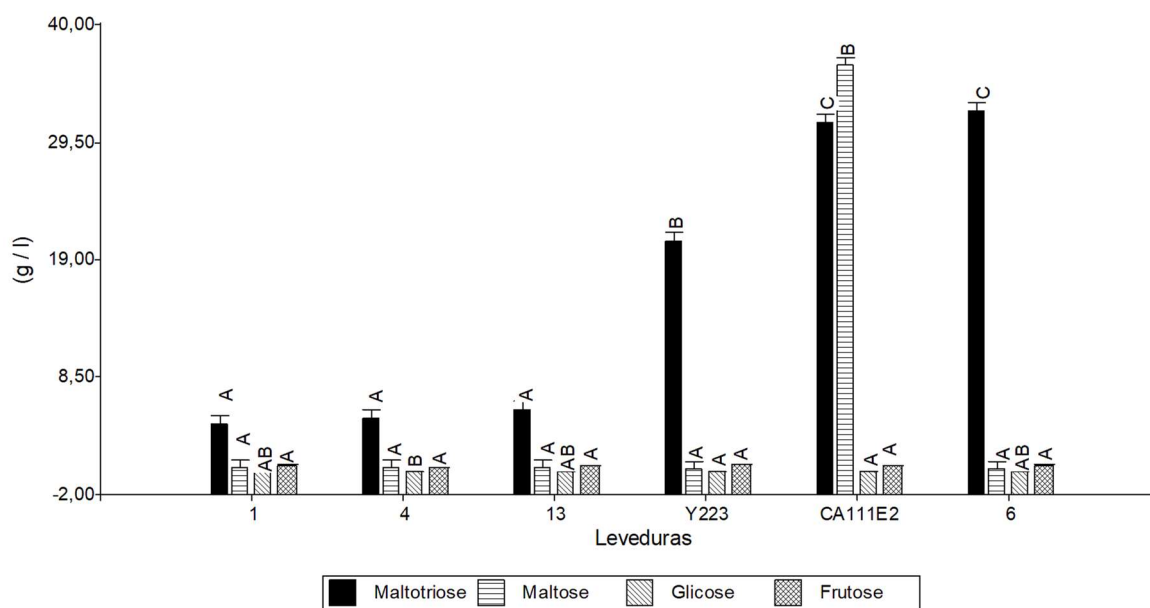


Figura 38 - Residual de maltotriose, maltose, glicose e frutose (g / l) no mosto cervejeiro após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223 xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223 xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223 xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223 xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A figura 39 mostra a concentração de glicerol e ácido acético produzidos ao final do processo de fermentação. Não ocorreu diferença estatística significativa para nenhum dos valores dos compostos produzidos pelas linhagens utilizadas. A maior quantidade de glicerol

foi produzida pela linhagem *S. kudriavzevii* (CA111E2) (~ 0,58 g / l) e a maior produção de ácido acético foi observada para o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) (~3,9 g / l).

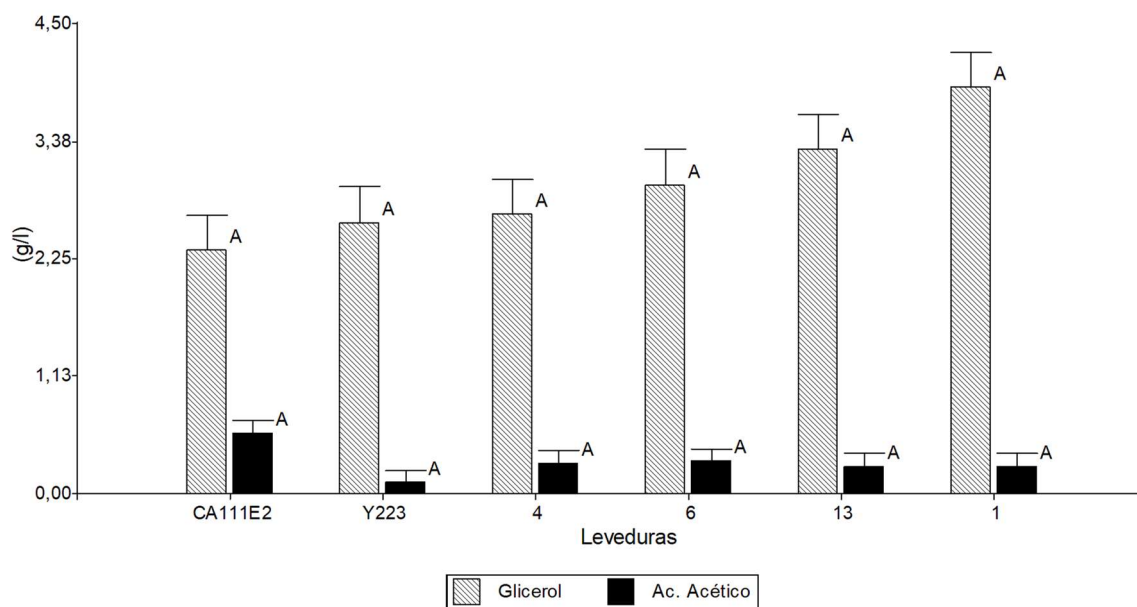


Figura 39 - Produção de glicerol e ácido acético após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A figura 40 mostra a produção de etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas. Os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) produziram uma concentração média de 48,77; 47,07 e 49,02 g / l de etanol, respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente diferentes entre si e se diferenciaram em relação as linhagens parentais *S. kudriavzevii* ($17,33 \pm 0,46$) e *S. cerevisiae* ($43,73 \pm 0,21$) e o outro híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) ($38,44 \pm 0,76$). A linhagens parentais e o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) foram estatisticamente diferentes entre si e entre todos os outros híbridos.

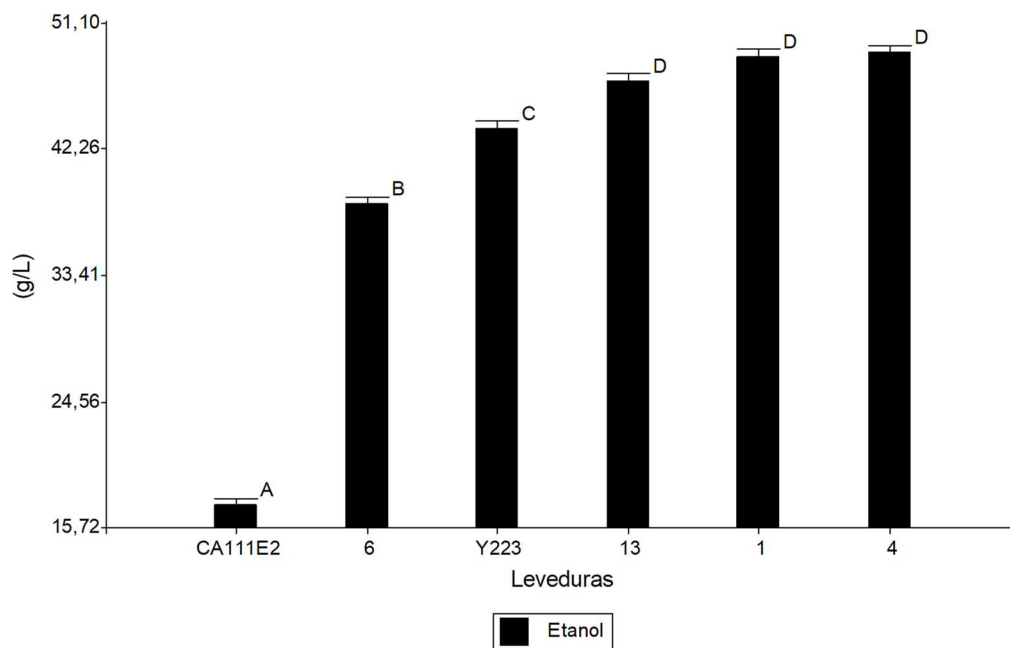


Figura 40 - Produção de etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Híbrido UFMG-CM-Y030XCR90F4

Por motivos técnicos (problemas na coluna do HPLC) não foi possível realizar a dosagem dos ácidos, açúcares e etanol a partir da fermentação em mosto cervejeiro utilizando o híbrido UFMG-CM-Y030XCR90F4. Para este isolado, a dosagem dos ácidos, açúcares e etanol foi realizada apenas pra o teste de fermentação em mosto sintético de cachaça.

9.1.5. Análise dos compostos voláteis produzidos pelos híbridos cervejeiro por meio da cromatografia gasosa

Híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2

Nenhuma das linhagens produziu os compostos 2-heptanona, caproato de etila, 1-hexanol e ácido benzílico, portanto, esses compostos foram retirados das análises para melhor

visualização dos resultados dos outros compostos. A análise dos compostos produzidos pelas linhagens parentais e híbridos pode ser feita a partir de uma correlação entre a tabela 13 e a figura 41 que mostra o resultado da análise de componente principal dos compostos voláteis produzidos durante a fermentação em mosto cervejeiro. O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) e a linhagem parental *S. kudriavzevii* CA111E2 produziram a maior quantidade de acetato de etila, com valores de, $239,08 \pm 16,35$ e $240,48 \pm 34,93$ mg/l, respectivamente. Essa produção foi estatisticamente similar entre as duas linhagens. Os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) produziram menores quantidades do composto, se diferenciando entre todas as linhagens estudadas. Esses mesmos três híbridos apresentaram perfis similares de produção de compostos aromáticos não se diferenciando estatisticamente para a produção de acetato de isobutila (sendo os únicos a produzir esse composto), isobutanol, acetato de isoamila (únicas linhagens a produzir esse composto) álcool isoamílico, caprato de etila, succinato de dietila, ácido 2-fenil-etila e 2-fenil-etanol (tabela 13 e a figura 41). Apesar da similaridade para a produção de todos esses compostos o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) se diferenciou estatisticamente entre eles para a produção de acetato de isoamila.

O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) foi a linhagem que mais produziu o composto isobutanol ($755,73 \pm 10,97$ mg / l) se diferenciando de todas as outras linhagens estudadas. O álcool isoamílico foi o composto mais produzido entre as linhagens. O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) produziu os maiores valores desse composto ($\sim 236,31$ mg / l), seguido pelas linhagens parentais *S. kudriavzevii* (CA111E2) ($\sim 180,54$ mg / l) e *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) ($\sim 113,48$ mg / l) e pelos híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) ($\sim 19,80$ mg / l), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) ($\sim 18,83$ mg/l) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) ($\sim 14,89$ mg/l).

Todas as linhagens produziram baixas quantidades dos compostos caprilato etila e caprato etila. As linhagens parentais *S. kudriavzevii* (CA111E2) ($\sim 18,96$ mg / l) e *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) ($\sim 33,56$ mg / l) juntamente com o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) ($\sim 26,01$ mg / l) apresentaram as maiores produções do composto succinato de dietila. O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) apresentou a maior produção para o composto 2-fenil-etanol, sendo esse valor de $1021,60 \pm 135,135$ mg/l. Esse valor foi estatisticamente diferente dos valores de todas as outras linhagens híbridas e também das linhagens parentais.

Tabela 13 – Cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13).

Levedura	Acetato de etila	Acetato de isobutila	Isobutanol	Ácido isoamílico	Álcool isoamílico
1	239,08 ± 16,35	0 ± 0	755,73 ± 10,97	0 ± 0	236,31 ± 16,81
13	39,86 ± 3,81	0,39 ± 0,01	72,09 ± 5,72	1,26 ± 0,06	19,81 ± 1,5
4	38,92 ± 2,3	0,39 ± 0,01	70,8 ± 0,93	1,25 ± 0,03	18,84 ± 0,63
6	36,4 ± 3	0,24 ± 0,21	65,61 ± 3,68	1,01 ± 0,01	14,89 ± 1,13
CA111 E2	240,48 ± 34,93	0 ± 0	590,81 ± 82,94	0 ± 0	180,54 ± 25,63
Y223	107,05 ± 9,09	0 ± 0	328,06 ± 22,16	0 ± 0	113,49 ± 7,46

Levedura	Caprilato etila	Caprato etila	Succinato de dietila	Ácido 2-fenil-etila	2-fenil-etanol
1	0,28 ± 0,04	0,36 ± 0,06	26,01 ± 2,14	22,14 ± 1,93	1021,61 ± 135,14
13	0,09 ± 0,0021	0,07 ± 0,0038	4,41 ± 0,57	0,47 ± 0,17	42,7 ± 6,76
4	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,03	6,63 ± 1,18	0,42 ± 0,25	41,75 ± 1,38
6	0,18 ± 0,04	0,06 ± 0,01	7,82 ± 1,74	0 ± 0	46,22 ± 1,75
CA111 E2	0,39 ± 0,13	0,7 ± 0,23	18,96 ± 0,85	21,14 ± 4,75	734,11 ± 155,03
Y223	0,27 ± 0,03	0,78 ± 0,18	33,57 ± 13,95	6,98 ± 1,54	528,53 ± 34,77

*Compostos estão representado em **mg / l**.

O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) foi o mais similar às linhagens parentais em relação à produção de compostos aromáticos (figura 41), com perfil de compostos mais próximo à linhagem parental *S. kudriavzevii* CA111E2. Os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) apresentaram similaridade na produção dos composto aromáticos. Essa similaridade é vista no gráfico de multicomponente (figura 41), onde as linhagens híbridas estão plotadas próximas entre si e se distanciando das linhagens parentais.

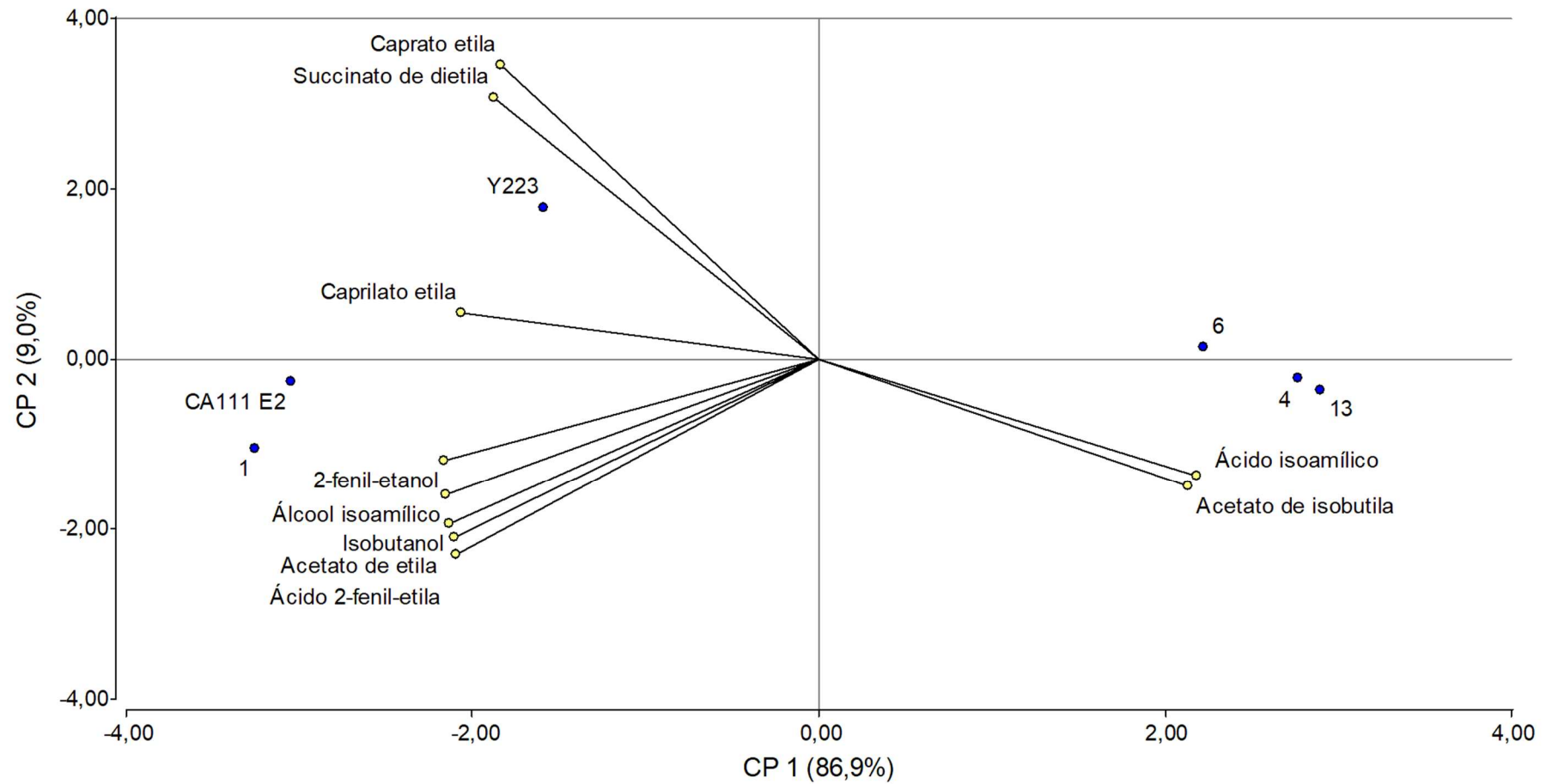


Figura 41 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223) e *S. kudriavzevii* (CA111E2) e as linhagens híbridas UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13).

9.2. Híbridos de Cachaça

A obtenção de híbridos para a produção de cachaça também foi realizada com a busca de mutantes auxotróficos, como descrito para os híbridos de cerveja. Mutantes auxotróficos para lisina foram obtidos para as linhagens de *S. cerevisiae* CAY1031 e UFMG-CM-Y030 e um mutante auxotrófico para triptofano para a linhagem de *S. kudriavzevii* CR90F4 como descrito na tabela 14. A análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial mostrou que as linhagens auxotróficas eram idênticas às linhagens parentais. Como apresentado na tabela 14, o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4 é o mesmo descrito no item 9.1.2 e os processos de confirmação e estabilização do híbrido foi descrito anteriormente. Estudos anteriores mostraram que a linhagem UFMG-CM-Y030 é boa produtora de cerveja e cachaça (GOMES et al, 2007; MONTANDON, 2016). Diante disso, o híbrido obtido utilizando esta linhagem foi testado para a produção de cerveja e cachaça.

Tabela 14 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos para a produção de cachaça.

		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAY 1031			<i>S. cerevisiae</i> UFMG-CM-Y030		
		lys-	ura-	trp-	lys-	ura-	trp-
<i>S. kudriavzevii</i>	CR90F4	lys-			lys-		
		ura-			ura-		
		trp-	✓		trp-	✓	

*Células com tracejado informa que não foi obtido o mutante auxotrófico para aquele determinado aminoácido.

Após a obtenção do híbrido CAY1031xCR90F4, foi feita a confirmação da estabilidade do híbrido por meio da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY₁ e MAG₂. Os resultados mostraram que o híbrido carregava o material genético das duas linhagens parentais, confirmando assim a hibridação entre a parental *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4).

9.2.1. Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CAY1031xCA111E2

A confirmação de estabilidade do híbrido foi realizada a partir da caracterização das colônias obtidas através do crescimento dos esporos dissecados. Antes do processo de fermentação em mosto sintético de cachaça, foi feita a análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial das colônias resultantes dos esporos. Não foi possível fazer a digestão do DNA

mitocondrial do esporo A7 para a caracterização quanto à linhagem parental, entretanto, as outras colônias originadas dos esporos apresentaram o padrão de bandejamento semelhante ao encontrado na linhagem parental de *S. cerevisiae* CAY1031 (figura 42 e tabela 15).

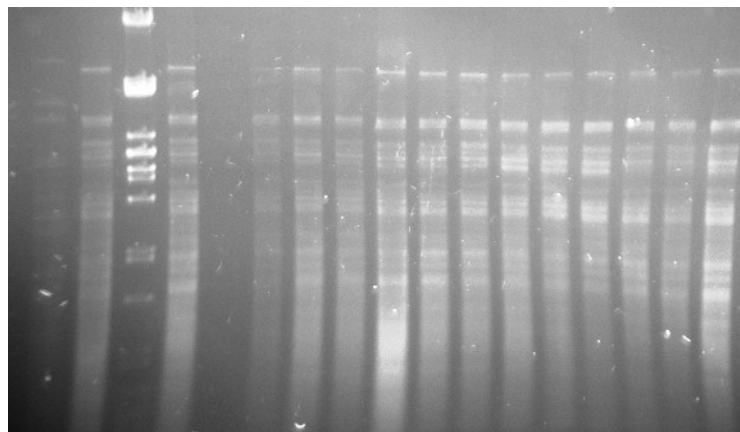


Figura 42 – Perfis de restrição do DNA mitocondrial das colônias resultantes dos esporos do híbrido CAY1031xCR90F4. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, linhagem parental *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem parental *S. kudriavzevii* e as 14 colônias resultantes dos esporos.

Para a caracterização das colônias foram utilizados os genes nucleares codificadores das proteínas GSY₁, MAG₂ e UGA₃. Por meio desta caracterização as colônias originadas dos esporos foram agrupadas de acordo com o padrão de similaridade de bandejamento em relação aos híbridos originais (tabela 15).

Tabela 15 – Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CAY1031xCA111E2.

Esporos	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	UGA ₃ (IV)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	inter-δ	RAPD-R3	
A7	CK	CK	CK	-			
A8	CK	CK	CK	CAY 1031			
B7	CK	C	CK	CAY 1031	*	- Diferentes	
B9	C	CK	CK	CAY 1031	*	Diferentes Diferentes	
C8	CK	CK	C	CAY 1031	*	Iguais Iguais	
C9	CK	CK	CK	CAY 1031			
D5	CK	CK	CK	CAY 1031			
D9	CK	-	C	CAY 1031	*	Iguais Iguais	
E4	CK	C	CK	CAY 1031	*	Iguais Diferentes	
E5	CK	C	CK	CAY 1031	*	- Diferentes	
E8	CK	CK	CK	CAY 1031			
F3	CK	CK	CK	CAY 1031	*	Iguais Diferentes	
F5	CK	CK	CK	CAY 1031	*	Iguais Iguais	
H5	CK	CK	CK	CAY 1031			

*CK: *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* C: *S. cerevisiae* e K: *S. kudriavzevii*. GSY₁, KEL e MAG₂: iniciadores codificadores do gene que amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. Padrões moleculares obtidos por mtDNA-RFLP

(mtDNA), polimorfismos de DNA de sequência interdelta (δ -PCR) e análise de RAPD utilizando o iniciador R3 (RAPD-R3). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

Após a caracterização das colônias resultantes dos esporos dissecados utilizando os genes nucleares codificadores da proteína GSY₁, MAG₂ e UGA₃, selecionou-se as colônias dos esporos B7, B9, C8, D9, E4, E5, F3 e F5 para a fermentação em mosto sintético de cachaça (tabela 15). Após sucessivas fermentações, uma alíquota foi plaqueada em meio de cultura e após o crescimento das colônias, selecionou-se 10 aleatoriamente, onde, foi feito a PCR inter- δ e a PCR-RAPD com o iniciador R3 para confirmação da estabilidade do híbrido. Após as fermentações, as colônias do esporo E5 e B7 (A), B9 (B), E3 (D) e F4 (E) não apresentaram um perfil de bandejamento similar entre o híbrido original utilizando a técnica de PCR RAPD-R3 (figura 43). Com isso, esses esporos foram descartados do estudo. As colônias dos esporos C8 (B e H), D9 (C e I) e F5 (F e L), apresentaram fragmentos do perfil de bandejamento de tamanho correspondentes aos fragmentos presentes nos perfis do híbrido original tanto para a PCR RAPD-R3 quanto para o inter- δ , Essa similaridade infere que esses híbridos apresentaram estabilidade genética após os testes de fermentação em mosto sintético de cachaça.

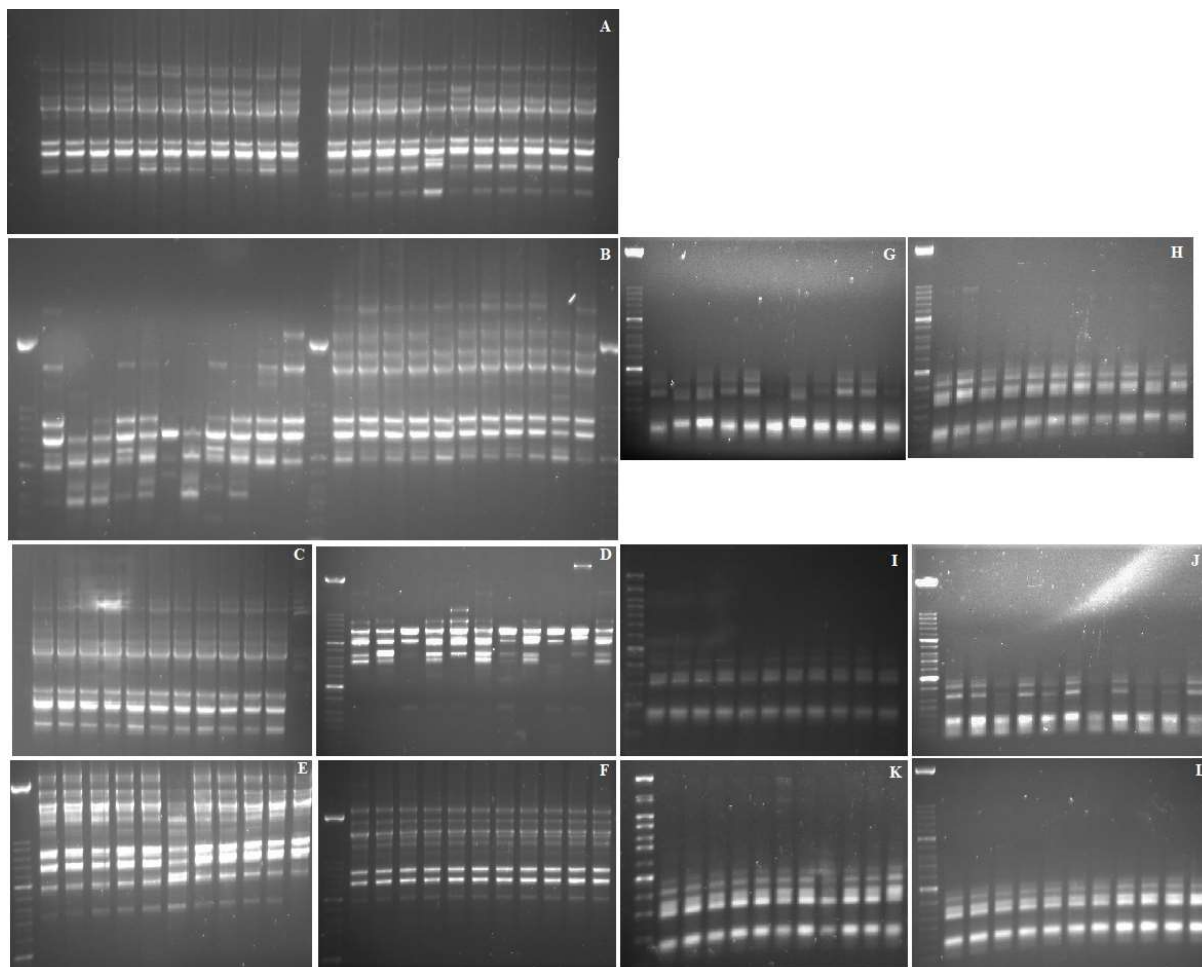


Figura 43 – Confirmação de estabilidade do híbrido CAY1031xCR90F4. **A)** RAPD-R3 das colônias dos esporos E5 e B7. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo E5 isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, 10 colônias originadas do esporo B7 isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **B)** RAPD-R3 das colônias do esporo B9 e C8. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos B9 e C8. **C)** RAPD-R3 das colônias do esporo D9. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo D9 após a fermentação. **D)** RAPD-R3 das colônias E3. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra C, porém, com o esporo E3. **E)** RAPD-R3 das colônias F4. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra C, porém, com o esporo F4. **F)** RAPD-R3 das colônias F5. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra C, porém, com o esporo F5. **G)** Inter- δ das colônias B9. **H)** Inter- δ das colônias C8. **I)** Inter- δ das colônias D9. **J)** Inter- δ das colônias E3. **K)** Inter- δ das colônias F4. **L)** Inter- δ das colônias F5. *A sequência das amostras para todos os géis de eletroforese com a utilização do iniciador Inter- δ é a seguinte, padrão de peso molecular, híbrido original e colônias originadas dos esporos.

9.2.2. Produção em escala laboratorial de cachaça

Para a fermentação em escala laboratorial em mosto sintético de cachaça foram utilizadas as linhagens parentais e as linhagens híbridas obtidas por meio do cruzamento (tabela 16). O híbrido UFMG-CM-Y030 x CR90F4 foi testado anteriormente também para cerveja.

Tabela 16 – Híbridos utilizados para a fermentação da cachaça em escala laboratorial

Linhagens para a fermentação da cachaça	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAY1031	<i>S. cerevisiae</i> UFMG-CM-Y030
<i>S. kudriavzevii</i> CR90F4	<i>S. kudriavzevii</i> CR90F4
CAY1031xCR90F4 (C8)	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-1A
CAY1031xCR90F4 (D9)	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-2A
CAY1031xCR90F4 (F5)	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-3A
	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-3B
	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-7
	UFMG-CM-Y030 x CR90F4(2)-16C

Híbrido CAY1031xCR90F4

A fermentação em mosto sintético de cachaça utilizando os híbridos entre as linhagens CAY1031xCR90F4 foi feita na temperatura de 28 °C. A figura 44 mostra que as linhagens parentais e os híbridos iniciaram a fermentação antes de 24 horas com um consumo de açúcar similar até 96 horas de experimento.

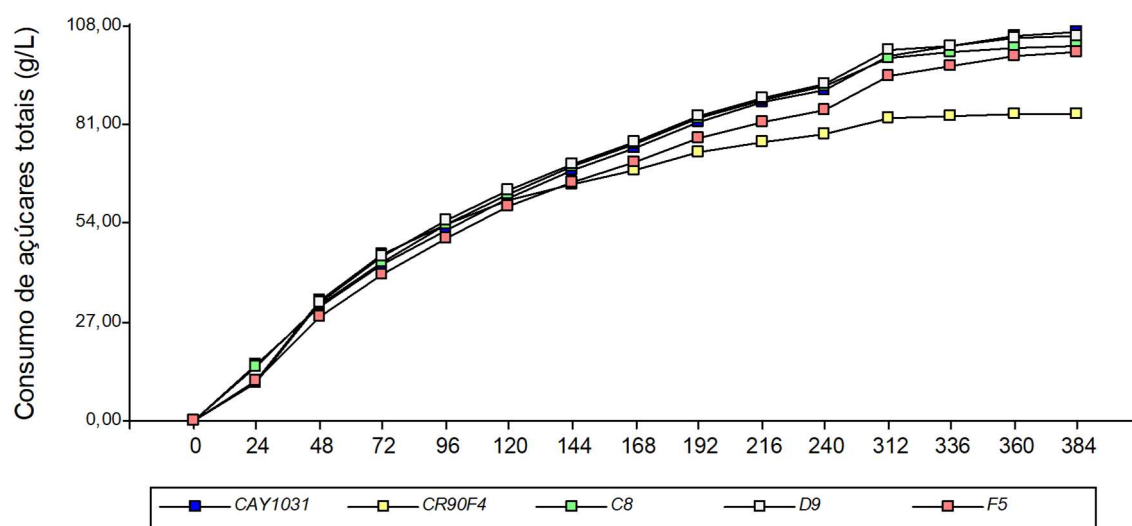


Figura 44 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C em intervalos de 24 horas. CAY1031: linhagem parental de *Saccharomyces cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: C8 – CAY1031xXR90F4 (C8), D9 – CAY1031xXR90F4 (D9) e D9 – CAY1031xXR90F4 (D9).

Como mostrado na figura 45, a linhagem que consumiu a menor quantidade de açúcar do mosto de cachaça foi a linhagem parental *S. kudriavzevii* CR90F4 (84,14 g / l). Esse consumo

foi inferior ao observado para a linhagem parental *S. cerevisiae* CAY1031 (106,33 g / l) que já era anteriormente utilizada para a produção de cachaça. Também foi inferior aos valores apresentados pelas linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(D9), CAY1031XCR90F4(C8) e CAY1031XCR90F4(F5) que consumiram 105,04 g / l, 102,52 g / l e 101,00 g / l de açúcares do mosto, respectivamente. As linhagens CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031XCR90F4(C8) não apresentaram diferença estatística em relação a linhagem parental *S. cerevisiae* CAY1031.

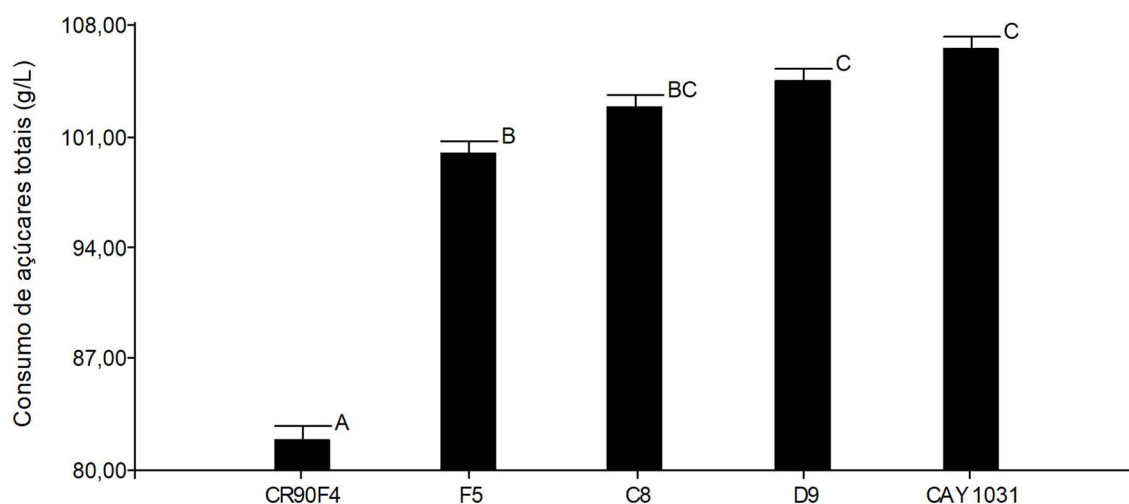


Figura 45 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C. CAY1031: linhagem parental de *Saccharomyces Cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii*; híbridos: C8 – CAY1031xXR90F4 (C8), D9 – CAY1031xXR90F4 (D9) e F5 – CAY1031xXR90F4 (F5). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

O período de latência da linhagem CAY1031 foi de 2 horas e 44 minutos. Esse valor não se diferenciou estatisticamente do valor apresentado pela linhagem CAY1031XCR90F4(C8) que foi de 2 horas e 49 minutos. A linhagem parental *S. kudriavzevii* CR90F4 iniciou o processo de fermentação do mosto de cachaça após 2 horas e 63 minutos. Esse período não foi diferente estatisticamente para as linhagens CAY1031XCR90F4(F5) e CAY1031XCR90F4(D9) que demoraram 2 horas e 55 minutos e 2 horas e 56 minutos, respectivamente (figura 46).

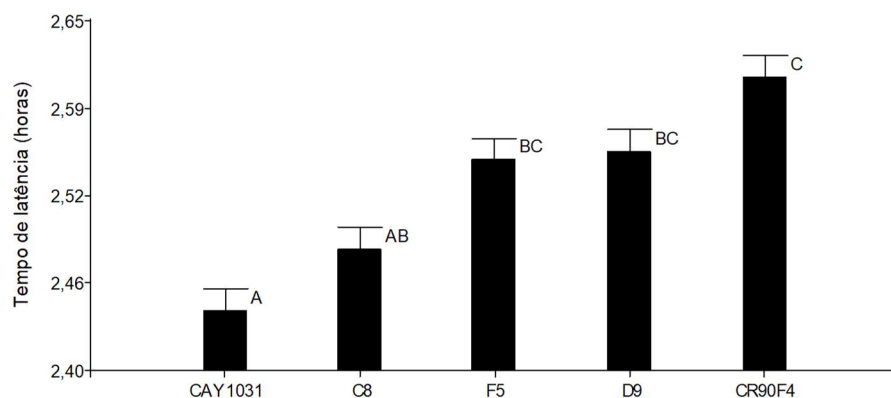


Figura 46 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de cachaça na temperatura de 28 °C. CAY1031: linhagem parental de *Saccharomyces cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: C8 – CAY1031xXR90F4 (C8), D9 – CAY1031xXR90F4 (D9) e D9 – CAY1031xXR90F4 (D9). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4

Na fermentação do mosto sintético de cachaça utilizando as linhagens do híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4 e as linhagens parentais, todas as linhagens apresentaram uma fermentação vigorosa após 24 horas de inoculação das leveduras. A linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4(2A) não apresentou boa fermentação, consumindo uma média de 57,00 g / l de açúcares do mosto de cachaça (336 horas). Diante isto, essa linhagem não foi utilizada nas etapas seguintes (figura 47).

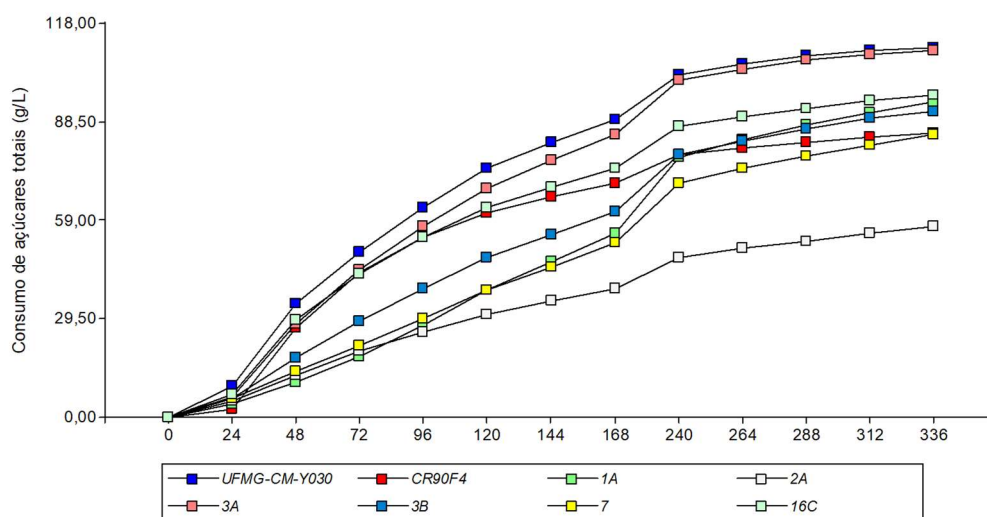


Figura 47 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C em intervalos de 24 horas. UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *Saccharomyces Cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii*; híbridos: 1A – UFMG-CM-Y030xCR90F4 (1A), 2A – UFMG-CM-Y030xCR90F4 (2A), 3A – UFMG-CM-Y030xCR90F4 (3A), 3B – UFMG-CM-

Y030XCR90F4 (3B), 7 – UFMG-CM-Y030XCR90F4 (7) e 16C – UFMG-CM-Y030XCR90F4 (16C).

Em relação ao consumo de açúcares do mosto sintético de cachaça, a linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4(3A) foi estatisticamente igual à linhagem parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y030 consumindo 109,85 g / l e 110,80 g / l, respectivamente. As outras linhagens híbridas não apresentaram o mesmo padrão de fermentação da linhagem parental de *S. cerevisiae*, ocorrendo a diminuição na habilidade de consumo dos açúcares no decorrer da fermentação. As linhagens UFMG-CM-Y030xCR90F4(7), UFMG-CM-Y030xCR90F4(3B) e UFMG-CM-Y030xCR90F4(16C) não apresentaram diferenças significativas entre si, porém, se diferenciaram em comparação com as a linhagem parental *S. kudriavzevii* CR90F4, apresentando, 84,66 g / l, 91,61 g / l, 96,66 g / l e 85,04 g / l de consumo de açúcares, respectivamente (figura 48).

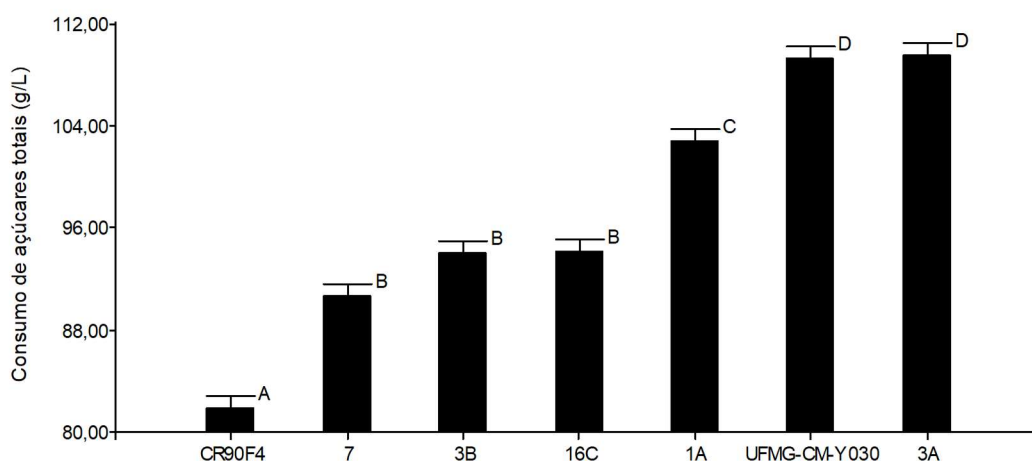


Figura 48 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de cachaça (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 28 °C. UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *Saccharomyces cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii*; híbridos: 1A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(1A), 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CM-Y030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A linhagem que mais demorou para iniciar o processo de fermentação foi a linhagem UFMG-CM-Y030xCR90F4(1A) com um tempo de 4 horas e 27 minutos. As linhagens UFMG-CM-Y030xCR90F4(16C) e *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y030 foram as que iniciaram mais rapidamente o processo de fermentação do mosto, com o tempo de 2 horas e 58 minutos e 3 horas, respectivamente. As demais linhagens híbridas, UFMG-CM-Y030xCR90F4(3B), UFMG-CM-Y030xCR90F4(3A), UFMG-CM-Y030xCR90F4(7) e linhagem parental *S.*

kudriavzevii CR90F4, iniciaram a fermentação em 3 horas e 15 minutos, 3 horas e 21 minutos, 3 horas e 28 minutos e 4 horas, respectivamente (figura 49).

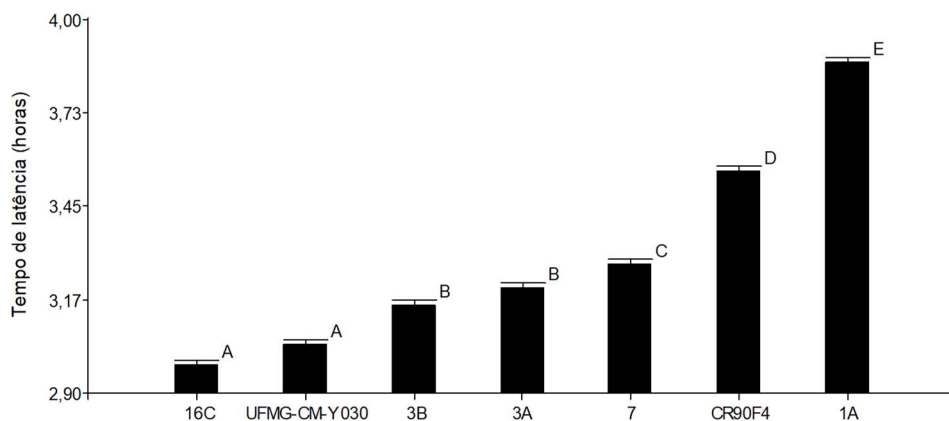


Figura 49 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de cachaça na temperatura de 28 °C. UFMG-CM-Y030: linhagem parental de *Saccharomyces Cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii*; híbridos: 1A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(1A), 3A - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3A), 3B - UFMG-CM-Y030XCR90F4(3B), 7 - UFMG-CM-Y030XCR90F4(7) e 16C - UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

9.2.3. Determinação açúcares e álcoois dos híbridos obtidos para a produção de cachaça

A determinação do consumo de açúcares e a produção de eritritol, glicerol, butanol e etanol foi feita a partir da fermentação do mosto sintético de cana de açúcar na temperatura de 28 °C após 336 horas (14 dias).

CAY1031xCR90F4

A tabela 17 e figura 50 mostram a análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas. A linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a linhagem que mais deixou o residual de sacarose, glicose e frutose, sendo com valores de $0,59 \pm 0,05$, $11,45 \pm 0,76$ e $40,82 \pm 0,469$ g / l, respectivamente. Quando observado o residual de sacarose, a parental *S. cerevisiae* foi a que mais consumiu esse açúcar, sendo esse resíduo de $0,02 \pm 0,02$ g / l, se diferenciando estatisticamente dos valores das outras linhagens estudadas.

Tabela 17 – Cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5).

Levedura	Açúcares residuais após fermentação (g/l)			Compostos produzidos a partir da fermentação (g/l)			
	Sacarose	Glicose	Frutose	Eritritol	Glicerol	Butanol	Etanol (%)
CR90F4	0,59 ±	11,45 ± 0,76	40,82 ±	0,67 ±	7,49 ± 0,152	0,57 ± 0,024	10,81 ±
	0,05 (d)	(b)	0,469 (e)	0,034 (e)	(a)	(b)	0,149 (a)
CAY1031	0,02 ±	0,11 ± 0,021	2,42 ± 0,114	0,47 ± 0,01	10,19 ±	0,55 ± 0,008	13,97 ±
	0,02 (a)	(a)	(c)	(b)	0,239 ©	(b)	0,163 ©
C8	0,4 ±	0,05 ± 0,005	0,48 ± 0,062	0,52 ± 0,01	10,96 ± 0,06	0,73 ± 0,008	13,96 ±
	0,023 ©	(a)	(a)	©	(d)	©	0,048 ©
D9	0,3 ±	0,02 ± 0,015	0,98 ± 0,052	0,6 ± 0,01	15,57 ±	1,03 ± 0,009	13,47 ±
	0,061 (b)	(a)	(b)	(d)	0,102 (e)	(d)	0,062 (b)
F5	0,33 ±	0,16 ± 0,023	4,98 ± 0,203	0,32 ±	7,96 ± 0,122	0,44 ± 0,008	13,63 ±
	0,029 (b)	(a)	(d)	0,024 (a)	(b)	(a)	0,143 (b)

Em relação à concentração do residual final da glicose, não houve diferença significativa entre os híbridos testados em comparação à linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031). Somente a linhagem vínica apresentou um maior valor residual desses compostos no mosto. O açúcar que apresentou maior variação em sua concentração final foi a frutose (figura 50). Esses valores foram diferentes estatisticamente para todas as linhagens estudadas. Os híbridos CAY1031xCR90F4(C8) e CAY1031xCR90F4(D9) foram os que mais consumiram esse açúcar, deixando valores residuais de $0,48 \pm 0,062$ e $0,98 \pm 0,05$ g/l, respectivamente.

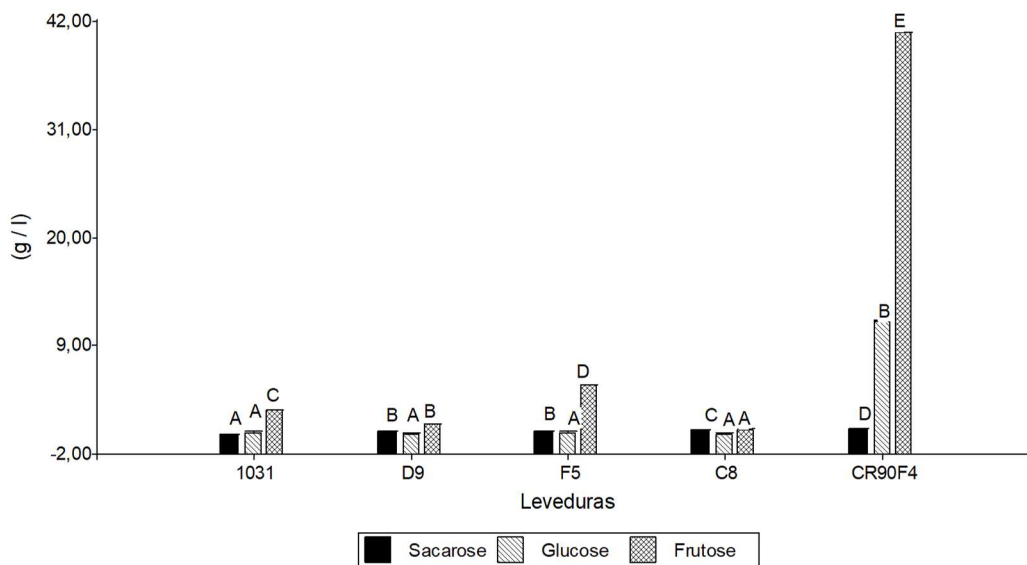


Figura 50 - Residual de sacarose, glicose e frutose (g / l) no mosto sintético de cachaça após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Considerando a concentração dos principais compostos produzidos pelas linhagens do estudo, a produção de eritritol e glicerol apresentou diferença estatística entre todas as linhagens estudadas figura 51. A linhagem que mais produziu eritritol foi a parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) ($0,67 \pm 0,034$ g / l) e a linhagem que mais produziu o glicerol foi o híbrido CAY1031xCR90F4(D9) ($15,57 \pm 0,102$ g / l). O híbrido CAY1031xCR90F4(D9) também produziu a maior quantidade de butanol ($1,03 \pm 0,009$ g / l), sendo esse valor estatisticamente diferente dos valores de todas as outras linhas híbridas e seus parentais. Em relação à produção do etanol, o híbrido que mais produziu esse composto foi o CAY1031xCR90F4(C8) $13,96 \pm 0,048$ g / l, e esse valor foi estatisticamente similar ao valor da linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031) que produziu $13,97 \pm 0,163$ g / l. A parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a linhagem que produziu a menor quantidade de etanol, $10,81 \pm 0,149$ g / l. Essa concentração pode estar ligada à baixa fermentação dos açúcares disponíveis no mosto.

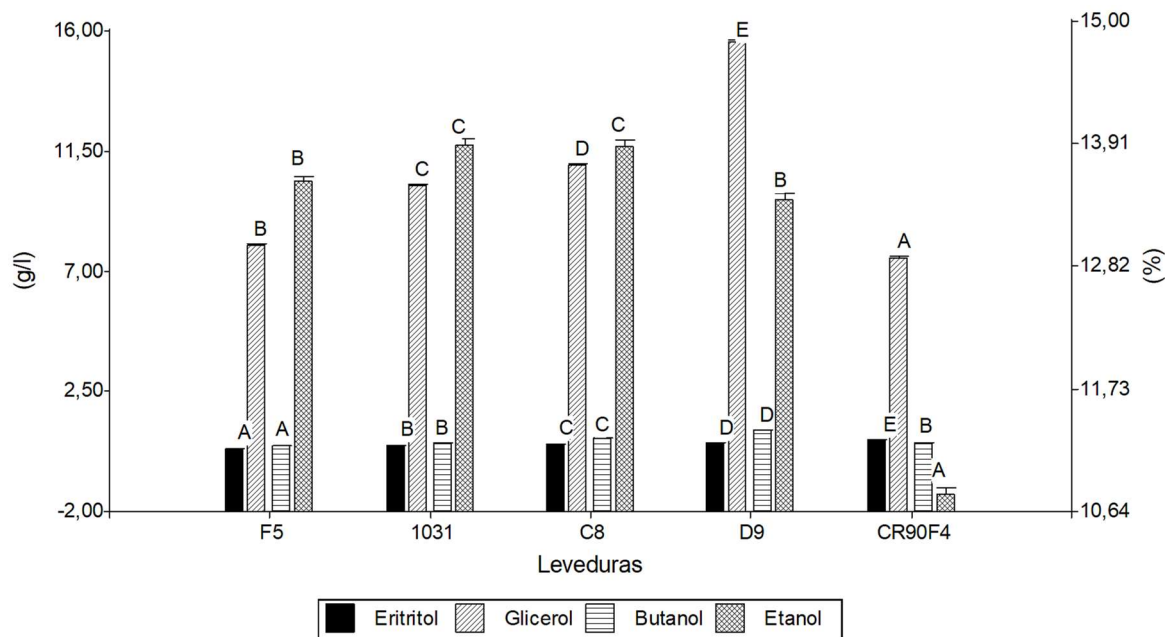


Figura 51 - Análise da produção de eritról, glicerol, butanol e etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

UFMG-CMY030XCR90F4

Os dois híbridos para a produção de cachaça apresentam um mesmo parental em comum, *S. kudriavzevii* (CR90F4), esse acaso se deve ao fato da obtenção de auxotróficos dessa linhagem apresentar melhores resultados na hibridação. A parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a linhagem que mais deixou um residual dos açúcares no mosto de cachaça. A linhagem parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) foi capaz de consumir todo o açúcar presente no mosto vínico e em contra partida, a parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a que mais deixou o residual desse açúcar (tabela – 18).

Tabela 18 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C).

Açúcares residuais após fermentação (g/l)				
Levedura	Sacarose	Glicose	Frutose	
16C	0,26 ± 0,024 (b,c)	0,91 ± 0,18 (b)	11,41 ± 1,131 (b)	
3A	0,3 ± 0,066 ©	0,01 ± 0,021 (a)	0,55 ± 0,032 (a)	
3B	0,12 ± 0,017 (a,b)	1,72 ± 0,11 ©	24,13 ± 0,545 ©	
7	0,08 ± 0,072 (a)	5,8 ± 0,295 (d)	29,72 ± 0,247 (d)	
CR90F4	0,42 ± 0,206 (d)	7,68 ± 0,047 (e)	38,3 ± 0,056 (e)	
Y030	0 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,57 ± 0,1 (a)	
Compostos produzidos a partir da fermentação (g/l)				
Levedura	Eritritol	Glicerol	Butanol	Etanol (%)
16C	0,2 ± 0,01 (a)	9,74 ± 0,054 ©	1,04 ± 0,01 ©	13,5 ± 0,103 (d)
3A	0,29 ± 0,012 ©	10,33 ± 0,112 (d)	1,27 ± 0,01 (e)	13,75 ± 0,084 (e)
3B	0,32 ± 0,006 (d)	11,58 ± 0,033 (e)	1,31 ± 0,008 (f)	11,89 ± 0,039 ©
7	0,24 ± 0,008 (b)	12,67 ± 0,159 (f)	1,15 ± 0,027 (d)	11,29 ± 0,152 (b)
CR90F4	0,65 ± 0,013 (e)	8,07 ± 0,056 (a)	0,69 ± 0,005 (a)	11,02 ± 0,021 (a)
Y030	0,23 ± 0,005 (b)	8,81 ± 0,077 (b)	0,8 ± 0,023 (b)	14,06 ± 0,067 (f)

Os valores do residual de glicose e frutose não se diferenciaram em relação ao híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(3A) (glicose: 0,3 ± 0,066 g / l frutose: 0,55 ± 0,032 g / l) e a parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) (glicose: 0 g / l frutose: 0,57 ± 0,1 g / l) (tabela 18 e figura 52). Esses valores foram as menores concentrações encontradas no residual final desses açúcares. A frutose foi o açúcar menos consumido pelas leveduras estudadas (figura 52). A ordem para os maiores residuais de frutose foi *S. kudriavzevii* (CR90F4) (38,3 ± 0,056 g / l), UFMG-CMY030XCR90F4(7) (29,72 g / l) UFMG-CMY030XCR90F4(3B) (24,13 g / l) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C) (11,41 g / l).

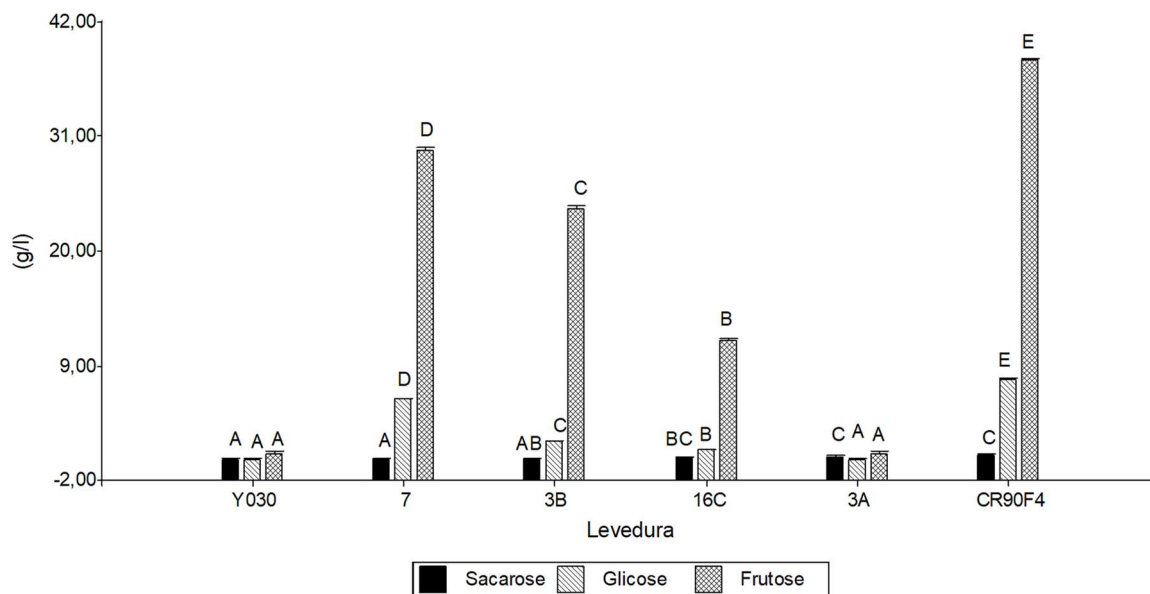


Figura 52 - Residual de sacarose, glicose e frutose (g / l) no mosto sintético de cachaça após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A figura 53 mostra a análise da produção de eritritol, glicerol, butanol e etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas. O híbrido CMY030XCR90F4(16C) foi o que menos produziu eritritol ($0,2 \pm 0,01$ g / l), e esse valor foi estatisticamente diferente ao valor produzido pela linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) que produziu, $0,65 \pm 0,013$ g / l. A quantidade de glicerol produzido por todas as linhagens estudadas se diferenciaram entre si. Sendo que o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(7), produziu a maior quantidade do composto ($12,67 \pm 0,159$ g / l).

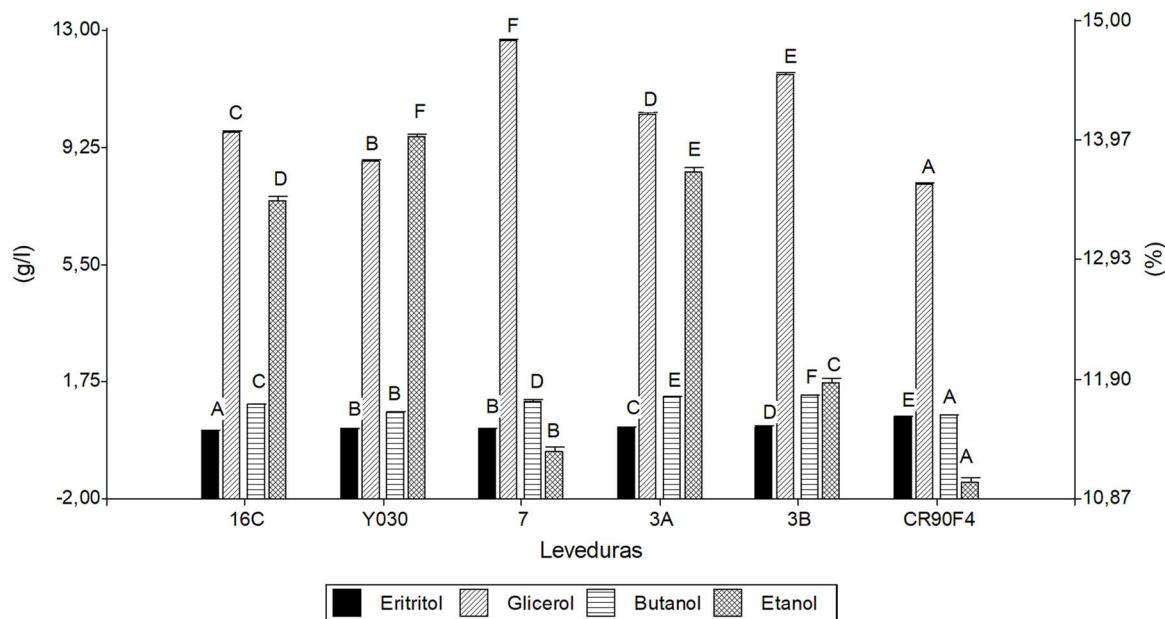


Figura 53 - Análise da produção de eritritol, glicerol, butanol e etanol após a fermentação do mosto cervejeiro utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

As linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) ($0,8 \pm 0,023$ g / l) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) ($0,69 \pm 0,005$ g / l) apresentaram os menores valores de produções de butanol. Os híbridos entre essas linhagens apresentaram os maiores valores de produção desse composto. Em relação à produção do etanol, ocorreu diferença estatística nos valores produzidos por todas a linhagens estudadas, e a linhagem que mais produziu etanol foi a parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030), $14,06 \pm 0,067$ %. A parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), foi a que que menos produziu esse composto ($11,02 \pm 0,021$ %) (tabela e figura 53).

9.2.4. Análise dos compostos voláteis produzidos pelos híbridos obtidos para a produção de cachaça por meio da cromatografia gasosa

CAY1031xCR90F4

A produção dos compostos, acetato de isobutila, 2-heptanona, acetato de hexilo, succinato de dietila, acetato de benzila, acetato de 2-feniletil foi testada mas nenhuma das

linhagens estudadas foram capazes de produzir qualquer um desses compostos, e por tanto esses resultados não estão expressos nas tabelas e gráficos a seguir. A tabela 19 mostra a concentração dos compostos que foram produzidos a partir da fermentação do mosto sintético de cachaça em temperatura de 28 °C. Na análise da produção do acetato de etila observou-se que o híbrido CAY1031xCR90F4(F5) foi o que mais produziu esse composto, $31,74 \pm 0,909$ mg / l, esse valor se diferenciou para todas as outras linhagens estudadas. A linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031) apresentou uma produção de $27,01 \pm 1,481$ mg / l, esse valor não se diferenciou estatisticamente para as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(C8) que apresentaram uma produção de $26,57 \pm 0,601$ e $27,31 \pm 1,269$ mg / l, respectivamente. Em relação a produção de isobutanol, as linhagens que menos produziram o composto, foram a linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031) ($111,76 \pm 6,806$ mg / l) e o híbrido CAY1031xCR90F4(D9) ($121,25 \pm 1,064$ mg / l). A produção de acetato de isoamila foi inferior a 1 mg / l para todas as linhagens estudadas.

Em relação à produção de álcool isoamílico, os híbridos CAY1031xCR90F4(C8) e CAY1031xCR90F4(F5) apresentaram as maiores produções do composto ($536,14 \pm 22,188$ e $516,17 \pm 26,976$ mg / l, respectivamente). O menor valor de produção foi observado na linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), que produziu $213,51 \pm 9,454$ mg / l. Somente a linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031) e o híbrido CAY1031xCR90F4(D9) foram capazes de produzir caproato de etila, mas essa produção não ultrapassou 0,1 mg / l.

Na produção do 1-hexanol, os híbridos CAY1031xCR90F4(F5) e CAY1031xCR90F4(C8) produziram as maiores quantidades do composto, $1,91 \pm 0,085$ e $1,64 \pm 0,156$ mg / l, respectivamente. Esses foram os maiores valores encontrados para a produção de 1-hexanol e se diferenciaram estatisticamente. A produção de caprilato de etila e caprato de etila não foi maior de 0,6 mg/l para todas as linhagens estudadas. Os híbridos CAY1031xCR90F4(F5) e CAY1031xCR90F4(C8) produziram a maior quantidade de etanol 2-feniletílico, $103,36 \pm 28,234$ e $101,47 \pm 10,489$ mg/l, respectivamente. Esses valores não se diferenciaram estatisticamente em relação a linhagem parental *S. cerevisiae* (CAY1031) que produziu uma concentração de $62,22 \pm 18,243$ mg / l.

Tabela 19 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5).

Leveduras	Acetato de etila	Isobutanol	Acetato de isoamila	Álcool isoamílico	Caproato de etila
CAY1031	27,01 ± 1,481 (b)	111,76 ± 6,806 (a)	0,95 ± 0,024 ©	373,73 ± 27,485 (b)	0,1 ± 0,001 ©
CR90F4	16,71 ± 0,501 (a)	148,25 ± 9,01 (b)	0 ± 0 (a)	213,51 ± 9,454 (a)	0 ± 0 (a)
D9	26,57 ± 0,601 (b)	121,25 ± 1,064 (a)	0,85 ± 0,019 (b)	322,92 ± 11,686 (b)	0,09 ± 0,004 (b)
C8	27,31 ± 1,269 (b)	162,15 ± 5,897 (b)	0,84 ± 0,01 (b)	536,14 ± 22,188 ©	0 ± 0 (a)
F5	31,74 ± 0,909 ©	155,27 ± 7,967 (b)	0,83 ± 0,003 (b)	516,17 ± 26,976 ©	0 ± 0 (a)
Leveduras	1-hexanol	Caprilato de etila	Caprato de etila	Etanol 2-feniletílico	
CAY1031	1,44 ± 0,096 (a)	0,06 ± 0,001 ©	0,05 ± 0,001 (a,b)	62,22 ± 18,243 (a,b)	
CR90F4	1,44 ± 0,215 (a)	0,06 ± 0,001 (b)	0,05 ± 0,002 (a)	39,28 ± 2,658 (a)	
D9	1,44 ± 0,162 (a)	0,06 ± 0,003 ©	0,06 ± 0,008 ©	36,4 ± 8,694 (a)	
C8	1,64 ± 0,156 (a,b)	0,06 ± 0,002 ©	0,06 ± 0,003 (b,c)	101,47 ± 10,489 (b)	
F5	1,91 ± 0,085 (b)	0 ± 0 (a)	0,05 ± 0,002 (a,b)	103,36 ± 28,234 (b)	

*Compostos estão representado em mg / l.

A figura 54 mostra a análise de componentes principais dos componentes aromáticos produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas. Dentre os compostos analisados, a linhagem (CR90F4) apresentou o perfil mais heterogêneo em relação às demais linhagens estudadas. A parental *S. cerevisiae* (CAY1031) apresenta um perfil de produção dos compostos aromáticos similar à linhagem híbrida CAY1031xCR90F4(D9). Já os híbridos CAY1031xCR90F4(C8) e CAY1031xCR90F4(F5) se apresentaram similares quanto a produção dos compostos aromáticos de acordo com a plotagem em que foi aplicado no teste de PCA figura 54.

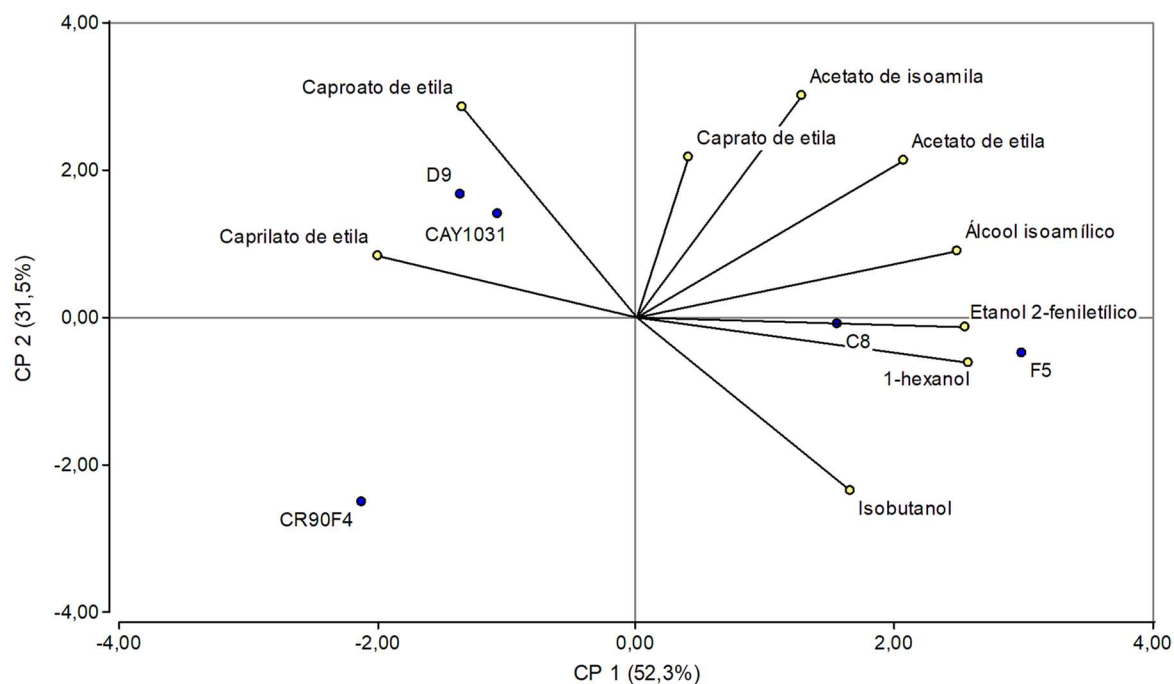


Figura 54 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5).

UFMG-CMY030XCR90F4

A produção dos compostos, acetato de isobutílica, 2-heptanona, acetato de hexilo, succinato de dietila, acetato de benzila, acetato de 2-feniletílica foi testada mas nenhuma das linhagens estudadas foram capazes de produzir qualquer um desses compostos, e por tanto esses resultados não estão expressos nas tabelas e gráficos a seguir. Esse mesmo padrão foi visto para os híbridos CAY1031xCR90F4. A tabela 20 mostra que o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(7) foi o que mais produziu acetato de etila ($54,35 \pm 7,342$ mg/l). Esse valor é estatisticamente diferente do valor produzido por todas as outras linhagens do estudo. A linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a que menos produziu acetato de etila, $19,33 \pm 4,045$ mg/l, porém, esse valor não foi estatisticamente diferente dos valores produzidos por UFMG-CMY030XCR90F4(3A) ($26,71 \pm 6,851$ mg/l) e pela parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) ($30,87 \pm 1,716$ mg/l). Em relação a produção de isobutanol somente o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(3A) apresentou produção estatisticamente semelhante às linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4). Os outros 3 híbridos produziram uma concentração elevada e não se diferenciando estatisticamente entre eles.

Tabela 20 – Análise em cromatografia gasosa dos compostos voláteis produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C).

Levedura	Acetato de etila	Isobutanol	Acetato de isoamila	Álcool isoamílico	Caproato de etila
16C	45,95 ± 7,024 (c,d)	271,16 ± 3,393 (b)	0 ± 0 (a)	735,25 ± 194,802 ©	5,88 ± 1,3 ©
3A	26,71 ± 6,851 (a,b)	154,91 ± 37,43 (a)	0 ± 0 (a)	317,66 ± 59,173 (a)	2,02 ± 0,263 (b)
3B	34,64 ± 3,119 (b,c)	282,03 ± 34,231 (b)	0 ± 0 (a)	314,01 ± 35,563 (a)	1,91 ± 0,318 (b)
7	54,35 ± 7,342 (d)	257,79 ± 48,496 (b)	0 ± 0 (a)	600,41 ± 111,728 (b,c)	2,35 ± 0,16 (b)
CR90F4	19,33 ± 4,045 (a)	144,4 ± 12,33 (a)	0 ± 0 (a)	233,7 ± 22,262 (a)	0 ± 0 (a)
Y030	30,87 ± 1,716 (a,b)	109,6 ± 10,209 (a)	0,85 ± 0,006 (b)	341,41 ± 34,501 (a,b)	1,69 ± 0,194 (b)

Levedura	1-hexanol	Caprilato de etila	Caprato de etila	Etanol 2-feniletílico
16C	0 ± 0 (a)	0,13 ± 0,017 (c)	0 ± 0 (a)	309,1 ± 35,018 (c)
3A	0,06 ± 0 (b)	0,08 ± 0,019 (b)	0 ± 0 (a)	96,86 ± 31,659 (b)
3B	0 ± 0 (a)	0,05 ± 0,003 (a)	0 ± 0 (a)	65,04 ± 7,43 (a,b)
7	0 ± 0 (a)	0,07 ± 0,007 (a,b)	0 ± 0 (a)	95,53 ± 14,64 (a,b)
CR90F4	0,06 ± 0,001 (b)	0,05 ± 0,002 (a)	0 ± 0 (a)	46,95 ± 9,634 (a,b)
Y030	0,07 ± 0,003 (c)	0,07 ± 0,007 (a,b)	2 ± 0,038 (b)	38,99 ± 0,248 (a)

*Compostos estão representado em mg / l.

Somente a linhagem parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) produziu acetato de isoamila ($0,85 \pm 0,006$ mg / l) e caprato de etila ($2 \pm 0,038$ mg/l). Os híbridos UFMG-CMY030XCR90F4(16C) e UFMG-CMY030XCR90F4(7) foram os que mais produziram álcool isoamílico, sendo essa produção de $735,25 \pm 194,802$ e $600,41 \pm 111,728$ mg/l, respectivamente. As linhagens parentais e os híbridos UFMG-CMY030XCR90F4(3A) e UFMG-CMY030XCR90F4(3B) produziram quantidades inferiores de álcool isoamílico, e esses valores não se diferenciaram estatisticamente. A linhagem *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a única a não produzir caproato de etila. Já o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(16C) se destacou na produção desse composto, $5,88 \pm 1,3$ mg / l, esse valor foi superior ao visto para a parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e para os demais híbridos.

Observa-se também que a produção de 1-hexanol e caprilato de etila foi baixa em comparação com a maioria dos outros compostos analisados, sendo que a maior produção foi vista para o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(16C), que produziu $0,13 \pm 0,017$ mg/l de caprilato de etila. Na produção do etanol 2-fenilético, ocorreu super produção pelo híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(16C), $309,1 \pm 35,018$ mg/l, esse valor se diferenciou estatisticamente até mesmo para as linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) que produziram, $38,99 \pm 0,248$ e $46,95 \pm 9,634$ mg/l, respectivamente.

O gráfico de multicomponente dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas das linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4 e seus parentais (figura 55), mostra que a linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) apresentou perfil de compostos mais neutra em relação à produção dos compostos produzidos pelas outras linhagens do estudo. Porém, nessa análise podem-se também observar que o híbrido UFMG-CMY030XCR90F4(3A) apresentou um perfil aromático similar à linhagem parental. Os híbridos UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C) apresentaram perfis aromáticos semelhantes, e uma maior similaridade foi observada entre os híbridos UFMG-CMY030XCR90F4(3B) e UFMG-CMY030XCR90F4(7). A parental *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) apresentou um perfil aromático diferente em comparação às outras linhagens, sendo assim, plotada em uma região isolada no gráfico de multicomponentes.

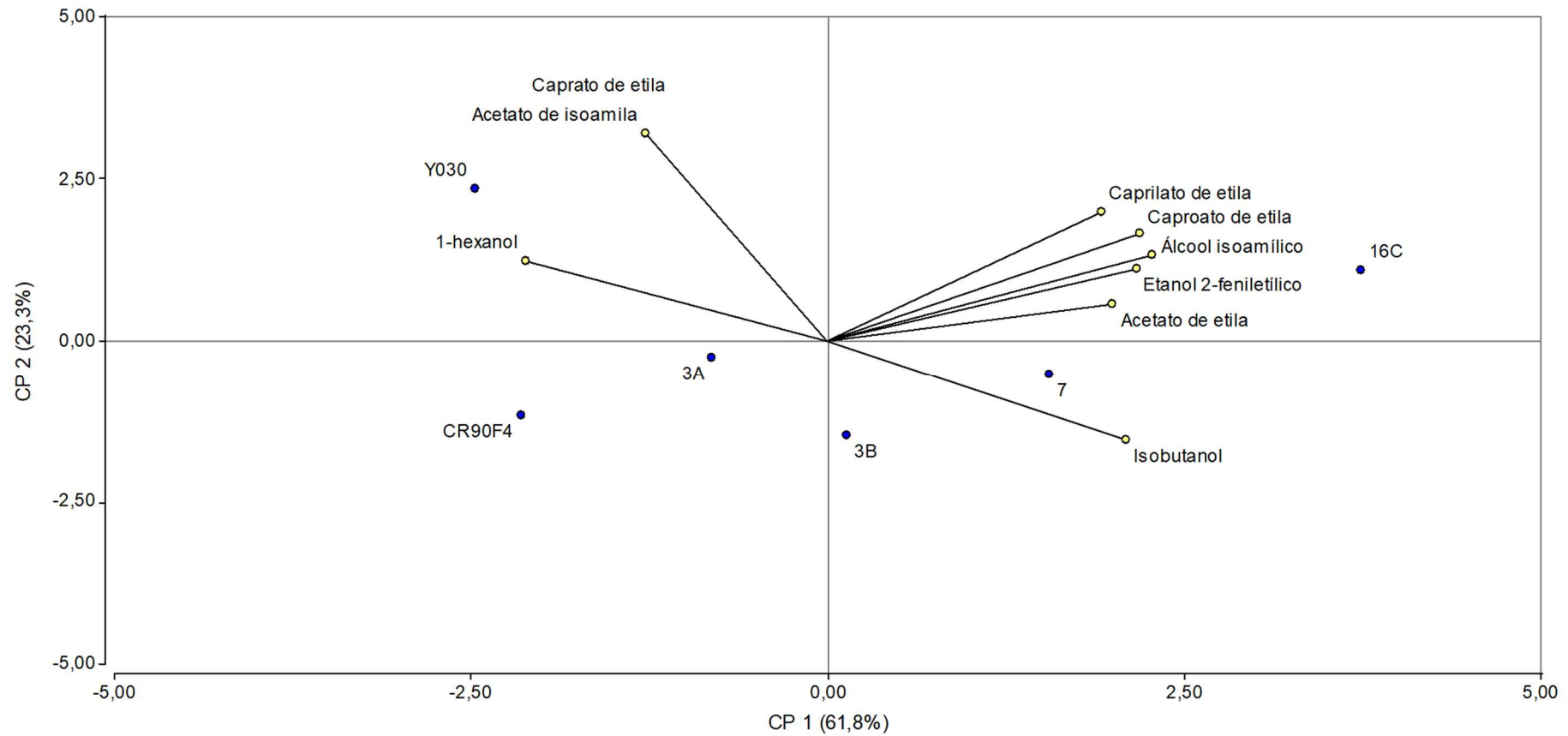


Figura 55 – Gráfico de multicomponentes dos compostos aromáticos produzidos pelas linhagens parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CMY030) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas UFMG-CMY030XCR90F4(3A), UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16)

9.3. Híbridos de vinho

Para a obtenção dos híbridos vínicos foram selecionados mutantes auxotróficos para lisina das linhagens CIEN5A e CIEN12 de *S. cerevisiae* e o mutante auxotrófico para *S. kudriavzevii* CR90F4 que também foi utilizado anteriormente para a produção dos híbridos para cachaça e cerveja (tabela 21). A análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial mostrou que as linhagens auxotróficas eram idênticas as linhagens parentais de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*.

Tabela 21 – Pares complementares de mutantes auxotróficos para obtenção de híbridos para a produção vínica.

		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
		CIEN 5A			CIEN 12T		
		lys-	ura-	trp-	lys-	ura-	trp-
<i>S. kudriavzevii</i>	CR90F4	lys- ura-	█	█	lys- ura-	█	█
		trp-	✓	█	trp-	█	█

*Células com tracejado informa que não foi obtido o mutante auxotrófico para aquele determinado aminoácido.

Foram obtidos os híbridos CIEN5AxCR90F4 e CIEN12TxCR90F4. A natureza híbrida foi confirmada por meio da amplificação dos genes nucleares codificadores da proteína GSY₁ e MAG₂.

9.3.1. Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CIEN5AxCR90F4

Após a geração do híbrido, testes de caracterização foram feitos para confirmação e verificação da estabilidade. A esporulação da levedura foi induzida por incubação em meio acetato por 7 dias a temperatura de 28 °C. Os esporos resultantes foram dissecados com o auxílio do micromanipulador. Dentre os 60 esporos dissecados, 32 foram viáveis e cresceram em meio de cultura (tabela 22). Esporos originados a partir de uma mesma asca foram codificados com o mesmo número, e as letras presentes no código representam a quantidade de esporos viáveis da asca.

Tabela 22 - Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CIEN5XCR90F4.

Esporo	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	KEL ₂ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	Inter-δ	RAPD-R3	
1A	C	CK	CK	CIEN5	*	Iguais	Diferente
1B	CK	C	C	CIEN5	*	Iguais	Diferente
1C	CK	C	C	CIEN5			
1D	C	CK	CK	CIEN5	*	Iguais	Iguais

Esporo	Caracterização dos esporos				Fermentação		
	MAG ₂ (XII)	KEL ₂ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	Inter- δ	RAPD-R3	
2A	CK	C	C	CIEN5			
2B	-	C	CK	CIEN5			
2C	CK	C	C	CIEN5	* Diferentes	Diferentes	
3A	CK	CK	C	CIEN5	* Iguais	Iguais	
3B	-	CK	C	CIEN5			
3C	C	C	CK	CIEN5	* Iguais	Iguais	
5A	CK	C	CK	CIEN5	* Iguais	Iguais	
5B	CK	C	CK	CIEN5			
5C	C	C	C	CIEN5			
6A	CK	C	C	CIEN5	* Iguais	Iguais	
6B	CK	C	C	CIEN5			
7A	C	-	K	CIEN5	* Iguais	Iguais	
7B	CK	C	C	CIEN5	* Diferentes	Iguais	
7C	CK	C	C	CIEN5			
8A	CK	C	CK	CIEN5			
8B	CK	C	CK	CIEN5			
8C	C	CK	C	CIEN5	* Iguais	Iguais	
9A	C	CK	C	-			
9B	CK	C	CK	CIEN5			
9C	CK	C	CK	CIEN5			
9D	C	CK	C	-			
10A	CK	C	C	CIEN5			
10B	C	C	CK	CIEN5			
10C	C	C?	CK	CIEN5			
10D	CK	C?	C	CIEN5			
12A	CK	C?	C	CIEN5			
1A-1	C	CK	CK	CIEN5	* Iguais	Iguais	
1B7	CK	C	C	CIEN5	* Iguais	Iguais	

*CK: *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* C: *S. cerevisiae* e K: *S. kudriavzevii*. GSY₁, KEL e MAG₂: iniciadores codificadores do gene que amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. Padrões moleculares obtidos por mtDNA-RFLP (mtDNA), polimorfismos de DNA de sequência interdelta (δ -PCR) e análise de RAPD utilizando o iniciador R3 (RAPD-R3). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

A caracterização dos esporos foi realizada pela técnica RFLP com os iniciadores GSY₁, KEL e MAG₂. A figura 56 mostra os géis de eletroforese utilizando os iniciadores supracitados. Observa-se que somente o esporo 5C apresentou o alelo de *S. cerevisiae* para todos os iniciadores utilizados. Portanto optou-se por não seguir os estudos com esse esporo.

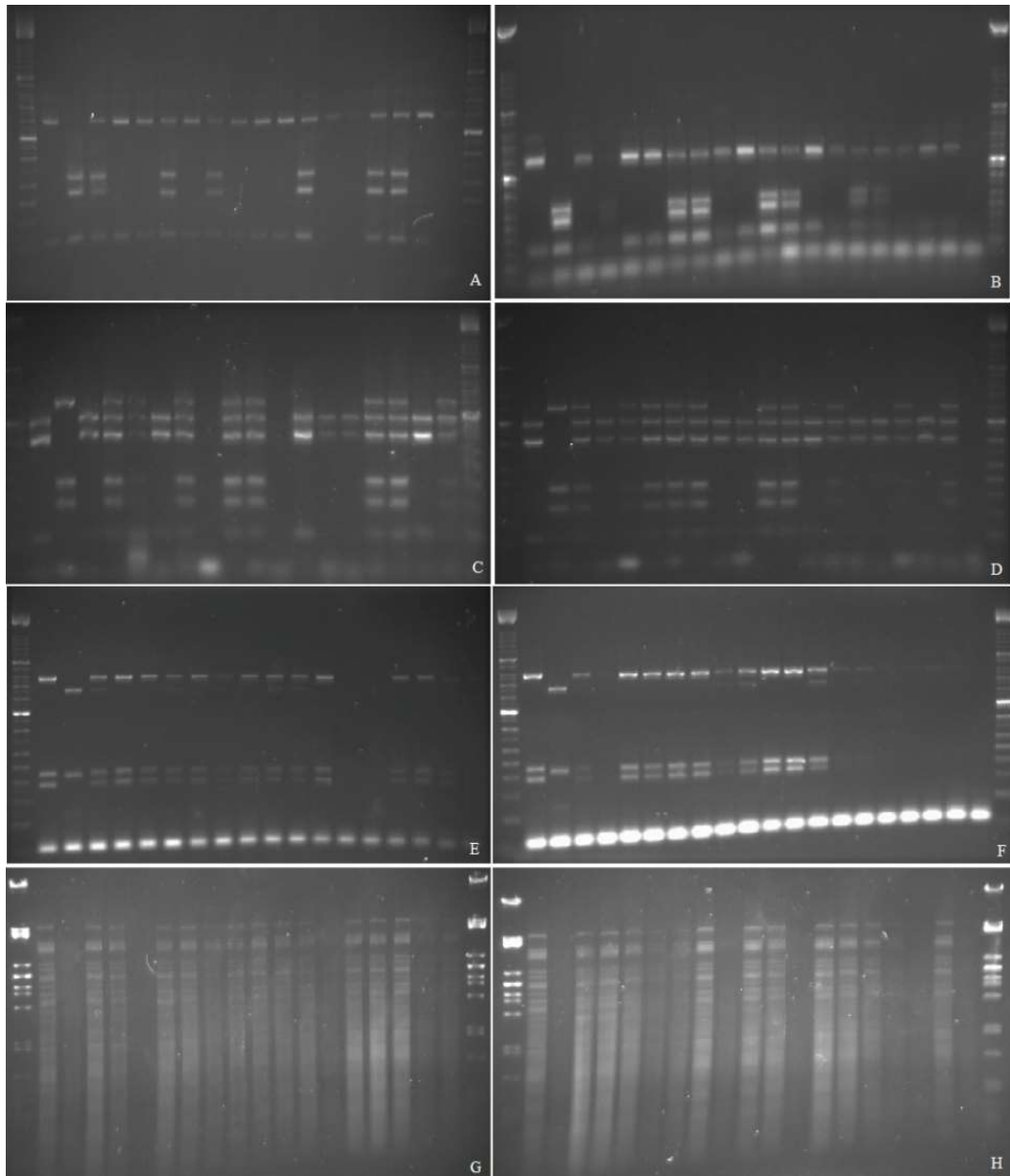


Figura 56 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido CIEN5xCR90F4 utilizando os genes codificadores de proteínas GSY₁, KEL e MAG₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial. **A)** GSY₁ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *Saccharomyces cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 1A a 6A. **B)** GSY₁ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 6B a 12B **C)** MAG₂ – ordem das amostras: igual a letra A. **D)** MAG₂ – ordem das amostras: igual a letra B. **E)** KEL₁ – ordem das amostras: igual a letra A. **F)** KEL₁ – ordem das amostras: igual a letra B. **G)** DNA mitocondrial – ordem das amostras: levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 1A a 6B. **H)** perfil de restrição do DNA mitocondrial – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 7A a 12A.

O agrupamento das colônias foi feito por meio da caracterização das colônias resultantes dos esporos utilizando os genes nucleares codificadores da proteína GSY₁, MAG₂ e UGA₃. Uma ou mais colônias de cada grupo foram selecionadas para a fermentação em mosto sintético de vinho. Após sucessivas fermentações, uma alíquota foi plaqueada em meio de cultura e após o crescimento das colônias, selecionou-se 10 aleatoriamente, onde, foi feito a PCR inter- δ e a PCR-RAPD com o iniciador R3 para confirmação da estabilidade do híbrido. Quando as colônias isoladas da fermentação não apresentavam o perfil de bandeamento de tamanho correspondentes aos fragmentos presentes nos perfis do híbrido original, outras colônias eram testadas (figura 57). Como mostrado na tabela 22 e na figura 57, os híbridos 1A, 1B, 2C e 7B não se mantiveram estáveis após as fermentações e por isso não foi dado continuidade aos testes utilizando essas linhagens. Também foi feita a caracterização da análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial das colônias resultantes dos esporos e todos fragmentos do perfil de bandeamento similar ao da linhagem de *S. cerevisiae* (figura 56).

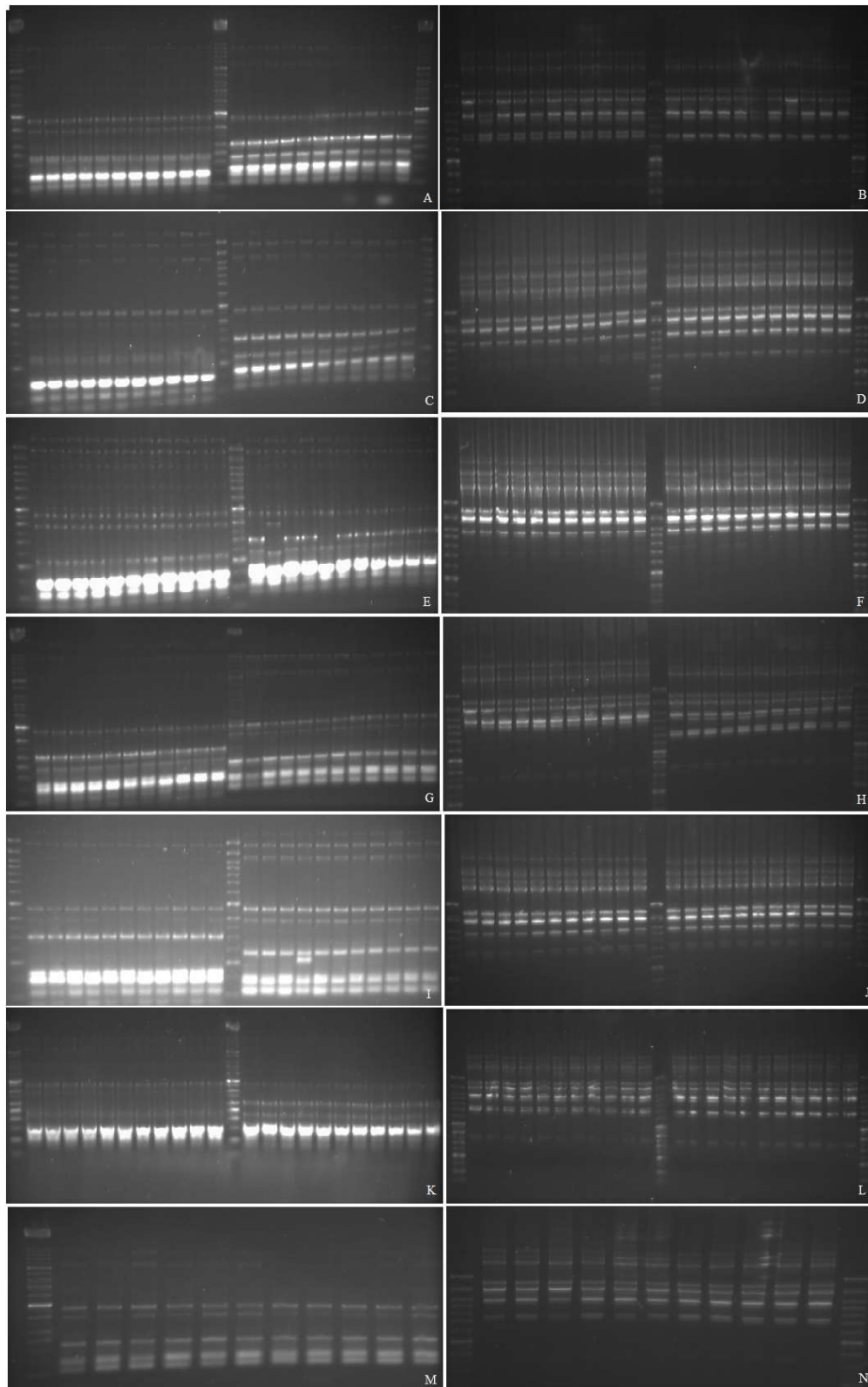


Figura 57 – Confirmação de estabilidade do híbrido CIEN5xCR90F4. **A)** RAPD-R3 das colônias dos esporos 1A e 1B. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 1A isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, 10 colônias originadas do esporo 1B isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **B)** Inter- δ das colônias 1A e 1B. A ordem das amostras é a mesma da letra A. **C)** RAPD-R3 das colônias 1A1 e 1B7. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 1A1 e 1B7. **D)** Inter- δ das colônias 1A1 e 1B7. A ordem das

amostras é a mesma da letra C. **E)** RAPD-R3 das colônias 1D e 2C. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 1D e 2C. **F)** Inter- δ das colônias 1D e 2C. A ordem das amostras é a mesma da letra E. **G)** RAPD-R3 das colônias 3A e 3C. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 3A e 3C. **H)** Inter- δ das colônias 3A e 3C. A ordem das amostras é a mesma da letra G. **I)** RAPD-R3 das colônias 6A e 7B. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 6A e 7B. **J)** Inter- δ das colônias 6A e 7B. A ordem das amostras é a mesma da letra I. **K)** RAPD-R3 das colônias 7A e 8C. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 7A e 8C. **L)** Inter- δ das colônias 7A e 8C. A ordem das amostras é a mesma da letra K. **M)** RAPD-R3 das colônias 5A. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original e 10 colônias originadas do esporo 5A. **N)** Inter- δ das colônias 5A. A ordem das amostras é a mesma da letra N.

9.3.2. Caracterização e confirmação de estabilidade do híbrido CIEN12TxCR90F4

A esporulação do híbrido CIEN12TxCR90F4 apresentou baixa viabilidade de esporos. Dos 160 esporos dissecados apenas nove cresceram no meio de cultura YPD. O resumo da caracterização dos esporos de acordo com os genes codificadores de proteína GSY₁, KEL e MAG₂ é mostrada na tabela 23. A nomenclatura dos esporos segue o mesmo parâmetro dos esporos dos outros híbridos.

Tabela 23 - Resumo dos testes feitos para a caracterização e estabilidade dos esporos do híbrido CIEN12TxCR90F4.

Esporos	Caracterização dos esporos				Fermentação	
	MAG ₂ (XII)	KEL ₂ (VII)	GSY ₁ (VI)	mtDNA	Inter- δ	RAPD-R3
1A	CK	C	CK		Iguais	Iguais
1B	CK	C	CK	CIEN12	Diferentes	Iguais
1C	CK	C	CK	CIEN12	Iguais	Iguais
1D	CK	C	CK	CIEN12	Iguais	Iguais
2A	C	K	CK	CIEN12	Diferentes	Diferentes
3A	C	K	CK	CIEN12	Diferentes	Diferentes
3B	C	K	CK	CIEN12	Diferentes	Diferentes
4A	C	K	CK			Diferentes
4B	C	K	CK	CIEN12		Diferentes

*CK: *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kudriavzevii* C: *S. cerevisiae* e K: *S. kudriavzevii*. GSY₁, KEL e MAG₂: iniciadores codificadores do gene que amplificam, respectivamente, as regiões XII, VII e VI do cromossomo da levedura. Padrões moleculares obtidos por mtDNA-RFLP (mtDNA), polimorfismos de DNA de sequência interdelta (δ -PCR) e análise de RAPD utilizando o iniciador R3 (RAPD-R3). Os esporos que apresentam a mesma numeração são esporos originários da mesma asca e as letras informam a quantidade de esporos viáveis de uma mesma asca.

Os esporos produzidos pelo híbrido CIEN12TxCR90F4 formaram apenas dois grupos nos géis de eletroforese da caracterização molecular quando comparados os alelos da sequência dos genes *GSY*₁, *MAG*₂ e *KEL*₁ (figura 58). Na análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial, somente os esporos 1A e 4A não foram capazes de amplificar a região do DNA mitocondrial. Os demais apresentaram similaridade com o DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* CIEN12T (figura 58).

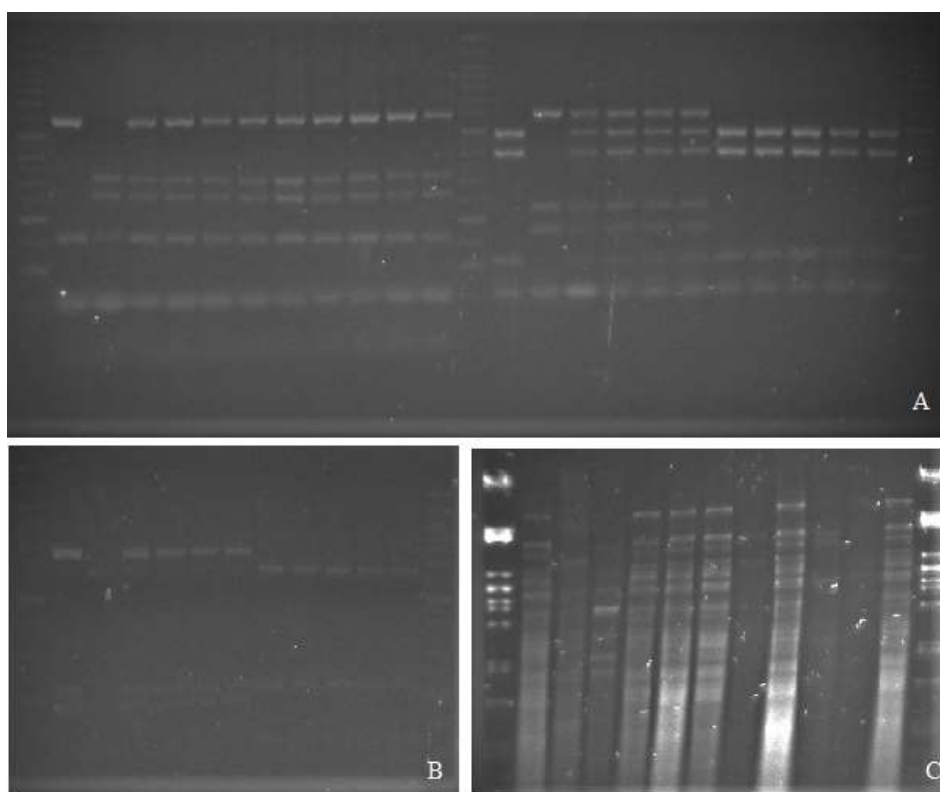


Figura 58 – Eletroforese em gel de agarose da caracterização molecular dos esporos do híbrido CIEN12TxCR90F4 utilizando os genes codificadores de proteínas *GSY*₁, *KEL* e *MAG*₂ e análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial. **A)** *GSY*₁ e *MAG*₂ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 1A a 4B. **B)** *KEL*₁ – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii*, esporos viáveis do híbrido do número 1A a 4B e padrão de peso molecular. **C)** Perfil de restrição do DNA mitocondrial – ordem das amostras: padrão de peso molecular, levedura parental de *S. cerevisiae*, parental de *S. kudriavzevii* e os esporos viáveis do híbrido do número 1A a 4B.

Por haver poucas linhagens para o teste, optou-se por executar a fermentação em mosto sintético de vinho com todas as linhagens originadas dos esporos encontrados. As colônias originadas das fermentações em mosto sintético de vinho utilizando os esporos 1A, 1C e 1D foram os únicos que se mantiveram estáveis, apresentando os perfis de fragmentos de DNA similares aos dos híbridos originais (figura 59).

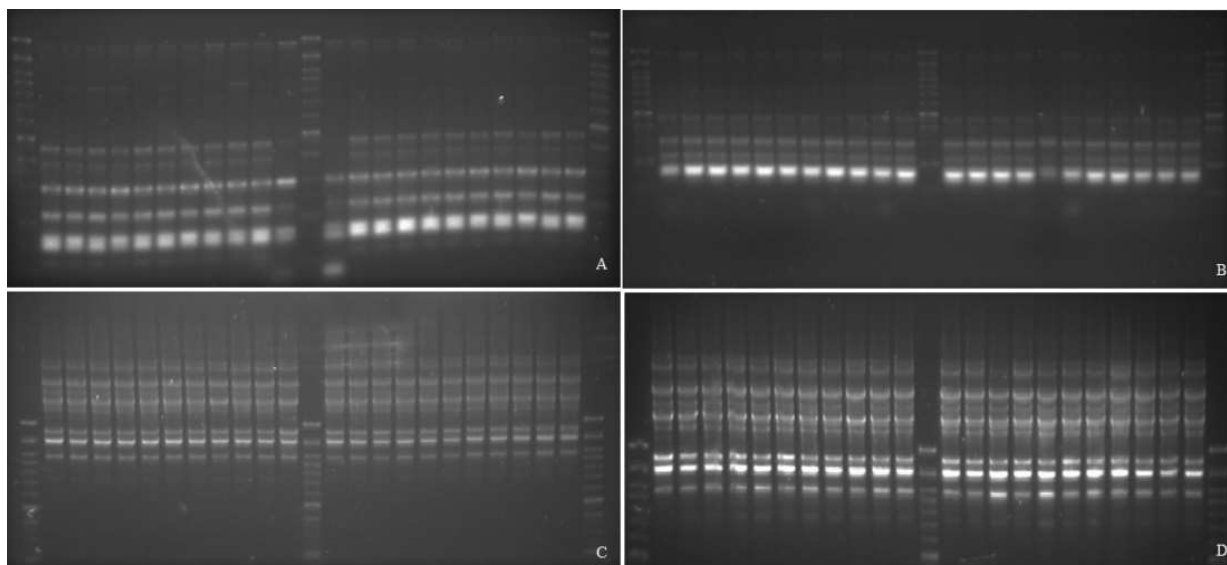


Figura 59 – Confirmação de estabilidade do híbrido CIEN12xCR90F4. **A)** Inter- δ das colônias 1A e 1B. Ordem das amostras: padrão de peso molecular, híbrido original, 10 colônias originadas do esporo 1A isoladas após a fermentação, padrão de peso molecular, 10 colônias originadas do esporo 1B isoladas após a fermentação e novamente o padrão de peso molecular. **B)** Inter- δ das colônias 1C e 1D. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 1C e 1D. **C)** RAPD-R3 das colônias 1A e 1D. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 1A e 1D. **D)** RAPD-R3 das colônias 1B e 1C. A ordem das amostras foi seguindo a mesma sequência da letra A, porém, com os esporos 1B e 1C.

9.3.3. Fermentação em escala laboratorial de vinho

Os linhagens híbridas que apresentaram estabilidade nos testes anteriores foram utilizadas no processo de fermentação em escala de bancada do mosto sintético de vinho a temperatura de 25 °C (tabela 24).

Tabela 24 – Híbridos utilizados para a fermentação vínica em escala laboratorial

Linhagens para a fermentação de bancada	
CIEN5A	CIEN12T
CR90F4	CR90F4
CIEN5AxCR90F4(1A1)	CIEN12TxCR90F4(1A)
CIEN5AxCR90F4(1B7)	CIEN12TxCR90F4(1C)
CIEN5AxCR90F4(1D)	CIEN12TxCR90F4(1D)
CIEN5AxCR90F4(3A)	
CIEN5AxCR90F4(3C)	
CIEN5AxCR90F4(5A)	
CIEN5AxCR90F4(7A)	
CIEN5AxCR90F4(8C)	

Híbrido CIEN5AxCR90F4

A fermentação em escala de bancada das linhagens híbridas de CIEN5AxCR90F4 em mosto sintético de vinho foi crucial para a seleção de linhagens com boas características fermentativas. Quatro das oito linhagens híbridas não foram capazes de fermentar eficientemente o mosto vínicu na temperatura de 25°C, pois apresentaram a fermentação arrastada até 216 horas de análise (figura 60). Deste modo, as linhagens CIEN5AxCR90F4(1B7), CIEN5AxCR90F4(3A), CIEN5AxCR90F4(5A) e CIEN5AxCR90F4(8C) não foram utilizadas nos experimentos posteriores.

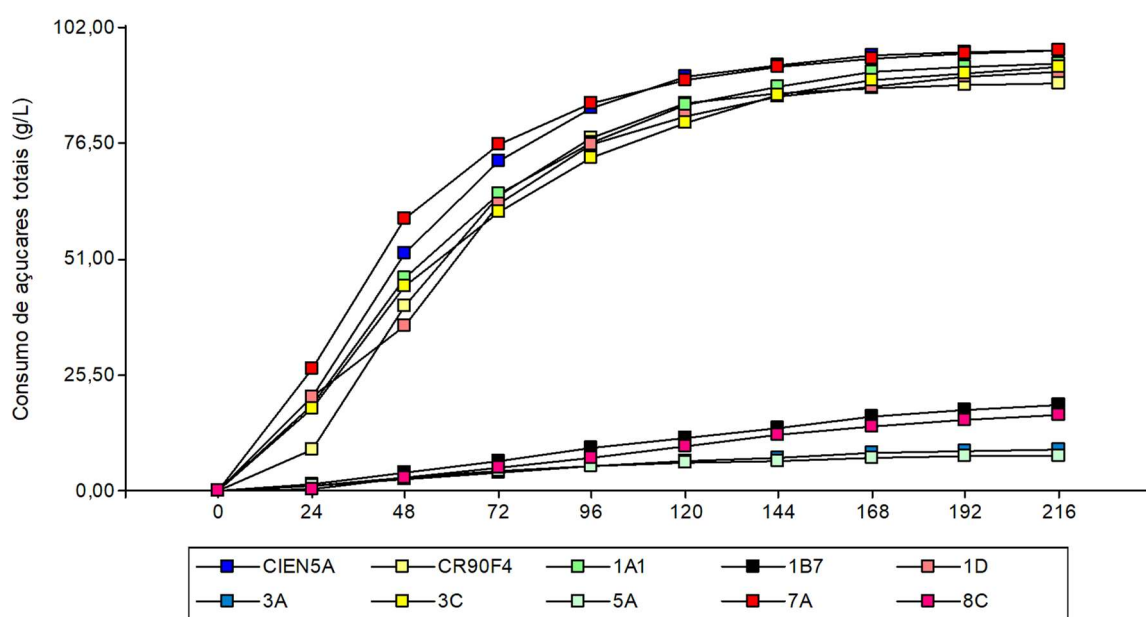


Figura 60 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C em intervalos de 24 horas. CIEN5: linhagem parental de *Saccharomyces cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN5AxCR90F4 (1A1), CIEN5AxCR90F4 (1B7), CIEN5AxCR90F4 (1D), CIEN5AxCR90F4 (3A), CIEN5AxCR90F4 (3C), CIEN5AxCR90F4 (5A), CIEN5AxCR90F4 (7A) e CIEN5AxCR90F4 (8C).

A figura 61 mostra que as linhagens híbridas não apresentaram diferença estatística em relação à linhagem parental *S. cerevisiae* (CIEN5A) que consumiu 97,0 g / l dos açúcares totais. A linhagem parental *S. kudriavzevii* CR90F4 consumiu 89,80 g / l. Esse valor foi estatisticamente diferente do valor apresentado pelas linhagens CIEN5AxCR90F4(7A) (96,95 g / l) e CIEN5A.

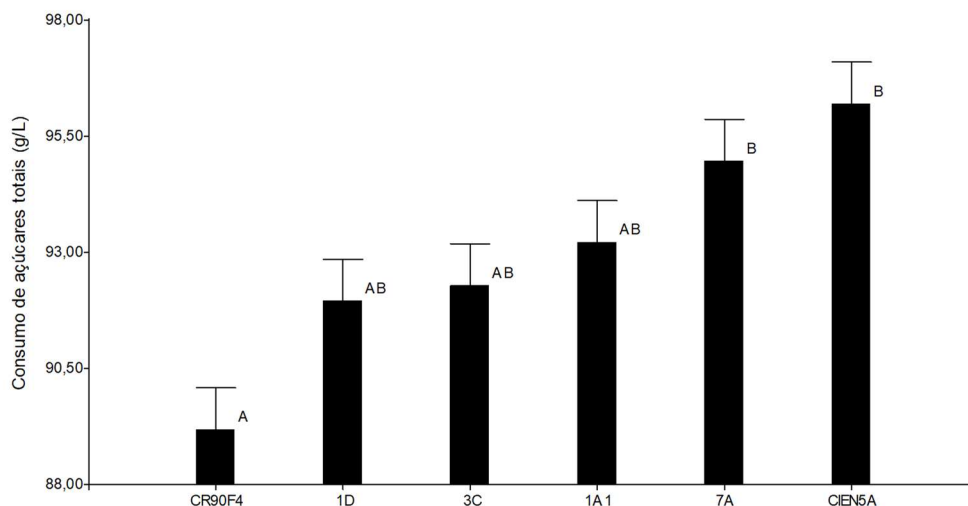


Figura 61 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C. CIEN5: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN5AxCR90F4 (1A1), CIEN5AxCR90F4 (1D), CIEN5AxCR90F4 (3C) e CIEN5AxCR90F4 (7A). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Em relação ao período de latência para iniciar o processo fermentativo, a linhagem parental CR90F4 demorou 6 horas para iniciar a fermentação (figura 62). Esse período foi diferente estatisticamente para todas as outras linhagens. A linhagem híbrida CIEN5AxCR90F4(3C) apresentou o menor tempo de latência (3 horas e 17 minutos), estatisticamente diferente do tempo da linhagem CIEN5A (4 horas) e CR90F4. No entanto, ambos os períodos de latência não se diferenciaram estatisticamente dos outros híbridos (figura 62).

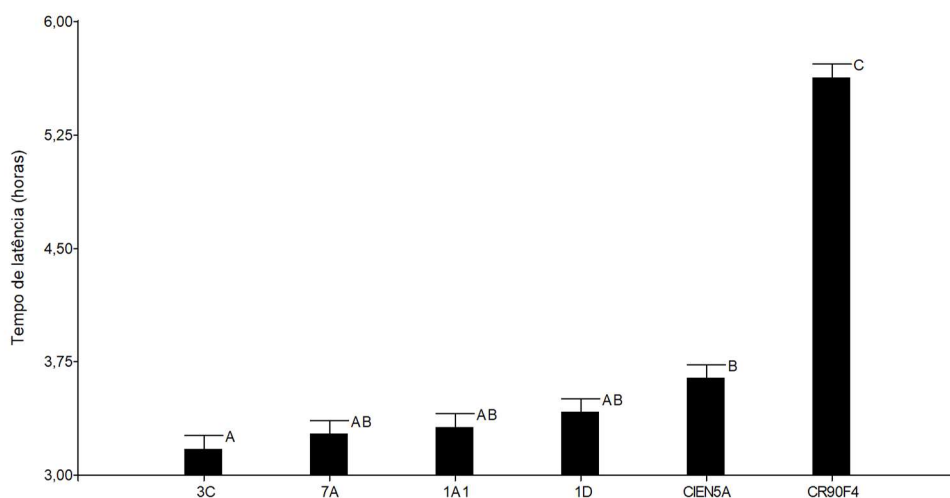


Figura 62 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de vinho utilizando as linhagens na temperatura de 25 °C. CIEN5: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN5AxCR90F4 (1A1),

CIEN5AxCR90F4 (1D), CIEN5AxCR90F4 (3C) e CIEN5AxCR90F4 (7A). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Híbrido CIEN12TxCR90F4

O híbrido CIEN12TxCR90F4, as linhagens parentais *S. cerevisiae* CIEN12T e *S. kudriavzevii* CR90F4 e as três linhagens híbridas CIEN12TxCR90F4(1A), CIEN12TxCR90F4(1C) e CIEN12TxCR90F4(1D) iniciaram o processo de fermentação do mosto vínico antes de 24 horas (figura 63).

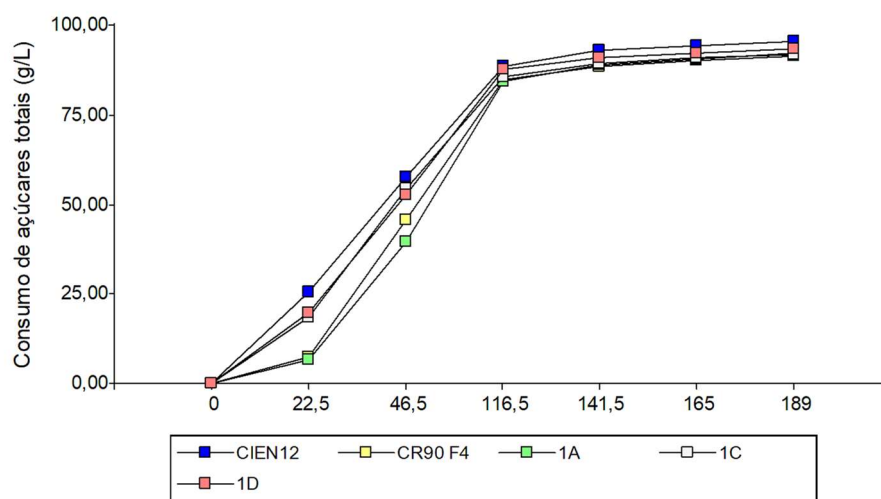


Figura 63 – Acompanhamento do consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C em intervalos de 24 horas. CIEN12: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN12xCR90F4 (1A), CIEN12xCR90F4 (1C) e CIEN12xCR90F4 (1D).

Não houve diferença estatística entre os valores de consumo de açúcares totais entre as linhagens parentais e os híbridos correspondentes. A linhagem que mais consumiu os açúcares do mosto foi a linhagem parental *S. cerevisiae* com uma média de consumo de 95,42 g / l (figura 64). A linhagem que menos consumiu foi a linhagem parental *S. kudriavzevii* com uma média de consumo de 91,33 g / l.

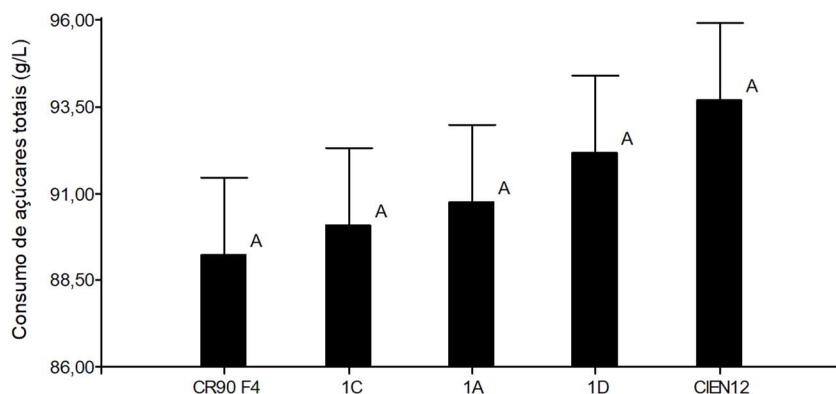


Figura 64 – Consumo de açúcares totais do mosto sintético de vinho (g / l) por meio da fermentação na temperatura de 25 °C. CIEN12: linhagem parental de *S. cerevisiae*; CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN12xCR90F4 (1A), CIEN12xCR90F4 (1C) e CIEN12xCR90F4 (1D). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A linhagem parental CIEN12 iniciou o processo de fermentação do mosto sintético de vinho em 3 horas e 50 minutos. Esse tempo não foi estatisticamente diferente das linhagens híbridas CIEN12TxCR90F4(1D) e CIEN12TxCR90F4(1C) que apresentaram uma média de tempo de 4 e 5 horas, respectivamente. A linhagem parental CR90F4 apresentou o maior período de latência (8 horas), tempo esse estatisticamente diferente do tempo de todas as outras linhagens do estudo (figura 65).

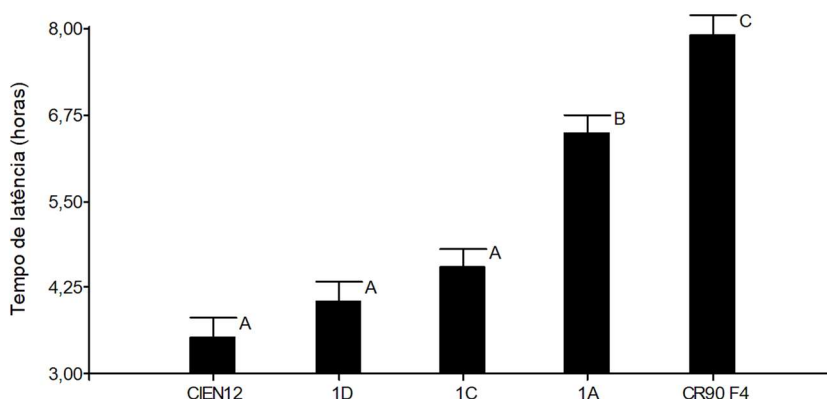


Figura 65 – Tempo necessário para iniciar a fermentação em mosto sintético de vinho utilizando as linhagens na temperatura de 25 °C. CIEN12: linhagem parental de *S. cerevisiae*, CR90F4: linhagem parental de *S. kudriavzevii* e os híbridos: CIEN12xCR90F4 (1A), CIEN12xCR90F4 (1C) e CIEN12xCR90F4 (1D). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

9.3.4. Determinação açúcares e álcoois dos híbridos obtidos para a produção de vinho

CIEN5AxCR90F4

O residual de açúcares e produção de eritritol, glicerol, butanol, ácido acético e etanol estão dispostos na tabela 25 e na figura 66. Ao analisar a concentração de glicose e frutose disponível no mosto após a fermentação, é visto que ocorreu uma boa fermentação e consumo dos açúcares, sendo que a maior concentração dos açúcares foi visto para a linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), que deixou um residual de $0,27 \pm 0,03$ g/l de glicose e $8,77 \pm 0,45$ g/l de frutose. Esses valores foram estatisticamente diferentes quando comparado à fermentação das outras linhagens estudadas. Essa capacidade de deixar um elevado residual de açúcares em comparação com as demais linhagens foi visto também na fermentação do mosto de cachaça pela linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4).

Tabela 25 – Residual de açúcares e produção de eritritol, glicerol, butanol, ácido acético (g / l) e etanol (%) no final da fermentação do mosto vínico após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (CIEN5) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CIEN5AxCR90F4(1A-1), CIEN5AxCR90F4(1D), CIEN5AxCR90F4(3C) e CIEN5AxCR90F4(7A).

Levedura	Açúcares residuais após fermentação (g/l)		Compostos produzidos a partir da fermentação (g/l)				Ácido acético
	Glicose	Frutose	Eritritol	Glicerol	Butanol	Etanol (%)	
1A-1	$0,02 \pm 0,01$ (a)	$1,88 \pm 0,17$ (b)	$0,39 \pm 0,01$ (d)	$5,67 \pm 0,02$ (b)	$0,43 \pm 0,01$ (b)	$12,16 \pm 0,02$ (b,c)	0 ± 0 (a)
1D	$0,09 \pm 0,08$ (b)	$3,1 \pm 1,76$ (b)	$0,35 \pm 0,02$ (c)	$4,85 \pm 0,15$ (a)	$0,42 \pm 0,02$ (b)	$12,12 \pm 0,36$ (b,c)	0 ± 0 (a)
3C	$0,06 \pm 0,01$ (a,b)	$2,43 \pm 0,31$ (b)	$0,26 \pm 0,01$ (a)	$5,66 \pm 0,02$ (b)	$0,35 \pm 0,01$ (a)	$11,99 \pm 0,06$ (b)	0 ± 0 (a)
7A	0 ± 0 (a)	$0,38 \pm 0,3$ (a)	$0,35 \pm 0,01$ (c)	$6,56 \pm 0,11$ (d)	$0,53 \pm 0,01$ (c)	$12,23 \pm 0,09$ (b,c)	0 ± 0 (a)
CIEN5	0 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	$0,3 \pm 0,0041$ (b)	$6,12 \pm 0,19$ (c)	$0,33 \pm 0,01$ (a)	$12,38 \pm 0,19$ (c)	0 ± 0 (a)
CR90F4	$0,27 \pm 0,03$ (c)	$8,77 \pm 0,45$ (c)	$0,28 \pm 0,01$ (a,b)	$7,97 \pm 0,11$ (e)	$1,52 \pm 0,05$ (d)	$11,4 \pm 0,05$ (a)	0 ± 0 (a)

Em relação à produção dos compostos aromáticos, o híbrido CIEN5AxCR90F4(1A-1) foi o que mais produziu eritritol, $0,39$ g/l. Esse valor foi estatisticamente diferente aos valores apresentados pelos híbridos e as linhagens parentais. A linhagem que mais produziu glicerol foi a parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), $7,97 \pm 0,11$ g /l. Esse valor foi estatisticamente diferente dos valores das demais linhagens estudados. Já o híbrido CIEN5AxCR90F4(1D) foi

o que menos produziu o composto, $4,85 \pm 0,15$ g/l. Esse valor também foi significativamente diferente de todos os outros híbridos e linhagens parentais. O butanol teve uma maior produção na fermentação da parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), $1,52 \pm 0,05$ g / l e uma menor produção quando utilizada a parental *S. cerevisiae* (CIEN5) e o híbrido CIEN5AxCR90F4(3C), sendo essa produção de $0,33 \pm 0,01$ e $0,35 \pm 0,01$ g/l, respectivamente. Quando avaliada a produção do etanol, as linhagens parentais produziram valores extremos, sendo que a parental *S. cerevisiae* (CIEN5) produziu a maior quantidade, $12,38 \pm 0,19$ % e a parental *S. kudriavzevii* (CR90F4), $11,4 \pm 0,05$ %. O híbrido CIEN5AxCR90F4(3C) foi o único que se apresentou diferença estatística em comparação com a parental *S. cerevisiae* (CIEN5) para a produção de etanol.

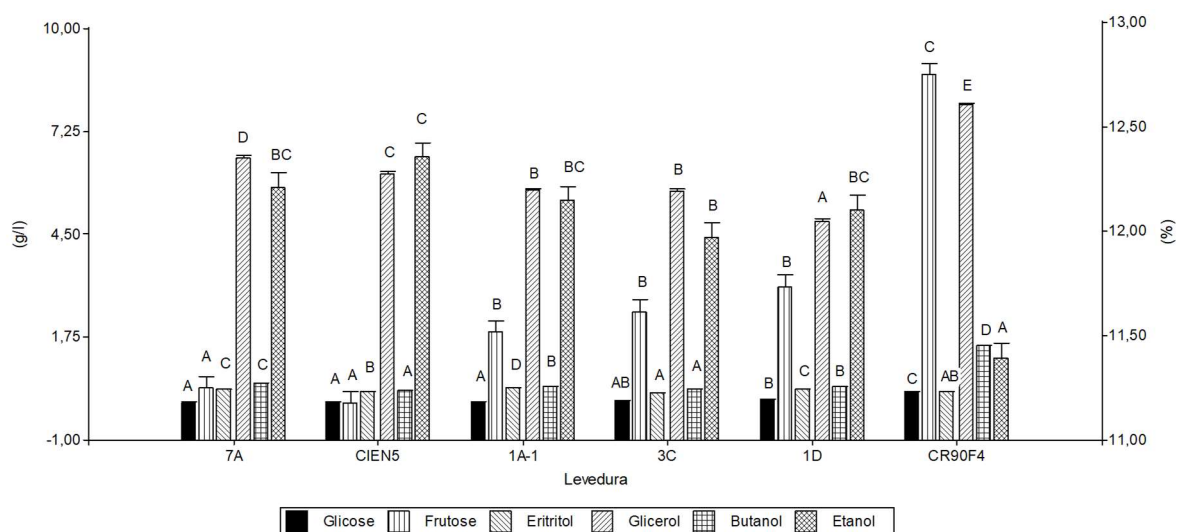


Figura 66 - Análise do consumo de açúcares e produção de eritritol, glicerol, butanol, ácido acético (g / l) e etanol (%) no final da fermentação do mosto vínico após a fermentação utilizando as linhagens parentais *S. cerevisiae* (CIEN5) e *S. kudriavzevii* (CR90F4) e as linhagens híbridas CIEN5AxCR90F4(1A-1), CIEN5AxCR90F4(1D), CIEN5AxCR90F4(3C) e CIEN5AxCR90F4(7A). Valores com uma letra em comum indica que não são significativamente diferentes, quando as letras se divergem é mostrado que houve diferença estatística ($p > 0,05$).

10. DISCUSSÃO

10.1. Mutantes auxotróficos e caracterização dos híbridos

O processo de hibridação feito de acordo Pérez-Través e colaboradores (2012) facilita a obtenção de mutantes auxotróficos e é considerado um processo hibridação simples. A técnica consiste na hibridação espontânea (*rare-mating*), e os híbridos obtidos possuem um conjunto completo de cromossomos de ambas as linhagens parentais, sendo estas linhagens não consideradas como OGM. A hibridação espontânea também é uma boa solução para o processo de hibridação entre linhagens de leveduras que não são capazes de esporular. Apesar da divergência de sequência de até 20% entre as espécies dentro do gênero *Saccharomyces*, existem numerosos exemplos de hibridização interespecífica (KELLIS et al., 2003). As barreiras pré-zigóticas são fracas e as espécies podem cruzar com sucesso (GREIG, 2009). Devido essas características, o presente trabalho foi capaz de obter híbridos entre as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*.

Através da técnica de obtenção de mutantes auxotróficos foi possível obter nove linhagens auxotróficas, sendo elas, *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223 (*trp-* e *lis-*), CAY337 (*trp-*), UFMG-CM-Y030 (*lis-*), CAY1031 (*lis-*), CIEN5A (*lis-*), CIEN12T (*lis-*) e *S. kudriavzevii* CA111E2 (*lis-*) e CR90F4 (*trp-*). Após a obtenção de linhagens auxotróficas, foram obtido os seguintes híbridos interespecíficos: para a produção de cerveja, o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2; para a produção de cerveja e cachaça, o híbrido UFMG-CM-Y030xCR90F4; para a produção somente de cachaça CAY1031xCR90F4; e para a produção de vinho, os híbridos CIEN5AxCR90F4 e CIEN12TxCR90F4. Esses híbridos foram capazes de produzir esporos viáveis, que são aqueles capazes de multiplicar. A partir das células destes híbridos, foi possível fazer a caracterização fenotípica e genotípica, diferenciando das linhagens parentais.

A caracterização molecular dos híbridos obtidos no presente estudo mostrou que as linhagens originadas a partir do crescimento dos esporos apresentaram diferentes padrões de bandeamento quando utilizado os iniciadores dos genes codificadores de proteínas GSY₁, KEL e MAG₂. Esse resultado foi diferente do obtido por Pérez-Través e colaboradores (2012), em que todos os esporos analisados pelo perfil de bandeamento das regiões cromossômicas de microssatélites apresentaram o mesmo padrão das duas linhagens parentais (*S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*). Essa diferença nas regiões de microssatélite tornou possível o agrupamento e seleção de um representante de cada grupo para a confirmação de estabilidade genética de cada híbrido. Dois dos três híbridos de UFMG-CM-Y030xCR90F4 não produziram esporos. Esse

mesmo resultado foi encontrado no estudo de Gargía-Ríos e colaboradores (2019), onde foi realizado o mesmo processo de hibridação descrito neste trabalho. Os híbridos resultantes do cruzamento interespecífico são tipicamente inférteis, porém são viáveis e podem se reproduzir assexuadamente por brotamento (LITI; BARTON; LOUIS, 2006). Diante da ausência de esporulação desses híbridos não foi possível fazer a caracterização e confirmação de estabilidade genética utilizando as técnicas propostas no trabalho. A hibridação entre espécies, principalmente utilizando o método de hibridação por meio de protoplasto e hibridação espontânea, geralmente leva a descendência de linhagens inviáveis ou inférteis (KROGERUS et al., 2017; GALLONE et al., 2019) e esse pode ser um dos motivos pelo qual foram originados híbridos inviáveis no presente estudo.

Após sucessivos ciclos de fermentação em mosto sintético, foi feita a confirmação da estabilidade genética do híbrido por meio da PCR RAPD-R3 e elementos- δ . Após a fermentação em mosto, observou-se que quando realizada a técnica de PCR RAPD-R3 os híbridos apresentaram maior variabilidade do perfil de bandeamento entre as colônias quando comparado ao perfil de bandeamento das mesmas linhagens utilizando o iniciador do elementos- δ . Diante deste resultado, optou-se por realizar inicialmente a PCR RAPD-R3 e somente aquelas linhagens que tiveram a natureza híbrida confirmada a partir desse iniciador foram submetidos à PCR elementos- δ . Esse resultado foi oposto ao encontrado por Pérez-Través e colaboradores (2014), onde os isolados apresentaram maior diferença no perfil de bandeamento quando comparados por meio do iniciador elementos – δ . Os híbridos obtidos no trabalho de Pérez-Través e colaboradores (2014) e os híbridos do presente estudo foram obtidos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*. Esses resultados mostraram a importância em utilizar mais de um iniciador para confirmação de estabilidade dos híbridos após a fermentação em mosto sintético, sendo RAPD-R3 e elementos- δ aqueles que apresentaram melhor diferenciação dos fragmentos dos perfis de bandeamento dos híbridos (PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012)

10.2. Consumo dos açúcares pelas linhagens híbridas em comparação com as linhagens parentais

Quando avaliado o consumo de açúcares dos híbridos cervejeiros UFMG-CM-Y223xCA11E2 e UFMG-CMY030xCR90F4 na temperatura de 10 °C, nota-se que nenhum deles apresentou habilidade fermentativa melhor que as duas linhagens parentais de *S. kudriavzevii* (CA11E2 e CR90F4). Entretanto, alguns dos híbridos apresentaram características melhoradas em relação às parentais *S. cerevisiae* (UFMG-CM-Y223 e UFMG-CMY030) que

são leveduras que fermentam melhor na temperatura de 20 °C. Quando analisado a fermentação do mosto cervejeiro na temperatura de 20 °C observou-se que os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CM-Y030XCR90F4(16C) foram capazes de consumir maiores concentrações dos açúcares em relação as linhagens parentais. Os resultados para o consumo de açúcares dos híbridos cervejeiros foram semelhantes para aqueles encontrados para os híbridos interespecíficos de *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (MERTENS et al., 2015; KROGERUS et al., 2015) e os híbridos intraespecíficos de *S. cerevisiae* (FIGUEIREDO et al., 2017), onde os híbridos apresentaram vigor híbrido em relação ao processo fermentativo. Híbridos naturais entre as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* já foram encontrados em cervejas trapistas Chimay, Orval e Westmalle da Bélgica (GONZÁLEZ; BARRIO; QUEROL, 2008).

As análises de cromatografia líquida foram feitas nos mostos fermentados utilizando os híbridos entre as linhagens UFMG-CM-Y223 e CA111E2. A análise dos resultados mostra que as linhagens parentais não são capazes de fermentar a maltotriose. Entretanto, os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) foram capazes de fermentar esse açúcar que é abundante no mosto cervejeiro. No presente trabalho, nenhuma das linhagens parentais foi capaz de fermentar a maltotriose, entretanto os híbridos originários dessas linhagens foram capazes de consumir/fermentar esse açúcar, sendo esse resultado um dado inédito na literatura. O aumento da atividade de transporte de α -glucosídeo pode ser uma possível explicação para a capacidade dos híbridos de fermentar a maltotriose (ALVES; THEVELEIN; STAMBUK, 2014).

A utilização de maltose e maltotriose por levedura requer inicialmente seu transporte ativo através da membrana plasmática. No citoplasma, esses açúcares são hidrolisados por α -glucosidases (maltases), liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas por glicólise em etanol (ALVES; THEVELEIN; STAMBUK, 2014). O *MAL31* é o gene transportador de maltose e o gene *MTY1/MTT1* faz o transporte tanto da maltose quanto da maltotriose (CATALLO et al., 2021). Os genes *MTY1/MTT1* podem ter sido a chave para a ativação do transporte e consumo da maltotriose pelas linhagens híbridas.

Ao contrário das linhagens cervejeiras que foram testadas em duas temperaturas, as linhagens para a produção da cachaça foram testadas somente na temperatura de 28 °C. Os resultados mostraram que os híbridos CAY1031xCR90F4 e UFMG-CMY030xCR90F4, obtidos para a produção da cachaça, não se diferenciaram das linhagens parentais de *S. cerevisiae* (CAY1031 e UFMG-CMY030) em relação ao consumo dos açúcares totais do mosto

de cana-de-açúcar. Entretanto, todos os híbridos foram diferentes em relação a este parâmetro quando comparados com a linhagem parental de *S. kudriavzevii* (CR90F4). Não há relatos na literatura de isolamento de híbridos naturais de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* na produção da cachaça e não se sabe os possíveis benefícios que esse híbrido pode trazer para a bebida. Atualmente, não existem trabalhos com o objetivo de desenvolver híbridos para a produção de cachaça, sendo este, o primeiro trabalho com esse foco. Os híbridos obtidos por meio do cruzamento espontâneo entre as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* apresentaram características fermentativas em mosto sintético de cachaça na temperatura de 28 °C semelhante às características apresentadas pela linhagem parental de *S. cerevisiae*. Este resultado é importante devido ao fato de *S. kudriavzevii* ser um criotolerante (SAMPAIO, 2018) podendo não apresentar bons resultados fermentativos na temperatura de 28 °C.

A análise em cromatografia líquida do consumo dos açúcares do mosto de cachaça pelos híbridos e seus parentais mostrou que a linhagem parental de *S. kudriavzevii* (CR90F4) utilizada para a produção dos dois híbridos (CAY1031xCR90F4 e UFMG-CMY030xCR90F4) apresentou um residual de sacarose, glicose e frutose superior em comparação a todos os híbridos do presente estudo. As linhagens híbridas vínicas apresentaram um perfil de consumo de açúcares semelhante ao encontrado para os híbridos de cachaça. Essas características podem estar relacionadas ao fato do parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) ser o mesmo para as duas linhagens híbridas, CIEN5AxCR90F4 e CIEN12xCR90F4. Os valores do consumo dos açúcares não foram diferentes para as linhagens híbridas e as respectivas linhagens parentais de *S. cerevisiae* (CIEN5A e CIEN12). Entretanto, *S. kudriavzevii* (CR90F4) consumiu menores quantidades de açúcares em comparação aos híbridos CIEN5AxCR90F4.

O processo de hibridação para a obtenção de linhagens vínicas é bastante comum e trabalhos anteriores mostraram a hibridação interespecífica entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (SATO et al., 2002), *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* (PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012; PÉREZ-TRAVÉS et al., 2014), *S. uvarum* (DUNN et al., 2013) e *S. mikatae* (BELLON et al., 2013). Pérez-Través e colaboradores (2014) e García-Ríos (2019) também mostraram a hibridação intraespecífica para *S. cerevisiae*. Nos estudos listados anteriormente foi possível a obtenção de híbridos com habilidades fermentativas melhores para a produção de vinho, entretanto, no presente estudo os híbridos obtidos não apresentaram valores de consumo dos açúcares significativamente diferentes das linhagens parentais.

10.3. Compostos produzidos pelos híbridos em comparação com as linhagens parentais

Em relação a produção de glicerol e ácido acético pelo híbridos cervejeiros, não houve diferença estatística para a produção desses compostos. Entretanto, os híbridos CAY1031xCR90F4(C8), CAY1031xCR90F4(D9) e todos os híbridos UFMG-CMY030XCR90F4 destinados à produção de cachaça produziram maiores quantidades de glicerol, composto que dá corpo para as bebidas alcoólicas fermentadas. A linhagem parental *S. kudriavzevii* (CR90F4) foi a que mais produziu o eritritol nas fermentações em mosto de cachaça. A produção de eritritol não é uma característica das linhagens de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* e por isso não foi observada uma boa produção na fermentação dos híbridos CAY1031XCR90F4 e UFMG-CMY030XCR90F4 (CARLY; FICKERS, 2018).

Os híbridos UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) produziram uma concentração alcoólica superior as linhagens parentais, e isto pode estar relacionada a capacidade que essas linhagens apresentaram de fermentar a maltotriose. A habilidade dos híbridos em produzir maiores quantidades de etanol também foi verificado na produção de cervejas *lagers* quando utilizaram híbridos entre as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* (KROGERUS et al., 2017). Winans e colaboradores (2020) também relataram o aumento do rendimento de etanol em híbridos interespecíficos utilizando as linhagens de *Saccharomyces arboricola* e *S. cerevisiae*, os valores da concentração de etanol para esses híbridos foram maiores aos encontrados para as linhagens parentais na produção de saquê. Nenhum dos híbridos obtidos para a produção da cachaça foi capaz de produzir valores de etanol superiores aos encontrados para as linhagens parentais de *S. cerevisiae* CAY1031 e UFMG-CMY030. Entretanto os valores foram superiores ao encontrado para a linhagem parental de *S. kudriavzevii* (CR90F4).

Em relação ao butanol, somente o híbrido CAY1031XCR90F4 (F5) produziu concentrações inferiores às linhagens parentais. Entretanto, todos os outros híbridos obtidos para a produção de cachaça apresentaram concentrações de butanol superiores ao encontrado para as linhagens parentais. O butanol é um contaminante da cachaça e, conseqüentemente, não deve ser encontrado na fermentação ou no máximo deve ser produzido em pequenas quantidades. A instrução Normativa Nº 13 permite o valor máximo do butanol de 3,0 mg / 100 mL⁻¹ de álcool anidro (RODRIGUES et al., 2019). O principal fator para formação de 1-butanol em cachaças é a contaminação por bactérias acetobutílicas durante o processo de fermentação. Esta

contaminação pode ser reduzida não deixando a cana-de-açúcar próxima a estábulos e locais de ordenha (MAIA et al., 2009). Como o mosto de cana-de-açúcar utilizado nos testes foi sintético, pode-se relacionar a produção desse composto com as leveduras utilizadas, entretanto, outros ensaios devem ser feito para a confirmação desse dado.

10.4. Análise dos compostos aromáticos produzidos pelos híbridos em relação com as linhagens parentais

A análise dos compostos aromáticos produzidos pelos os híbridos de cerveja mostrou que UFMG-CM-Y223xCA111E2(4), UFMG-CM-Y223xCA111E2(6) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) apresentaram compostos aromáticos similares e foram os únicos a produzir o acetato de isobutila e o acetato de isoamila. O acetato de isobutila e o acetato de isoamila são ésteres muito apreciados em vários estilos de cerveja. O acetado de isobutila remete ao aroma frutado e o acetado de isoamila ao aroma de banana (IORIZZO et al., 2021). O híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) apresentou um perfil sensorial similar ao produzido pela parental *S. kudriavzevii* mesmo sendo capaz de consumir maiores quantidades de açúcares do mosto cervejeiro (fermentou a maltotriose). Este híbrido apresentou perfil de bandeamento na análise do DNA mitocondrial similar a linhagem parental de *S. cerevisiae*. Sendo assim, pode-se inferir que essa linhagem híbrida apresentou um bom perfil fermentativo semelhante ao visto em *S. cerevisiae* e o perfil de compostos aromáticos similar ao da *S. kudriavzevii*.

A similaridade no perfil de compostos aromáticos entre o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) e a parental CA111E2 foi devida à produção dos seguintes compostos: éster - acetato de etila; álcoois superiores: isobutanol, álcool isoamílico e 2-fenil-etanol. Esses compostos são encontrados no vinho e a produção de uma cerveja utilizando o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), pode proporcionar uma bebida aromática e com características vínicas. Dos oito genes ligados à produção de álcoois superiores (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *BAT1*, *BAT2*, *SFA1*), somente 2 (*ADH3* e *ADH4*) estão relacionados à mitocôndria. Os demais estão relacionados ao citoplasma e núcleo (IORIZZO et al., 2021). Com isso, pode-se observar que mesmo o híbrido apresentando perfis de fragmentos de DNA mitocondrial similar ao da parental *S. cerevisiae* UFMG-CM-Y223, a produção dos compostos pode estar relacionado as outras estruturas celulares que se assemelham a de *S. kudriavzevii* (citoplasma e núcleo).

Os híbridos obtidos para a produção de cachaça, CAY1031xCR90F4(D9) e CAY1031xCR90F4(F5) apresentaram um perfil aromático similar, e diferente das linhagens

parentais de *S. cerevisiae* (CAY1031) e *S. kudriavzevii* (CR90F4). Esses híbridos foram capazes de produzir maior quantidade de éster (acetato de etila) e álcoois superiores (isobutanol, álcool isoamílico, 1-hexanol e 2-feniletílico). Apesar dos híbridos não apresentarem vigor híbrido na fermentação, estes foram capazes de produzir maiores quantidades de compostos aromáticos e com isso, podendo originar uma bebida mais aromática. A elevada produção de compostos aromáticos também pôde ser confirmada nos híbridos UFMG-CMY030XCR90F4(3B), UFMG-CMY030XCR90F4(7) e UFMG-CMY030XCR90F4(16C) que apresentaram diferenças na produção destes compostos em comparação com as linhagens parentais.

11. CONCLUSÕES

A hibridação através do processo de cruzamento espontâneo utilizando mutantes auxotróficos mostrou ser um processo de simples execução e que origina linhagens híbridas com características fermentativas distintas. Estes híbridos não são classificados como organismos geneticamente modificados.

A hibridação por meio do cruzamento espontâneo originou nove linhagens com características cervejeiras, oito com características para produção de cachaça e sete para a produção vínica. Todos esses híbridos foram estáveis com capacidade de se manterem em sua forma híbrida mesmo após sucessivas fermentações.

Os híbridos mantiveram ou melhoraram a capacidade fermentativa em relação as linhagens parentais. A melhora fermentativa pode ser destacada para os híbridos cervejeiros UFMG-CM-Y223xCA111E2(1), UFMG-CM-Y223xCA111E2(4) e UFMG-CM-Y223xCA111E2(13) que apresentaram a habilidade em consumir a maltotriose. Essa habilidade não foi vista para as linhagens parentais.

Os híbridos foram capazes de herdar as características das duas linhagens parentais. Um exemplo foi o híbrido UFMG-CM-Y223xCA111E2(1) utilizado para a produção de cerveja que apresentou perfil fermentativo semelhante ao visto em *S. cerevisie* e perfil de compostos aromáticos similar ao de *S. kudriavzevii*.

Em relação aos compostos aromáticos, o cruzamento espontâneo foi capaz de originar linhagens híbridas com produção de compostos aromáticos maior ou menor em relação as linhagens parentais. Com isso, a seleção das linhagens pode ser realizada de acordo com as características de interesse para o produto final.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, n. 5–6, p. 227–239, 1997.
- ALANÓN, M. E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; MARINA, M. L. Wine science in the metabolomics era. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1–20, 2015.
- ALPERSTEIN, L. et al. Yeast bioprospecting versus synthetic biology—which is better for innovative beverage fermentation? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1939–1953, 2020.
- ALVES, S. L.; THEVELEIN, J. M.; STAMBUK, B. U. Expression of *Saccharomyces cerevisiae* a-glucoside transporters under different growth conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ANDRADE, M. R. DE et al. Fermented milk beverage: formulation and process. **Ciência Rural**, v. 49, n. 3, 2019.
- ARAÚJO, T. M. et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 10, p. 1749–1766, 2018.
- BAKER, E. C. et al. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 11, p. 2818–2831, 2015.
- BALADA, S. Biosynthese und -analytik. 2015.
- BARBOSA, R. et al. Evidence of natural hybridization in Brazilian wild lineages of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 2, p. 317–329, 2016.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60–70, 2008.
- BATISTOTE, M.; HELENA DA CRUZ, S.; ERNANDES, J. R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts influenced by the complexity of nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 84–91, 2006.
- BELLOCH, C. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1–2, p. 188–195, 2008.
- BELLON, J. R. et al. Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- BING, J. et al. Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R380–R381, 2014.
- BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157–172, 2013.
- BRASIL, M. DA A. P. E A. **A Cachaça no Brasil: Dados de registro de cachaças e aguardentes**. [s.l.: s.n.].
- BRIGGS, D.E. et al. (2004) Brewing science and practice. **Woodhead Publishing Limited**, Abington Hall, Abington, 2004
- CARLY, F.; FICKERS, P. Erythritol production by yeasts: a snapshot of current knowledge. **Yeast**, v. 35, n. 7, p. 455–463, 2018.
- CATALLO, M. et al. Hybridization of *Saccharomyces cerevisiae* sourdough strains with cryotolerant *Saccharomyces bayanus* nbr1948 as a strategy to increase diversity of strains available for lager beer

fermentation. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 1–21, 2021.

CAVALIERI, D. et al. Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. SUPPL. 1, p. 226–232, 2003.

CEBOLLERO, E. et al. Transgenic wine yeast technology comes of age: Is it time for transgenic wine? **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 2, p. 191–200, 2007.

CHIVA-BLANCH, G. et al. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: Evidences from human studies. **Alcohol and Alcoholism**, v. 48, n. 3, p. 270–277, 2013.

CODÓN, A. C.; BENÍTEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 154–163, 1998.

CORTE, L. et al. Use of RAPD and killer toxin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* strain typing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 609–617, 2005.

DANIEL, R. . Alambiques e pequena produção no interior paulista: informalidade como identidade e preservação do modo de vida dos produtores frente às demandas do mercado. **Revista Espaço de Diálogo e Desconexão, Araraquara**, v. 8, n. 1, 2014.

DAVENPORT, R. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. **Vitis**, v. 130, p. 123–130, 1974.

DE KEUKELEIRE, D. FUNDAMENTALS OF BEER AND HOP CHEMISTRY. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108–112, 2000.

DE ROOS, J.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Wort substrate consumption and metabolite production during lambic beer fermentation and maturation explain the successive growth of specific bacterial and yeast species. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–20, 2018.

DEQUIN, S.; CASAREGOLA, S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 8–9, p. 687–693, 2011.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, n. August, p. 700–707, 2002.

DU TOIT, P. J.; OLIVIER, S. P.; VAN BILJON, P. L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1071–1078, 1984.

DUNN, B. et al. Recurrent Rearrangement during Adaptive Evolution in an Interspecific Yeast Hybrid Suggests a Model for Rapid Introgression. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, 2013.

DUNN, B.; SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **Genome Research**, v. 18, n. 10, p. 1610–1623, 2008.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, P.-R. **Cachaça de Alambique**. [s.l: s.n.].

FARIA-OLIVEIRA, F. et al. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. **Food Production and Industry**, 2015.

FERNANDEZ-ESPINAR, T. T.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Yeast**, v. 20, n. 14, p. 1213–1226, 2003.

FERREIRA, V. et al. Identification of *Vitis vinifera* L. grape berry skin color mutants and polyphenolic profile. **Food Chemistry**, v. 194, p. 117–127, 2016.

FIGUEIREDO, B. I. C. et al. New lager brewery strains obtained by crossing techniques using

- cachaça (Brazilian spirit) yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 20, 2017.
- FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 979–995, 2008.
- GAGGIA, F. et al. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. SUPPL. 1, p. S58–S66, 2011.
- GALLONE, B. et al. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397–1410.e16, 2016.
- GALLONE, B. et al. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 148–155, 2018.
- GALLONE, B. et al. Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 11, p. 1562–1575, 2019.
- GARCÍA-RÍOS, E. et al. Improving the cryotolerance of wine yeast by interspecific hybridization in the genus *Saccharomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–12, 2019.
- GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. **Notes and Records of the Royal Society**, v. 58, n. 2, p. 187–201, 2004.
- GIANNAKOU, K. et al. Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103838, 2021.
- GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: Genomic insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 17–27, 2015.
- GIBSON, B. R. et al. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. **Yeast**, v. 30, n. 7, p. 255–266, 2013.
- GIUDICI, P. et al. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 622–628, 2005.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- *cerevisiae* has been completely sequenced *SchizoSaccharomyces pombe* indicate. **Science**, v. 274, n. October, p. 546–567, 1996.
- GONZÁLEZ, S. S. et al. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 11–18, 2007.
- GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2314–2320, 2008.
- GREIG, D. Reproductive isolation in *Saccharomyces*. **Heredity**, v. 102, n. 1, p. 39–44, 2009.
- GUERRA, J. B. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106–111, 2001.
- GUIMARÃES, P. M. R.; VIRTANEN, H.; LONDESBOROUGH, J. Direct evidence that maltose transport activity is affected by the lipid composition of brewer's yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 3, p. 203–209, 2006.
- HAN, D. Y. et al. Adaptive Gene Content and Allele Distribution Variations in the Wild and Domesticated Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. February, p. 1–14, 2021.

- HOLT, S. et al. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.
- IATTICI, F.; CATALLO, M.; SOLIERI, L. Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020.
- IORIZZO, M. et al. Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. **Processes**, v. 9, n. 5, p. 1–16, 2021.
- IVANOVA-PETROPULOS, V. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 1–14, 2015.
- IVANOVA, V. et al. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2851–2860, 2011.
- KANEDA, H. et al. Effect of pitching yeast and wort preparation on flavor stability of beer. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 6, p. 456–460, 1992.
- KEERSMAECKER, J. DE. The Mystery of Lambic Beer. **Scientific American**, v. 275, n. 2, p. 74–80, 1996.
- KELLIS, M. et al. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 241–254, 2003.
- KROGERUS, K. et al. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 769–778, 2015a.
- KROGERUS, K. et al. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 769–778, 2015b.
- KROGERUS, K. et al. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 65–78, 2017.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeast a taxonomic study**. 5^a ed. [s.l: s.n.].
- LAIRÓN-PERIS, M. et al. Differential Contribution of the Parental Genomes to a *S. cerevisiae* × *S. uvarum* Hybrid, Inferred by Phenomic, Genomic, and Transcriptomic Analyses, at Different Industrial Stress Conditions. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. March, p. 129, 2020.
- LEEUEWEN, C. VAN et al. Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. v. 55, n. 3, p. 1–8, 2010.
- LEGRAS, J. L.; KARST, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 2, p. 249–255, 2003.
- LIBKIND, D. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 35, p. 14539–14544, 2011.
- LIMA, A. D. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 247–250, 2006.
- LIMA, C. **Cachaça**.
- LIN, C. L. et al. Packing a punch: understanding how flavours are produced in lager fermentations. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 5, p. 1–14, 2021.
- LITI, G. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **eLife**, v. 4, p. 1–9, 2015.
- LITI, G.; BARTON, D. B. H.; LOUIS, E. J. Sequence diversity, reproductive isolation and species

- concepts in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 174, n. 2, p. 839–850, 2006.
- LODOLO, E. J. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.
- MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P.; Tecnologia da Cachaça de Alambique, **Editora SEBRAE/MG**; SINDBEBIDAS: Belo Horizonte, 2006.
- MARSIT, S.; DEQUIN, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, p. 1–12, 2015.
- MCCARTHY, E.; EWING-MULLIGAN, M. **Vinho para Leigos**. Edição de ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- MCGOVERN, P. E. et al. The Beginnings of Winemaking and Viniculture in the Ancient Near East and Egypt. **Expedition**, v. 39, p. 3–21, 1997.
- MCGOVERN, P. E. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 2004.
- MENESES, F. J.; HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 3, p. 310–321, 2002.
- MERTENS, S. et al. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202–8214, 2015.
- MOLINA, A. M. et al. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. **Food Chemistry**, v. 117, n. 2, p. 189–195, 2009.
- MONERAWELA, C. et al. Loss of lager specific genes and subtelomeric regions define two different *Saccharomyces cerevisiae* lineages for *Saccharomyces pastorianus* Group I and II strains. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 2, p. 1–11, 2015.
- MONTANDON, G. G. Seleção de linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cervejas de alta fermentação. 2016.
- MUTTON, M. J. R. et al. The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaca. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 51, n. 4, p. 1–8, 2020.
- NASEEB, S. et al. *Saccharomyces jurei* sp. Nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2046–2052, 2017.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MASNEUF-POMARÈDE, I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 1–7, 2010.
- NEDOVIĆ, V. et al. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. **Yeast**, n. November, p. 173–216, 2015.
- NESPOLO, R. F. et al. An Out-of-Patagonia dispersal explains most of the worldwide genetic distribution in *Saccharomyces eubayanus*. **bioRxiv**, p. 709253, 2019.
- NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of. **Society**, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.
- NGUYEN, H. V. et al. Deciphering the hybridisation history leading to the lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380 T. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- NGUYEN, H. V.; GAILLARDIN, C. Evolutionary relationships between the former species

- Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; Reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4–5, p. 471–483, 2005.
- OKA, K. et al. Decrease in hydrogen sulfide content during the final stage of beer fermentation due to involvement of yeast and not carbon dioxide gas purging. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 3, p. 253–257, 2008.
- OLANIRAN, A. O. et al. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13–23, 2017.
- PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 24–31, 2000.
- PAUL ROSS, R.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: Past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, 2002.
- PERAZOLLI, L. A. et al. A História e a Química da Cachaça. p. 14–17, 2013.
- PÉREZ-TORRADO, R.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 11, p. 1780–1790, 2018.
- PÉREZ-TRAVÉS, L. et al. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 102–111, 2012.
- PÉREZ-TRAVÉS, L. et al. Stabilization process in *Saccharomyces* intra- and interspecific hybrids in fermentative conditions. **International Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 213–224, 2014.
- PÉREZ-TRAVÉS, L.; QUEROL, A.; PÉREZ-TORRADO, R. Increased mannoprotein content in wines produced by *Saccharomyces kudriavzevii* × *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, n. August, p. 35–38, 2016.
- PERIS, D. et al. Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.
- PERIS, D. et al. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 8, p. 2031–2045, 2014.
- PIRES, E. J. et al. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 2014.
- PORTUGAL, C. B.; DA CRUZ, S. H.; ANDREOTE, F. D. Shifts in Microbial Community Structure Could Be Linked To Weather Anomalies? a Case Study on Cachaça (Sugarcane Distilled Spirit) Fermentation. **BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE - Revista de Agricultura**, v. 95, n. 1, p. 13, 2020.
- PRATI, P.; CAMARGO, G. A. Características Do Caldo De Cana E Sua Influência Na Estabilidade Da Bebida /Characteristics of Sugarcane Juice and Your Influence in the Beverage Stability. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 2, n. 1, p. 37, 2008.
- PRETORIUS-ISAK-S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16 (8), n. Figure 1, p. 675- 729., 2000.
- QUEROL, A. et al. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2948–2953, 1992.

- RODHOUSE, L.; CARBONERO, F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 462–473, 2017.
- RODRIGUES, L. M. A. et al. Uma Dose De História: Cachaça De Alambique E Aguardente De Coluna a. **Perspectivas e Diálogos: Revista de História Social e Práticas de Ensino**, v. 2, n. 2, p. 90–108, 2019.
- ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C.; SOLI, M. G. Biosynthesis of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* - II. Analysis of sulphite-producing strains. **Archives of Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 211–215, 1976.
- ROSA, C. A.; JÚNIOR, A. M. S.; FARIA, J. B. Cachaça de Alambique. In: **Bebidas Alcoólicas: Ciências e Tecnologia**. 2^a ed. São Paulo, Brasil. Edgard Blucher Ltda. 2016.
- ROSSIGNOL, T. et al. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 20, n. 16, p. 1369–1385, 2003.
- SAERENS, S. M. G. et al. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 165–177, 2010.
- SAERENS, S. M. G.; DUONG, C. T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: Current state, perspectives and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1195–1212, 2010.
- SALAMINI, F. et al. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 6, p. 429–441, 2002.
- SAMPAIO, J. P. Microbe profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 9, p. 1069–1071, 2018.
- SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with Oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2144–2152, 2008.
- SATO, M. et al. Breeding of brewer's yeast by hybridization between a top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a cryophilic yeast *Saccharomyces bayanus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 509–511, 2002.
- SICARD, D.; LEGRAS, J. L. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–236, 2011.
- SILVA, J. H. DO N. E.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. DE. Cachaça Production in Brazil and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). **Scientia Agricola**, v. 77, n. 2, 2020.
- SIMONE, N. DE et al. Autochthonous Biological Resources for the Production of Regional Craft Beers : Exploring Possible Contributions of. p. 1–16, 2021.
- SIPICZKI, M. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 996–1007, 2008.
- SNIEGOWSKI, P. D.; DOMBROWSKI, P. G.; FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 299–306, 2002.
- SORATTO, A. N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 681–687, 2007.
- SPENCER, J. F.; SPENCER, D. M. Rare-mating and cytoduction in *Saccharomyces cerevisiae*.

Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 53, p. 39–44, 1996.

SPITAEELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 1, p. 73–78, 2001.

STEENSELS, J. et al. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, p. 6965–6975, 2014.

STEENSELS, J. et al. Domestication of Industrial Microbes. **Current Biology**, v. 29, n. 10, p. R381–R393, 2019.

STRIBNY, J. et al. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 41–46, 2015.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139–173, 2005.

VAN BOEKEL, M. et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 9, p. 1215–1247, 2010.

VERBELEN, P. J. et al. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 155–167, 2009.

VERDUYN, C. et al. Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: Respiration and Alcoholic Fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 1992, p. 501–517, 1992.

WALKER, G.; STEWART, G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 5, p. 783–793, 2014.

WANG, Q. M. et al. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 22, p. 5404–5417, 2012.

WANG, S. A.; BAI, F. Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 510–514, 2008.

WENDLAND, J. Lager yeast comes of age. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 10, p. 1256–1265, 2014.

WINANS, M. J. et al. *Saccharomyces arboricola* and Its Hybrids' Propensity for Sake Production: Interspecific hybrids reveal increased fermentation abilities and a mosaic metabolic profile. **Fermentation**, v. 6, n. 1, 2020.

WITRICK, K.; PITTS, E. R.; O'KEEFE, S. F. Analysis of Lambic Beer Volatiles during Aging Using. **Beverages**, p. 1–13, 2020.

ZARETT, K. S.; SHERMAN, F. alpha-Amino adipate as a Primary Nitrogen Source for *Saccharomyces* Mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 2, p. 579–583, 1985.

ZHAO, X.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7588–7598, 2015.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.

13. ANEXOS

Anexo 1 – Fermentação da maltose na temperatura de 10 e 20 °C pelos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* isolados de cachaça.

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
W3470 - <i>S. pastorianus</i>	+	2	+	5	CAY1615	+	4		
T58 - <i>S. cerevisiae</i>	+	2	+	5	CAY1617	+	2		
CAY130	+	2			CAY1619A	+	2	+	5
CAY1667	+	2	+	9	CAY1619B	+	2	+	5
CAY1683	+	2	+	8	CAY1620	+	2	+	5
CAY1207	+	2	+	11	CAY1621	+	2	+	4
CAY967	+	3			CAY1629	+	3	+	5
CAY1202	+	2			CAY1634	+	2	+	5
CAY1706	+	2	+	9	CAY1638	+	2	+	4
CAY1712	+	2	+	11	CAY1648	+	2	+	4
CAY1713	+	2	+	4	CAY1650	+	2	+	4
CAY1714	+	2	+	6	CAY1651	+	2	+	5
CAY1779	+	3	+	6	CAY1656	+	2	+	4
CAY1780	+	3	+	10	CAY1720	+	3	+	4
CAY1781	+	2	+	12	CAY1722	+	2	+	4
CAY1782	+	3	+	12	CAY1723	+	2	+	4
CAY1786	+	3	+	11	CAY1724	+	2	+	7
CAY1789	+	3	+	10	CAY1725	+	2	+	4
CAY879	+	2	+	5	CAY1726	+	2	+	5
CAY884	+	2	+	5	CAY1729	+	2	+	6
CAY889	+	2	+	6	CAY1730	+	2	+	6
CAY890	+	2	+	6	CAY1732	+	2	+	6
CAY903	+	2	+	6	CAY1733	+	2	+	7
CAY907	+	2	+	6	CAY1734	+	2	+	6
CAY908	+	2	+	6	CAY1735	+	2	+	4
CAY1632	+	2	+	7	CAY1737	+	2	+	4
CAY1118	+	2	+	7	CAY1740	+	3	+	6
CAY1119A	+	1	+	5	CAY1741	+	7		
CAY1119B	+	2	+	10	CAY1743	+	3	+	7
CAY1120	+	2	+	9	CAY1744	+	3	+	8
CAY1121	+	3			CAY1750	+	2	+	4
CAY1122C	+	2			CAY1751	+	2	+	4
CAY1123A	+	2	+	7	CAY1752	+	2	+	4
CAY1128A	+	2			CAY1753	+	2	+	6
CAY1128B	+	1	+	5	CAY1757	+	2	+	4
CAY1129A	+	2	+	5	CAY1758	+	2	+	4
CAY1129B	+	1	+	4	CAY1759	+	2	+	7
CAY1129D	+	2	+	6	CAY1760A	+	3	+	6
CAY1131C	+	5			CAY1760B	+	2	+	4
CAY1133	+	5			CAY1761	+	2	+	7
CAY1135	+	2			CAY1762	+	2	+	4
CAY1155	+	2	+	6	CAY1763	+	2	+	4
CAY1156	+	2	+	7	CAY1764	+	2	+	3
CAY1756	+	2	+	5	CAY1766	+	2	+	4
CAY8	+	3			CAY1767	+	3		
CAY42	+	2	+	6	CAY1769	+	2	+	3
CAY55A	+	2	+	5	CAY1771	+	2	+	3
CAY55B	+	2	+	7	CAY1775	+	3	+	7
CAY71	+	2	+	12	CAY1776	+	2	+	3
CAY95A	+	2	+	5	CAY1790	+	2	+	3
CAY95B	+	2	+	5	CAY2354	+	2	+	7
CAY421	+	2	+	5	CAY2356	+	2	+	3
CAY816A	+	2	+	4	CAY2357	+	2	+	3
CAY816B	+	2	+	4	CAY2358	+	2	+	4
CAY639	+	2	+	4	CAY2359	+	2	+	4
CAY648	+	2	+	5	CAY2377	+	2	+	3

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
CAY656	+	2	+	5	CAY2378	+	2		
CAY829A	+	2	+	6	CAY2379	+	2	+	4
CAY829B	+	2	+	8	CAY170.1	+	2	+	4
CAY905(1)	+	2	+	6	CAY170.2	+	2	+	4
CAY905 (2)	+	2	+	6	CAY173	+	2	+	7
CAY940	+	2			CAY179	+	2	+	7
CAY944	+	2	+	9	CAY188	+	2	+	5
CAY951A	+	2			CAY195	+	2	+	3
CAY951B	+	2			CAY197	+	2	+	8
CAY964	+	2			CAY202.1	+	6	+	10
CAY969	+	2	+	7	CAY202.2	+	3	+	6
CAY975	+	2			CAY240	+	2	+	4
CAY976	+	2	+	4	CAY242	+	2		
CAY977	+	2	+	6	CAY244	+	2	+	4
CAY980	+	2	+	11	CAY246	+	2	+	4
CAY981	+	2	+	5	CAY248	+	2	+	4
CAY1131	+	2			CAY249	+	2	+	7
CAY1404	+	2	+	5	CAY250	+	2	+	4
CAY1410	+	2	+	5	CAY250.1	+	2	+	4
CAY1411	+	8			CAY254	+	2	+	6
CAY1412	+	12			CAY256	+	2	+	4
CAY1413	+	2	+	5	CAY257	+	2	+	4
CAY1419	+	2	+	6	CAY258	+	2	+	6
CAY1420	+	2	+	8	CAY259	+	2	+	4
CAY1422	+	9			CAY262	+	2	+	4
CAY1426	+	2	+	7	CAY264	+	2	+	4
CAY1427	+	2	+	5	CAY266	+	2	+	6
CAY1428	+	4	+	12	CAY267	+	3	+	8
CAY1429	+	2			CAY269	+	2	+	7
CAY1434	+	11			CAY283	+	2	+	5
CAY1438A	+	2	+	5	CAY285	+	2	+	3
CAY1439	+	2			CAY373	+	2	+	6
CAY1440	+	2			CAY442	+	2		
CAY1442	+	2			CAY450	+	2	+	4
CAY1444	+	2			CAY723	+	2		
CAY70	+	2	+	4	CAY724	+	2	+	7
CAY77	+	2	+	5	CAY456	+	2	+	4
CAY135	+	7			CAY729	+	2	+	6
CAY141	+	2	+	4	CAY730	+	2	+	4
CAY143	+	2	+	4	CAY732	+	2		
CAY174A	+	2	+	4	CAY733	+	3	+	4
CAY175	+	2	+	4	CAY734A	+	3	+	8
CAY187	+	11			CAY734B	+	2	+	7
CAY189	+	2	+	4	CAY736	+	3	+	8
CAY192	+	5			CAY737	+	3	+	7
CAY194	+	2	+	5	CAY982	+	3	+	8
CAY198	+	2	+	4	CAY983	+	2	+	4
CAY199	+	2	+	4	CAY985	+	3	+	7
CAY215B	+	3	+	5	CAY995	+	2	+	7
CAY237	+	2	+	3	CAY1132	+	3	+	8
CAY376	+	2	+	4	CAY107	+	2	+	11
CAY388	+	2	+	4	CAY110	+	3	+	8
CAY409	+	2	+	4	CAY120	+	2	+	5
CAY361	+	2	+	3	CAY132B	+	2	+	5
CAY647	+	2	+	4	CAY137	+	2	+	4
CAY649	+	3			CAY144	+	7		
CAY650	+	3			CAY149	+	2	+	6
CAY653	+	3	+	4	CAY151	+	2	+	5

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
CAY654	+	2	+	4	CAY337	+	2	+	5
CAY655	+	2			CAY159	+	3	+	8
CAY657	+	2	+	12	CAY239	+	5	+	12
CAY659	+	2	+	6	CAY326	+	3	+	10
CAY663	+	2	+	4	CAY338	+	2	+	5
CAY664	+	2	+	4	CAY341	+	2	+	3
CAY665	+	2			CAY346	+	2	+	5
CAY666	+	2	+	5	CAY348	+	2	+	5
CAY667	+	2	+	5	CAY350	+	3	+	5
CAY668	+	2	+	4	CAY352	+	3	+	5
CAY942	+	2	+	4	CAY355	+	2	+	9
CAY950	+	2	+	4	CAY359	+	2	+	5
CAY955	+	2	+	5	CAY369	+	2	+	5
CAY971	+	2			CAY375	+	2	+	5
CAY1003	+	2	+	5	CAY377	+	2	+	5
CAY1408	+	2	+	5	CAY378	+	2	+	4
CAY1409	+	2	+	4	CAY381	+	2	+	7
CAY1414A	+	2	+	3	CAY382	+	2	+	5
CAY1414B	+	2	+	5	CAY383	+	2	+	5
CAY1415	+	2	+	4	CAY391	+	3	+	5
CAY1424A	+	8			CAY392	+	2	+	5
CAY1433	+	2	+	4	CAY393	+	2	+	5
CAY1455	+	4			CAY394	+	2	+	5
SAL.01	+	2	+	4	CAY395	+	2	+	5
SAL.02	+	2	+	4	CAY402	+	3	+	8
SAL.03	+	2	+	4	CAY404	+	3	+	5
SAL.04	+	2	+	4	CAY405	+	2	+	5
SAL.05	+	2	+	4	CAY412A	+	2	+	4
SAL.06	+	2	+	4	CAY415	+	3	+	5
SAL.07	+	2	+	4	CAY423	+	2	+	5
SAL.08	+	2	+	4	CAY424	+	2	+	5
SAL.09	+	2	+	4	CAY414	+	3	+	8
SAL.10	+	2	+	4	CAY556A	+	2	+	4
SAL.11	+	2	+	4	CAY556B	+	2	+	4
SAL.12	+	2	+	4	CAY558	+	2	+	4
SAL.13	+	2	+	4	CAY559	+	2	+	5
SAL.16	+	2	+	5	CAY563	+	2	+	5
SAL.19	+	2	+	4	CAY566	+	2	+	5
SAL.21A	+	2	+	5	CAY569	+	2	+	4
SAL.22	+	2	+	3	CAY574	+	2	+	4
SAL.23	+	2	+	4	CAY575	+	3		
SAL.25	+	2	+	4	CAY578A	+	3		
SAL.30	+	2	+	5	CAY579	+	2	+	5
SAL.32	+	2	+	5	CAY580	+	2	+	5
SAL.56A	+	2	+	4	CAY582	+	2	+	4
SAL.56B	+	2	+	4	CAY587	+	2	+	7
SAL.56C	+	4	+	4	CAY588	+	2	+	6
SAL.61	+	4	+	6	CAY589	+	2	+	6
SAL.62	+	5	+	6	CAY592	+	2	+	5
SAL.765	+	4	+	5	CAY593	+	2	+	5
SAL.777	+	4	+	4	CAY595	+	2	+	4
CAY881	+	4	+	4	CAY596	+	2	+	5
CAY87	+	4	+	4	CAY1091A	+	3		
CAY174B	+	5	+	11	CAY1091B	+	3		
CAY504	+	4	+	4	CAY1094	+	2	+	6
CAY600	+	4	+	4	CAY1095	+	3		
CAY603	+	4	+	3	CAY1096	+	2	+	8
CAY604	+	4	+	3	CAY1097	+	3	+	9

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
CAY605	+	4	+	3	CAY1086A	+	5	+	9
CAY607	+	4	+	3	CAY1086B	+	3		
CAY608	+	4	+	3	CAY1087A	+	2	+	6
CAY615	+	5	+	8	CAY1088A	+	2		
CAY617	+	4	+	5	CAY1088B	+	2	+	11
CAY618	+	5	+	5	CAY1089	+	2		
CAY621	+	5	+	6	CAY1070	+	2	+	6
CAY622	+	4	+	3	CAY1071	+	2	+	6
CAY625	+	5	+	5	CAY1072	+	3		
CAY626	+	4	+	6	CAY1076A	+	7		
CAY759	+	3	+	4	CAY1076B	+	3		
CAY756	+	3	+	5	CAY1077	+	2	+	7
CAY760	+	3	+	5	CAY1078A	+	2	+	12
CAY763	+	4	+	5	CAY1078B	+	3	+	12
CAY766	+	6			CAY998	+	3		
CAY768	+	6			CAY1060	+	2	+	6
CAY776	+	4	+	6	CAY1062	+	2	+	5
CAY780	+	4	+	4	CAY1063	+	2	+	5
CAY781	+	5	+	6	CAY1065	+	2	+	6
CAY783	+	5	+	5	CAY1066	+	2	+	6
CAY785	+	4	+	5	CAY1068	+	2	+	5
CAY793	+	4	+	4	CAY1069	+	2	+	6
CAY875	+	4	+	4	CAY597	+	3		
CAY880	+	4	+	3	CAY689	+	4		
CAY883	+	4	+	4	CAY758B	+	3	+	7
CAY129	+	2	+	5	CAY834	+	2	+	4
CAY142	+	3	+	5	CAY836	+	3		
CAY158	+	3			CAY541A	+	2	+	5
CAY170	+	2	+	4	CAY541B	+	2	+	5
CAY386	+	2	+	5	CAY544	+	1	+	4
CAY403	+	3	+	5	CAY545	+	2	+	6
CAY590	+	2	+	3	CAY546	+	2	+	7
CAY784	+	3	+	6	CAY547	+	2	+	5
CAY838	+	3			CAY552	+	2	+	5
CAY839	+	2	+	4	CAY571	+	3		
CAY885	+	3	+	3	CAY528	+	2	+	7
CAY886	+	3	+	6	CAY530A	+	2	+	6
CAY887	+	2	+	4	CAY530B	+	3	+	8
CAY888	+	2	+	4	CAY531	+	2	+	5
CAY897B	+	2	+	5	CAY532	+	2	+	6
CAY898	+	3	+	5	CAY534	+	2	+	5
CAY902	+	4			CAY535	+	2	+	6
CAY918	+	2	+	3	CAY540A	+	2	+	5
CAY919	+	2	+	4	CAY540B	+	2	+	5
CAY920	+	2	+	3	CAY542	+	2	+	5
CAY923	+	2	+	4	CAY170A	+	3	+	9
CAY924	+	2	+	4	CAY170B	+	2	+	6
CAY926A	+	2	+	4	CAY418	+	2	+	6
CAY926B	+	2	+	4	CAY524	+	2	+	6
CAY928A	+	2	+	4	CAY527A	+	2	+	6
CAY931	+	2	+	4	CAY527B	+	2	+	9
CAY938	+	2	+	4	CAY133	+	2	+	6
CAY1448	+	9			CAY132A	+	3	+	6
CAY2007	+	3	+	12	CAY134	+	6		
CAY2008	+	3	+	5	CAY136	+	2	+	5
CAY2013	+	2	+	4	CAY138	+	2	+	6
CAY2015	+	2	+	3	CAY139	+	2		
CAY2016	+	2	+	4	CAY140	+	2	+	9

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
CAY2383	+	2	+	4	CAY145	+	2	+	6
CAY2382A	+	2	+	4	CAY146	+	2		
CAY2382B	+	2	+	4	CAY147	+	2	+	6
CAY2439A	+	2	+	5	CAY148	+	2	+	6
CAY2439B	+	2	+	4	CAY150	+	2	+	5
CAY2439C	+	2			CAY152	+	2	+	6
CAY2573	+	2	+	4	CAY153	+	2	+	5
CAY2585	+	2	+	4	CAY154	+	2	+	5
CAY2586	+	2	+	4	CAY155	+	2	+	6
SAL.20	+	2	+	7	CAY156	+	2	+	6
SAL.31	+	2	+	5	CAY157	+	2	+	5
SAL.64	+	4			CAY160	+	4		
SAL.65	+	4			CAY161	+	2	+	5
SAL.66	+	3	+	6	CAY162	+	2	+	6
SAL.67	+	3	+	6	CAY163	+	3	+	6
SAL.68	+	3	+	5	CAY164	+	2	+	9
SAL.69	+	3			CAY165	+	3		
SAL.70	+	2	+	5	CAY166	+	3		
SAL.72	+	3	+	10	CAY167	+	3		
SAL.73	+	3	+	6	CAY168	+	2	+	7
SAL.74	+	2	+	5	CAY169	+	2	+	6
SAL.75	+	3	+	5	CAY171	+	3		
CAY2464	+	2	+	6	CAY172	+	11	+	6
CAY905	+	2	+	6	CAY174	+	3		
CAY2086	+	3	+	6	CAY176	+	2		
CAY2041	+	2	+	4	CAY177	+	2	+	6
CAY2049	+	2	+	4	CAY178	+	2	+	6
CAY2040	+	2	+	5	CAY180	+	2	+	6
CAY1907	+	2	+	6	CAY181	+	3	+	5
CAY1897	+	2	+	5	CAY182	+	2	+	5
CAY2099	+	3	+	5	CAY183	+	4		
CAY2083B	+	3	+	6	CAY184	+	2	+	6
CAY2063	+	2			CAY185	+	1	+	5
CAY2061	+	2	+	5	CAY186	+	2	+	6
CAY2098	+	2	+	5	CAY190	+	2	+	6
CAY1015	+	2	+	9	CAY191	+	2	+	6
CAY2057	+	3	+	5	CAY193	+	2	+	5
CAY1163	+	2	+	4	CAY196	+	2	+	6
CAY1166	+	2	+	4	CAY200	+	2		
CAY1168.1	+	2	+	4	CAY201	+	2	+	9
CAY1168.2	+	2	+	5	CAY202	+	2		
CAY1328	+	3			CAY203	+	2	+	7
CAY1330	+	2	+	5	CAY204	+	2	+	5
CAY1336	+	2	+	6	CAY205	+	3		
CAY1561	+	2	+	4	CAY206	+	2		
CAY1562	+	2	+	5	CAY207	+	3	+	4
CAY1563B	+	2	+	5	CAY208	+	2	+	8
CAY1565A	+	2	+	5	CAY209	+	2	+	4
CAY1566	+	2	+	6	CAY210	+	2	+	6
CAY1567	+	2	+	4	CAY211	+	2	+	6
CAY1568	+	2	+	6	CAY212	+	3		
CAY1569	+	2	+	4	CAY213	+	2	+	6
CAY1573	+	2	+	4	CAY214	+	2	+	6
CAY1574	+	3	+	9	CAY215	+	2	+	5
CAY1575A	+	2	+	5	CAY216	+	2	+	7
CAY1575B	+	2	+	5	CAY217	+	1	+	5
CAY1576	+	2			CAY218	+	2	+	4
CAY1577	+	2			CAY219	+	12		

Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias	Levedura	(20°C)	Dias	(10°C)	Dias
CAY1578	+	2	+	4	CAY220	+	2	+	6
CAY1580	+	2	+	5	CAY221	+	3		
CAY1585	+	3	+	5	CAY222	+	11		
CAY1772.2	+	2	+	4	CAY223	+	10		
CAY2488	+	2	+	8	CAY224	+	5		
CAY2494	+	2	+	5	CAY225	+	4	+	8
CAY2495	+	2			CAY226	+	3	+	7
CAY2496	+	3			CAY227	+	2	+	6
CAY2497	+	3			CAY228	+	2	+	9
CAY2499A	+	2	+	6	CAY229	+	2	+	11
CAY2500	+	2	+	5	CAY230	+	2	+	8
CAY2502.2	+	2	+	6	CAY231	+	2		
CAY2503.2	+	2	+	5	CAY232	+	2		
CAY2504	+	2	+	5	CAY233	+	3		
CAY2505.1	+	2	+	6	CAY234	+	2	+	6
CAY2507	+	3	+	7	CAY235	+	2	+	6
CAY2510	+	3			CAY236	+	3	+	12
CAY2511	+	3			CAY238	+	3		
CAY2512A	+	3			CAY241	+	2		
CAY2512B	+	3	+	6	CAY243	+	2	+	6
CAY2513	+	3			CAY245	+	2	+	7
CAY2514	+	2	+	6	CAY247	+	2		
CAY2515	+	3			CAY251	+	2	+	7
CAY2516	+	2	+	5	CAY252	+	2		
CAY2517	+	2	+	5	CAY253	+	2		
CAY2518	+	2	+	9	CAY255	+	2		
CAY2520	+	2	+	5	CAY260	+	11	+	12
CAY2521	+	2	+	5	CAY261	+	4		
CAY2522	+	2	+	5	CAY263	+	2	+	6
CAY2524	+	2	+	4	CAY265	+	2	+	6
CAY2525	+	2			CAY268	+	2	+	7
CAY2526	+	2	+	6	CAY270	+	2	+	6
CAY2527	+	2	+	6	CAY271	+	2	+	7
CAY2547A	+	2	+	5	CAY272	+	2	+	5
CAY2549	+	2	+	5	CAY273	+	2	+	6
CAY2554	+	2	+	5	CAY274	+	2	+	7
CAY2558	+	2	+	5	CAY275	+	2		
CAY2563	+	3			CAY1403	+	2	+	5
CAY637	+	3	+	6	CAY847	+	2	+	6
CAY644A	+	2	+	5	CAY846	+	2	+	6
CAY644B	+	2	+	5	CAY845	+	2	+	5
CAY644C	+	2	+	5	CAY844	+	2	+	9
CAY644D	+	2	+	4	CAY842	+	2	+	6
CAY645D	+	2	+	4	CAY858	+	2	+	6
CAY646	+	2	+	4	CAY856	+	2	+	6
CAY745B	+	2	+	5	CAY855	+	2	+	5
CAY748A	+	3			CAY853	+	2	+	7
CAY752	+	2	+	4	CAY852	+	2	+	6
CAY765	+	2	+	5	CAY848	+	2	+	5
CAY774	+	2	+	4	CAY868	+	2	+	6
CAY777	+	3	+	5	CAY867	+	2	+	6
CAY874	+	2	+	6	CAY865	+	2	+	6
CAY905A	+	2	+	4	CAY863	+	2	+	5
CAY905B	+	3			CAY861	+	2	+	6
CAY925	+	2	+	4	CAY860	+	2	+	6
CAY1055	+	2	+	5	CAY2480	+	3	+	6
CAY1608A	+	2	+	9	CAY2479	+	2	+	6
CAY1611	+	3	+	7	CAY674b	+	2	+	7

Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S	
		3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias			3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
CAY178								CAY1415	1415	++	++	++	++	++	++
CAY179								CAY1419	1419	++	+++	++	++	+	++
CAY180								CAY1420	1420	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY181								CAY1426	1426	+	++	+	++	+	++
CAY182								CAY1427							
CAY184								CAY1433	1433	++	+++	++	+++	++	+++
CAY185								CAY1561							
CAY186								CAY1562							
CAY188								CAY1563B							
CAY189								CAY1566	1561	++	++	++	++	+	++
CAY190								CAY1565A							
CAY191								CAY1567							
CAY193								CAY1568							
CAY194								CAY1569							
CAY195								CAY1573							
CAY196								CAY1574	1573	-	-	+	+	-	++
CAY198								CAY1575A							
CAY197								CAY1575B							
CAY199								CAY1578	1578	++	++	++	+++	++	+++
CAY201								CAY1580							
CAY203								CAY1585	1585	++	++	-	+	-	+
CAY204								CAY1608A							
CAY208	CAY197	-	+	+	++	-	++	CAY1611							
CAY209								CAY1612							
CAY210								CAY1613							
CAY211								CAY1620	1612	-	++	-	+	-	++
CAY213								CAY1621							
CAY214								CAY1632							
CAY215								CAY1634							
CAY237								CAY1638							
CAY216								CAY1648							
CAY217								CAY1650	1648	++	++	++	++	++	++
CAY218								CAY1651							
CAY220								CAY1656	1656	+	++	+	+++	+	+++
CAY227	CAY237	-	++	-	+	-	-	CAY1667							
CAY228								CAY1683	1683	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY229								CAY1706							
CAY230								CAY1712							
CAY234								CAY1713	1713	++	+++	+	+	+	++
CAY235								CAY1714							
CAY240	CAY241	++	+++	+	+	+	++	CAY1720	1720	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY243								CAY1722	1722	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY244	CAY244	+	++	++	++	++	++	CAY1723	1723	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY245								CAY1724	1724	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY246								CAY1725	1725	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY248								CAY1726	1726	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY249	CAY246	+++	+++	+	+++	+	+++	CAY1729	1729	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY250								CAY1730	1730	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S	
		3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias			3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
CAY250.1								CAY1732	1732	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY262								CAY1733	1733	-	+	+	++	-	++
CAY251	CAY251	++	++	++	++	++	++	CAY1734							
CAY254	CAY254	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1735	1735	++	+++	++	+++	++	+++
CAY256	CAY256	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1737							
CAY257	CAY257	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1740	1740	++	+++	++	+++	++	+++
CAY258	CAY258	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1743							
CAY259	CAY259	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CAY1750							
CAY263	CAY263	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1751							
CAY264	CAY264	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1752	1750	++	++	-	++	++	++
CAY265	CAY265	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1753							
CAY266	CAY266	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1756							
CAY267	CAY267	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1757	1757	-	++	+	+	-	++
CAY268	CAY268	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1758							
CAY269	CAY269	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1759	1758	-	++	++	++	+	+++
CAY270	CAY270	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1760A							
CAY271	CAY271	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1760B							
CAY272	CAY272	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1761	1761	-	++	++	++	-	+
CAY273	CAY273	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1762							
CAY274	CAY274	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1763							
CAY283	CAY283	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1764	1764	+	++	-	+	+	++
CAY285	CAY285	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1766							
CAY326	CAY326	-	+	+	++	+	++	CAY1769	1769	+	+	-	-	-	-
CAY337	CAY337	-	++	-	++	-	-	CAY1771							
CAY338								CAY1775	1775	-	-	+	++	-	-
CAY341	341	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1776							
CAY346	346	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1779							
CAY348	348	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY1780	1780	++	++	++	++	++	++
CAY350								CAY1781							
CAY352								CAY1782							
CAY355	350	+	++	+	+	+	+++	CAY1786							
CAY359								CAY1789	1786	++	++	++	++	++	++
CAY361								CAY1790							
CAY369	369	-	-	-	+	-	-	CAY1897	1897	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY373								CAY1907	1907	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY375								CAY2007	2007	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY376								CAY2008	2008	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY377								CAY2013	2013	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY378	378	+	++	+	++	-	+	CAY2015	2015	+	++	++	++	+	++
CAY381								CAY2016	2016	-	++	++	+++	+	+++
CAY382								CAY2040	2040	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY383								CAY2041	2041	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY386	386	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2049	2049	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY388	388	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2057	2057	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY391								CAY2061	2061	++	+++	++	++	++	++
CAY392	392	++	+++	+	++	+	++	CAY2086	2086	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY393								CAY2098	2098	+	+	-	+	-	++
CAY394								CAY2099	2099	-	++	-	++	-	+

Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S	
		3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias			3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
CAY395								CAY2354	2354	+	++	-	++	-	++
CAY402								CAY2356							
CAY403								CAY2357							
CAY404								CAY2358	2356	++	++	++	++	++	++
CAY405								CAY2359							
CAY409								CAY2377	2377	-	-	-	-	+	+
CAY414								CAY2379	2379	-	-	-	-	-	-
CAY415								CAY2383	2383	++	++	++	++	++	++
CAY418								CAY2464	2464	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY421	421	+	++	+	++	+	++	CAY2479	2479	-	-	-	-	-	-
CAY423	423	+	++	+	++	+	+	CAY2480	2480						
CAY424								CAY2488	2488	+	+	+	++	+	++
CAY450	450	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2494	2494	+	++	+	++	+	+++
CAY456	456	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2500							
CAY524								CAY2502.2							
CAY528	524	+	++	+	++	+	+	CAY2503.2							
CAY527A								CAY2504	2500	+	+++	-	+++	+	+++
CAY527B								CAY2505.1							
CAY531								CAY2507							
CAY532								CAY2512B							
CAY534	531	+	+++	+	++	+	++	CAY2514	2514	+	+	+	+	+	-
CAY535								CAY2516							
CAY541A								CAY2517							
CAY541B								CAY2518	2518	++	++	++	++	++	++
CAY542								CAY2520							
CAY544								CAY2521	2520	++	+++	+	++	+	+++
CAY545								CAY2522							
CAY546	544	+	++	+	+	+	+	CAY2524	2524	+	++	-	++	+	+
CAY547								CAY2526	2526	+	+++	+	+++	+	++
CAY552								CAY2527							
CAY558								CAY2549	2549	-	+	+	+	+	++
CAY559								CAY2554	2554	-	-	-	-	-	-
CAY563								CAY2558	2558	+	+++	+	+++	-	+
CAY566								CAY2573	2573	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY569								CAY2585	2585	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY574								CAY2586	2586	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY579	566	-	+	-	+	-	-	CAY 758B	758B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY580								CAY1078A	1078B	+	++	-	-	-	++
CAY582								CAY1078B							
CAY587								CAY1086A							
CAY588								CAY1087A	1086A	-	+	+	+	-	-
CAY589								CAY1088B							
CAY590								CAY1119A	1119A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY592								CAY1119B	1119B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY593								CAY1128B							
CAY595	590	+	++	+	+	+	+++	CAY1129A	1129A	+	++	+	+	+	++
CAY596								CAY1129B							
CAY637								CAY1129D							

Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S	
		3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias			3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
CAY639								CAY132A	132A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY646								CAY132B	132B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY647								CAY1414A	1414A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY648								CAY1414B	1414B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY653								CAY1438A	1438A	++	++	++	+++	++	++
CAY654								CAY1565A	1565A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY656								CAY1619A	1619A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY657								CAY1619B	1619B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY659	653	+	++	+	++	+	++	CAY170.1	170.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY663								CAY170.2	170.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY664								CAY170A	170A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY666								CAY170B	170B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY667								CAY174A	174A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY668								CAY1772.2	1772.2	+	+++	+	+	+	+
CAY674b	674b	+	++	+	++	+	++	CAY2083B	2083B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY724								CAY215B	215B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY729	729	+	++	-	++	+	+++	CAY2382A	2382A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY730								CAY2382B	2382B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY733	733	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2439A	2439A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY736	736	++	++	+++	+++	+++	+++	CAY2439B	2439B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY737	737	++	+++	++	+++	++	+++	CAY2499A	2499A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY752	752	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CAY2547A	2547A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY756	756	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CAY412A	412A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY759	759	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CAY530A	530A	++	+++	++	+++	++	+++
CAY760								CAY530B	530B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY765								CAY540A	540A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY774	774	+	++	+	+	+	++	CAY540B	540B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY777								CAY556A	556A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY834	834	++	++	++	++	++	++	CAY556B	556B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY839	839	+	++	+	+	-	++	CAY55A	55A	-	++	-	-	-	-
CAY842								CAY55B							
CAY844								CAY644A							
CAY845								CAY644B							
CAY846	842	-	-	+	+	-	+	CAY644C	644A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY847								CAY644D							
CAY848								CAY645D							
CAY852								CAY734A	734A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY853								CAY734B							
CAY855								CAY745B	745B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY856	852	+	++	+	+	-	+	CAY786b	786b	-	+	-	+	-	++
CAY858								CAY816A							
CAY860								CAY816B	816A	-	++	-	+	-	++
CAY861	CAY861	++	++	++	++	++	++	CAY829A	829A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY863								CAY829B	829B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY865								CAY897B	897B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY867	863	-	-	-	-	-	-	CAY928A	928A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY868								CAY95A	95A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CAY874	874	-	++	+	+++	+	+++	CAY95B	95B	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Levedura	Agrupamento por dorna	Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S		Produção de H ₂ S	
		3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias			3 dias	6 dias	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
CAY879								SAL.01							
CAY884								SAL.02							
CAY885								SAL.03							
CAY886								SAL.04							
CAY887	887	++	++	++	++	++	++	SAL.05							
CAY888								SAL.06							
CAY889								SAL.07							
CAY890								SAL.08							
CAY898								SAL.09							
CAY903								SAL.10							
CAY905								SAL.11							
CAY905 (2)								SAL.12	SAL.01	+	+	+	+	+	++
CAY905(1)								SAL.13							
CAY905A	905A	-	++	+	+++	+	+++	SAL.16							
CAY907								SAL.19							
CAY908								SAL.20							
CAY1120								SAL.21A							
CAY1123A								SAL.22							
CAY918								SAL.23							
CAY919								SAL.25							
CAY920								SAL.30							
CAY923	926A	+	+	-	+	+	+	SAL.31							
CAY924								SAL.32							
CAY925								SAL.56A							
CAY926A								SAL.56B							
CAY926B								SAL.56C							
CAY931	931	-	+	-	+	+	+++	SAL.66							
CAY938								SAL.67							
CAY942	942	+	++	-	+	-	+	SAL.68	SAL.56A	+	++	+	+	+	++
CAY944								SAL.70							
CAY950	950	-	-	-	-	-	+	SAL.72							
CAY955	955	+	+++	+	++	+	+	SAL.73							
CAY969								SAL.74							
CAY976	976	+++	+++	+	++	++	+++	SAL.75							
CAY977															

* sem escurecimento (-), baixo escurecimento (+), alto (++) e muito alto (+++).