

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Microbiologia**

Marina Perbone León

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO *SACCHAROMYCES* PARA PRODUÇÃO DE
CERVEJAS ESPECIAIS**

Belo Horizonte
2020

Marina Perbone León

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO *SACCHAROMYCES* PARA PRODUÇÃO DE
CERVEJAS ESPECIAIS**

Dissertação 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 Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte
2020

043

León, Marina Perbone.

Seleção de leveduras não *Saccharomyces* para produção de cervejas especiais [manuscrito] / Marina Perbone León. - 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa.

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

1. Microbiologia. 2. Cerveja. 3. Leveduras. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Marina Perbone León
Nº REGISTRO: 2018685044

Às 14:00 horas do dia 01 de abril de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Beatriz Martins Borelli, Bruno Gonçalves Botelho e o Prof. Carlos Augusto Rosa – Orientador(a), para julgar o trabalho final "Seleção de leveduras não-*Saccharomyces* para produção de cervejas especiais", da aluna Marina Perbone León, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) 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 dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dra. Beatriz Martins Borelli

Dr. Bruno Gonçalves Botelho

Prof. Carlos Augusto Rosa [Orientador]

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e demais agências de fomento pelo financiamento deste trabalho;

À UFMG, tão longe de casa e onde fui tão bem recebida;

Ao meu orientador Prof. Carlos Rosa, pela oportunidade e aprendizados;

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que contribuíram para minha formação como microbiologista;

Ao Prof. Bruno Botelho e a todos os colegas do LAMS por me receberem em seu laboratório e compartilharem generosamente conhecimento e iFoods;

À minha mãe, pelo amor, apoio e por ser essa mulher forte em quem tento me espelhar;

Ao meu pai, pelo amor e suporte incondicional em todas as decisões que tomo;

Ao Daniel, pelo amor, amizade, companheirismo e por estar presente em todos os momentos durante a execução deste trabalho. Sem sua ajuda, os domingos e feriados no laboratório teriam sido impossíveis e muitos experimentos não teriam sido executados;

Ao Rafael, Glacilene, Letícia e Rafael, por me receberem em sua casa como da família;

À Ana Luiza e Thelma, pelos ensinamentos cervejeiros, risadas e pela amizade;

À Flávia pelas forças na sensorial, amizade e por sempre toparem um Jaeh!;

À Bia e Lu, do laboratório da cerveja, pelos ensinamentos e conselhos durante toda esta jornada;

Ao Mauro e Priscila, que me ajudaram durante a execução deste trabalho e ao Arthur, Ana Cristina e Guilla, ICs honorários da cerveja, pela ajuda muito necessária durante as análises sensoriais;

À Mayara pela companhia e amizade;

A todos os demais colegas do laboratório, que participaram da minha caminhada pelo mestrado. Sem vocês, o cotidiano teria sido mais desanimado e menos divertido;

A todos os provadores, em especial meus amigos e colegas, que compareceram às minhas muitas análises sensoriais e me permitiram concluir este trabalho.

RESUMO

O aquecimento do mercado de cervejas especiais tem impulsionado a busca por inovação no setor, especialmente com relação ao desenvolvimento de produtos diferenciados quanto às características sensoriais. As linhagens de leveduras utilizadas na fabricação de cerveja são, em sua grande maioria, pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, principalmente *S. cerevisiae*. No entanto, leveduras não *Saccharomyces* são capazes de produzir uma gama de compostos de sabor e aroma, que podem ser aplicados para melhoria sensorial deste produto. Este trabalho teve como objetivo caracterizar e selecionar leveduras não *Saccharomyces* com potencial para a produção de cervejas especiais. Foram avaliadas leveduras pertencentes aos seguintes gêneros: *Candida*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Starmerella*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces*, *Zygossacharomyces* e *Zygotorulaspota*. As leveduras foram avaliadas quanto ao perfil fisiológico, capacidade fermentativa e produção de metabólitos. Após testes de habilidade de fermentação de maltose, produção de H₂S e tolerância à condições de estresse, quatro linhagens pertencentes à espécie *Starmerella meliponinorum* e três à *Torulaspota delbrueckii* foram consideradas promissoras para a produção de cerveja. Estas leveduras foram submetidas a ensaios fermentativos em escala laboratorial e uma linhagem de *S. meliponinorum* e três de *T. delbrueckii* foram selecionadas para produção em escala piloto de 40 litros. As cervejas obtidas foram, no geral, aceitas de forma similar à cerveja controle, produzida com linhagem comercial de *S. cerevisiae* de cerveja. O perfil de compostos voláteis de cada cerveja produzida foi determinado por cromatografia gasosa. As cervejas produzidas com cultivos que envolviam a linhagem de *S. meliponinorum* apresentaram maiores níveis de hexanoato de etila (composto que remete à abacaxi) em relação à cerveja produzida apenas com *S. cerevisiae* comercial. As linhagens de *T. delbrueckii* mostraram maior capacidade de produção de alcoóis superiores que a levedura *S. cerevisiae* comercial. O presente trabalho mostrou que as leveduras ambientais estudadas podem contribuir no processo produtivo de cervejas, mas etapas de adaptação à fermentações industriais podem melhorar a reprodutibilidade do produto final.

Palavras-chave: cervejas especiais; não *Saccharomyces*; leveduras ambientais.

ABSTRACT

The craft and special beer market warming has boosted the search for novelty, specially the development of distinct products regarding its sensory features. The yeasts strains used in the majority of brewing belong to *Saccharomyces* genera, especially *S. cerevisiae*. However, wild non *Saccharomyces* yeasts are able to produce a wide range of flavour compounds that can be used in order to improve the flavour of these products. This work aims to characterize and select non *Saccharomyces* yeasts with potential for the production of special beers. *Candida*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Starmerella*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Zygotorulaspota* yeasts were evaluated regarding their physiological and fermentative profiles and metabolite production. After maltose fermentation, stress tolerance and H₂S production assays, four *Starmerella meliponinorum* and three *Torulaspota delbrueckii* yeasts were regarded as promising for beer production. These yeasts were, then, submitted to a bench scale fermentation assay. One *S. meliponinorum* and three *T. delbrueckii* were selected for 40 L pilot scale beer production. The resulting beers were as accepted as the beer produced with commercial reference *S. cerevisiae* yeast. Volatile compound profile for each beer was determined with gas chromatography. Beers fermented with cultures containing *S. meliponinorum* strain showed higher levels of ethyl octanoate (pineapple like flavour) in comparison with beer fermented with commercial *S. cerevisiae* yeast. *T. delbrueckii* strains showed higher fusel alcohol production than commercial *S. cerevisiae*. This study showed that the wild yeasts evaluated can be used in brewing, but industrial fermentation adaptation steps can improve reproductibility of the final product.

Keywords: special beers; non *Saccharomyces*; wild yeasts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visão geral do metabolismo de *S. cerevisiae* que influencia na qualidade da bebida.....26
- Figura 2.** Micrografia eletrônica de varredura de uma amostra de *Saccharomyces cerevisiae*.....28
- Figura 3.** Número total de cervejarias por ano no Brasil.....30
- Figura 4.** Influência na percepção sensorial de produtos fermentados com *T. delbrueckii* comparado com fermentações típicas com *Saccharomyces cerevisiae*.....33
- Figura 5.** Esquema das etapas da mostura para produção de cerveja em escala piloto.....44
- Figura 6.** Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....61
- Figura 7.** Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....62
- Figura 8.** Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S.meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.....63

Figura 9. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....64

Figura 10. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....65

Figura 11. Contagem populacional de leveduras nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *Starmerella meliponinorum* em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.....66

Figura 12. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro (Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....67

Figura 13. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro (Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....68

Figura 14. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro

(Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente..... 69

Figura 15. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....70

Figura 16. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....71

Figura 17. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.....72

Figura 18. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....73

Figura 19. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*,

respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....74

Figura 20. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.....75

Figura 21. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....76

Figura 22. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....77

Figura 23. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.....78

Figura 24. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial por *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.....79

Figura 25. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.....80

Figura 26. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.....81

Figura 27. Análise de componentes principais de scores das quantidades relativas de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi representada com código Y5534; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....92

Figura 28. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).
.....93

Figura 29. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas

pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi representada com código Y5534; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....94

Figura 30. Análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi representada com código Y2681; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....97

Figura 31. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).....98

Figura 32. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi representada com código Y2681; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....99

Figura 33. Análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi representada com código Y4753; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....102

Figura 34. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).....103

Figura 35. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi representada com código Y4653; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.....104

Figura 36. Análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi representada com código Y4757; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre

S. cerevisiae T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada.....107

Figura 37. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).....108

Figura 38. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos *scores* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi representada com código Y4657; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada.....109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos voláteis associados a aroma em cerveja.....	27
Tabela 2. Linhagens e origem das leveduras não <i>Saccharomyces</i> submetidas à triagem no presente estudo.....	38
Tabela 3. Capacidade de fermentação da maltose a 10 ^o C e 20°C por leveduras não <i>Saccharomyces</i> testadas no presente trabalho.....	51
Tabela 4. Produção de H ₂ S e tolerância às condições de estresse testadas (pH, etanol, concentrato de glicose e temperatura) por leveduras não <i>Saccharomyces</i> utilizadas no presente trabalho.....	58
Tabela 5. Densidade original (OG) e final (FG) das cervejas produzidas (gravidade específica), ABV (álcool por volume) teórico calculado e grau de atenuação aparente dos açúcares totais.....	84
Tabela 6. Consumo de açúcares, produção de metabólitos e porcentagem de álcool das cervejas produzidas em escala piloto.....	85
Tabela 7. Média por atributo da nota obtida na análise sensorial pelas cervejas produzidas em escala piloto.....	86
Tabela 8. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com <i>Starmerella meliponinorum</i> UFMG-CM-Y5534 em escala piloto	91
Tabela 9. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y2681 em escala piloto.....	96
Tabela 10. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4753 em escala piloto.....	101

Tabela 11. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4757 em escala piloto.....	106
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
ABV	Álcool por volume
Agt	Transportador de alfa-glicosidade
BG	beta-glicosidade
BJCP	Beer judge certification program
CG	Cromatografia gasosa
CG-MS	Cromatografia gasosa/espectometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
D.O.	Densidade ótica
DMS	Dimetil sulfeto
DMSO	Dimetilsulóxido
EToH	Etanol
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FEMA	Flavor and extract manufacturers association
FG	Gravidade final
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HS-SPME-GC/FID	Cromatografia gasosa por microextração em fase sólida por headspace e detecção por espectometria de masas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LASEC	Laboratório de análise sensorial e estudos do consumidor
Malx1	Proteína ligante de maltodextrina
MAPA	Ministério da agricultura e pecuária
Mphx	Permease de maltose homologa
Mtt1	Maltose transporter
NaCl	Cloreto de sódio
OG	Gravidade original
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFC	Unidade formadora de colônia
YCB	Yeast carbon base
YM	Ágar extrato de malte, extrato de levedura
YPD	Yeast, peptone, dextrose
PC	Componente principal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Cerveja: definição e contexto histórico	22
1.2. Processo de fabricação da cerveja e a levedura cervejeira.....	23
1.3. O mercado cervejeiro.....	28
1.4. Novas leveduras cervejeiras	30
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Linhagens	37
4.2. Habilidade de fermentação de maltose	37
4.3. Caracterização fisiológica das leveduras	41
4.3.1. Produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	41
4.3.2. Tolerância à condições de estresse.....	41
4.4. Fermentação em escala laboratorial.....	42
4.5. Produção em escala piloto	42
4.6. Análises cromatográficas.....	45
4.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	45
4.6.2. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas	46
4.7. Análise sensorial	47
4.8. Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Habilidade de fermentação de maltose	49
5.2. Caracterização fisiológica das leveduras	55
5.3. Fermentação em escala laboratorial.....	59
5.3.1. <i>Starmerella meliponinorum</i> UFMG-CM-Y5534	61

5.3.2. Starmerella meliponinorum UFMG-CM-Y5582	63
5.3.3. Starmerella meliponinorum UFMG-CM-Y5575	66
5.3.4. Starmerella meliponinorum UFMG-CM-Y5554	69
5.3.5. Torulaspora delbrueckii UFMG-CM-Y2681	72
5.3.6. Torulaspora delbrueckii UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757.....	75
5.4. Produção em escala piloto	82
5.4.1. Cervejas piloto.....	82
5.4.2. Análises sensoriais	86
5.4.3. Análise das cervejas por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.....	88
5.4.3.1. Starmerella meliponinorum UFMG-CM-Y5534	89
5.4.3.2. Torulaspora delbrueckii UFMG-CM-Y2681	95
5.4.3.3. Torulaspora delbrueckii UFMG-CM-Y4753	100
5.4.3.4. Torulaspora delbrueckii UFMG-CM-Y4757	105
6. CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
Anexo A – Termo de Consentimento livre e esclarecido dos provadores	121
Anexo B – Questionário de Coleta de Dados para Análise Sensorial de Cerveja ..	122
Anexo C – Ficha de avaliação de teste de aceitação e intenção de compra de Cerveja	123
Anexo D – Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn entre os resultados obtidos no teste de tolerância a condições de estresse para levedura Saccharomyces cerevisiae comercial T58 e leveduras não Saccharomyces.....	124
Anexo E – Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn das notas obtidas por todas as cervejas controle produzidas com S. cerevisiae T58 comercial em escala piloto para os atributos aroma, sabor e impressão global	125
Anexo F - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com	

levedura <i>S. cerevisiae</i> comercial T58 em cultivo puro, <i>Starmerella meliponinorum</i> UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (<i>S. cerevisiae</i> T58: <i>S. meliponinorum</i> UFMG-CM-Y5534) em escala piloto	126
Anexo G - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura <i>S. cerevisiae</i> comercial T58 em cultivo puro, <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (<i>S. cerevisiae</i> T58: <i>T. delbrueckii</i> UFMG-CM-Y2681) em escala piloto.....	127
Anexo H - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura <i>S. cerevisiae</i> comercial T58 em cultivo puro, <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (<i>S. cerevisiae</i> T58: <i>T. delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4753) em escala piloto.....	128
Anexo I - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura <i>S. cerevisiae</i> comercial T58 em cultivo puro, <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (<i>S. cerevisiae</i> T58: <i>T. delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4757) em escala piloto.....	129
Anexo J – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura <i>Starmerella meliponinorum</i> Y5534 (continua)	130
Anexo L – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y2681 (continua)	134
Anexo M – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura <i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-	

Y4753

(continua) 137

Anexo N – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para
cervejas produzidas com a levedura *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-
Y4757 (continua)

..... 142

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cerveja: definição e contexto histórico

Cerveja é a bebida alcoólica mais consumida atualmente no mundo. Genericamente, o termo se refere a uma gama de bebidas produzidas a partir de diversas fontes de substâncias amiláceas. Na maioria dos casos, o malte de cevada é a principal fonte de açúcares fermentescíveis, mas outros cereais e fontes podem ser utilizadas, como trigo, aveia e centeio (MORADO, 2017). No Brasil a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas são regidos pela Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994 e regulamentados pelos decretos nº 6871 de 4 de julho de 2009 e 9902 de 8 de julho de 2019. O último atualiza a definição de cerveja, estabelecendo que esta seja 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. Passa-se, ainda, a admitir ingredientes de origem animal e vegetal que antes não eram permitidos, como a lactose, por exemplo.

Essa atualização ocorre principalmente para acomodar a inovação vivenciada pela indústria e mercado cervejeiro brasileiro na última década, que vem incorporando novos ingredientes e técnicas à produção da bebida. Porém, neste decreto, não há regulamentação acerca do que é, de maneira geral, entendido como ‘cerveja artesanal’, cuja definição ainda é discrepante e gera divergências. O projeto de lei 5191/13 visa regulamentar a produção de cerveja artesanal no Brasil, mas sua tramitação aguarda novas disposições. Todavia este projeto de lei sugere que cerveja artesanal seja aquela cujo produtor não ultrapasse os 1.000 litros de fabrico por batelada e 30.000 litros totais anuais. Dessa forma, as cervejas que não obedecem ao padrão sensorial e de produção das chamadas cervejas “*mainstream*” serão referidas, neste trabalho, como cervejas ‘especiais’.

Bebidas alcoólicas fermentadas, em especial a cerveja, fazem parte da história da humanidade, sendo consumidas em contextos culturais, religiosos, nutricionais ou de entretenimento. É possível encontrar evidências da fabricação de bebidas alcoólicas fermentadas nos moldes gerais da cerveja em quase todos os continentes, sendo exemplos: cervejas de milho, no Peru; de extrato de cana de açúcar, nas

Filipinas; de painço, no Egito antigo, Babilônia, Índia; de trigo, na China; de sorgo, na África e até de arroz com extrato de *Cannabis sativa*, também na Índia. Algumas dessas evidências de produção e consumo datam de tempos tão antigos quanto 7000 a.c., pelos Sumérios (DULFOUR et al, 2003; FORGET, 1998; TAMANG; KAILASAPATHY, 2010). A importância desta bebida é tão grande, que ela teve seu lugar no código de Hamurabi, que dispunha que comerciantes que impusessem preço excessivo na cerveja deveriam ser afogados na mesma (BAMFORTH, 2009).

Inicialmente, a produção de cerveja ocorria de maneira não intencional, fruto da contaminação de fontes de açúcar pela microbiota residente do local de armazenamento e, em alguns casos, uma etapa de mastigação dos grãos pelo cervejeiro era realizada, como era o caso da chicha, na América do Sul. As bases modernas da cerveja surgiram no norte da Europa, com a produção sendo comandada principalmente por mulheres, no domicílio, e por monges, em abadias e mosteiros (TAMANG & KAILASAPATHY, 2010). O uso do lúpulo (flores femininas da planta *Humulus lupulus*) na produção de cerveja é uma prática antiga e era feito, mais comumente, em conjunto com outras ervas, como alecrim, noz-moscada, canela, entre outros (chamado 'Gruit'), mas seu uso disseminado foi iniciado na Alemanha, a partir do início do século XVI. A adição do lúpulo, além de agregar sabor, também aumenta o tempo de prateleira da bebida, pois esta planta possui propriedades antimicrobianas (FORGET, 1998; CORRAN, 1975).

1.2. Processo de fabricação da cerveja e a levedura cervejeira

A produção de cerveja é feita, nos dias atuais, sob os seguintes moldes: os principais ingredientes utilizados são malte de cevada, lúpulo, levedura e água. Apesar de alguns países e cervejarias se aterem apenas a esses ingredientes, como é o exemplo da Alemanha e sua lei da pureza (Reinheitsgebot), outros adjuntos são comumente utilizados e permitem a fabricação das mais diversas cervejas, com propriedades únicas sensoriais e adequadas a diferentes situações. Esses adjuntos podem ser ervas, extratos de frutas, outras fontes de carboidratos, café e até mesmo chocolate (BAMFORTH, 2003; BOULTON, 2013)

Os maltes utilizados na produção são resultado da germinação induzida dos grãos, seguida pela interrupção, secagem e torra do malte. A germinação é necessária, pois é onde se dá a formação das enzimas que serão responsáveis, na mostura, pela conversão do amido presente no endosperma em açúcares

fermentescíveis. O lúpulo, outro ingrediente importante, contém alfa-ácidos e óleos essenciais, responsáveis pelo amargor e aroma característico. A água também tem importante papel como ingrediente na fabricação da cerveja, pois seu perfil físico-químico influencia diretamente no produto final (MORADO, 2017).

Boulton e Quain (2001), no livro *Brewing yeast and fermentation*, fornecem uma visão geral do processo produtivo da cerveja. Salvo utilização de ingredientes e processos especiais, a produção se inicia com o malteamento do grão. Após colheita, o grão é embebido em água, o que dá início à sua germinação. A produção de enzimas durante a germinação é responsável pela hidrólise do amido do endosperma e estas enzimas são utilizadas na etapa seguinte da produção para disponibilização de açúcares fermentescíveis para a levedura cervejeira. A germinação é, então, interrompida por aquecimento em estufa, onde o grão perde água e cessa seu metabolismo. O processo de aquecimento deve ser feito com cuidado de modo a evitar a desnaturação enzimática por calor. Após perder cerca de 50% do conteúdo de água, o malte pode ser torrado. O grau de torra dependerá do malte que está sendo produzido.

O grão deve ser moído para expor seu conteúdo à ação da água e enzimas, mas a casca deve ser mantida intacta, pois funciona como elemento filtrante do mosto cervejeiro, em um processo denominado clarificação. A etapa subsequente denomina-se mostura. Nela, o grão moído é misturado à água e esta mistura é aquecida de maneira controlada para permitir a ação das enzimas que irão digerir polissacarídeos da parede celular, quebrar o amido em açúcares fermentescíveis e proteínas em unidades menores. Com duração média de uma hora, esta etapa é finalizada com a elevação da temperatura do mosto à aproximadamente 76°C, o que promove a inativação das enzimas e reduz a viscosidade do mosto (*mash out*).

A partir daí o mosto deve ser clarificado, processo no qual ele é filtrado através da “cama de malte” (formada a partir das cascas durante a mostura) e que, posteriormente, é lavada com água quente de modo a extrair a maior quantidade possível de material fermentescível. O mosto obtido é fervido, etapa onde são adicionados os lúpulos. No início da fervura são adicionados lúpulos para a extração de resinas e formação de compostos que conferem amargor à bebida, mas o caráter volátil dos óleos essenciais que conferem aromas lupulados faz com que seja necessária nova adição ao final do processo. A fervura também elimina compostos

indesejáveis e reduz a carga microbiana no mosto, preparando-o para o processo de fermentação. Segue-se, então, a etapa de resfriamento do mosto.

A constituição do mosto é determinada pela natureza do material utilizado e pela manipulação durante a mostura. De modo geral, a maltose perfaz a maior parte dos carboidratos presentes no mosto, com concentração entre 60 e 65%. Outros carboidratos são, principalmente, glicose, frutose, sacarose, maltotriose e dextrinas. As chamadas dextrinas representam a grande maioria dos carboidratos não fermentáveis que compõem o mosto, sendo compostas de pelo menos quatro unidades de glicose e são responsáveis por 90% do carboidrato residual da cerveja finalizada. Outro tipo de carboidrato que constitui o mosto são as beta-glucanas, derivadas da parede celular do endosperma do malte, cuja degradação durante a mostura depende da ação de beta-glucanases, enzimas termo sensíveis. Esse carboidrato é um dos principais responsáveis pela viscosidade do mosto.

Outros constituintes do mosto são compostos nitrogenados, em especial na forma de aminoácidos, pequenos peptídeos e proteínas de peso molecular variado, que possuem papel importante na formação e manutenção da espuma da cerveja; lipídios, que dificilmente estão presentes na cerveja finalizada, mas são fonte importante de nutrição para a levedura e podem ser utilizados como precursores de diversas moléculas de aroma e sabor; e compostos sulfurosos, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, que podem influenciar no aroma e sabor final da bebida.

O mosto é oxigenado, antes da adição do fermento. A levedura cervejeira, em grande maioria pertencente ao gênero *Saccharomyces*, é, então, adicionada. Essa etapa envolve a transformação de açúcares em álcool e, apesar da fermentação ser essencialmente anaeróbia, a levedura requer certa quantidade de oxigênio de modo a sintetizar ergosterol, importante no transporte de açúcares. Além do álcool produzido, a levedura também é capaz de produzir diversas moléculas, usualmente advindas de metabolismo secundário, que são em grande parte responsáveis por sabor, aroma e corpo da bebida, conhecidas como subprodutos de fermentação (figura 1, Tabela 1).

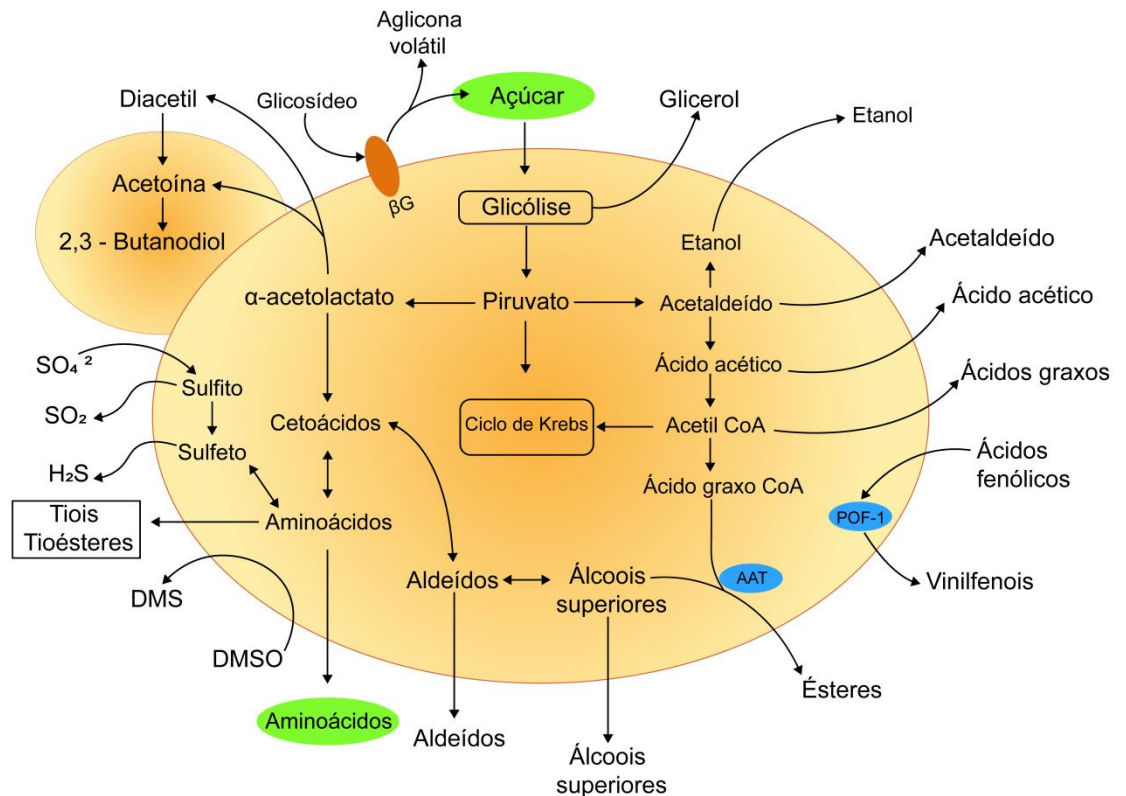


Figura 1. Visão geral do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* que influencia na qualidade da bebida. BG, beta glicosidase; DMS, dimetil sulfeto; DMSO, dimetilsulfóxido. Retirado de Bokulich & Bamforth (2013).

Os subprodutos de fermentação são compostos voláteis e se dividem principalmente entre ésteres, alcoóis superiores, aldeídos e ácidos (Biazon et al., 2009; Harayama et al., 1994). Entre os alcoóis superiores, os principais são: n-propanol, isobutanol, álcool benzílico, 2-feniletanol, 3-metilbutanol, 2-metilbutanol e álcool amílico (Thompson-Witrick et al., 2015). Os ésteres, mesmo que em baixas concentrações, são facilmente detectados na bebida, pois o limiar de detecção é baixo. Dentre os mais de 90 possíveis ésteres na cerveja, os principais são etil octanoato, acetato de isoamila, acetato de etila, decanoato de etila e 2-feniletil acetato (Ocvirk, Mlinarič, & Košir, 2018; Thompson-Witrick et al., 2015). Dos aldeídos, o acetaldeído é o mais comum, porém outros podem se formar durante a produção da bebida, como o fenilacetaldeído e o furfural. Alguns ácidos também podem ser identificados, como o ácido caprílico, ácido láurico, ácido cáprico e ácido nonanóico (Rossi, Sileoni, Perretti, & Marconi, 2014). A tabela 1 relaciona os principais compostos voláteis na cerveja, o descritor sensorial (como é percebido pelo olfato e paladar) e o limiar de detecção sensorial.

O composto volátil H₂S pode agregar à bebida aromas desagradáveis de ovo, e sua permanência na bebida depende da eficácia no processo de maturação da mesma, sendo que a produção em altas concentrações é sempre indesejável (BOULTON & QUAIN, 2006; REID & INGERSON-MAHAR, 2012; BOULTON, 2013). Por esse motivo, apesar de a não produção de H₂S ser uma característica desejável, não é essencial que leveduras utilizadas no processo fermentativo da cerveja sejam completamente incapazes de gerar este metabólito.

Tabela 1. Compostos voláteis associados a aroma em cerveja. Adaptado de Olaniran et al. (2017).

Composto	Descritor sensorial	Limiar de detecção (ppm)
<i>Alcoóis superiores</i>		
1-Butanol	Frutado, Álcool	
2-Feniletanol	Álcool, Frutado, Mel, Rosas, Vinho	125
2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, tostado, frutado, solvente	65
2-Metil propanol (álcool isobutílico)	Vínico, Amargo, maçã, cacau	200
3-Metil butanol (Álcool isoamílico)	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	70
Propan-1-ol (Propanol)	Álcool, pungente, bala	800
<i>Ésteres</i>		
Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	30
Acetato de feniletila (2-feniletil acetato)	Flores, mel, rosa	3,8
Acetato de isoamila (acetato de isopentila)	Banana, maçã, solvente, esterificado	1,2
Acetato de isobutila	Maçã, Banana, Floral, Herbal	0,05
Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pêra	
Hexanoato de etila (Etil caproato)	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,21
Ocatanoato de etila (Etil caprilato)	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,9
<i>Ácidos</i>		
Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	3
Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,2
Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	2,8
Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,5
<i>Fenol</i>		
4-vinil guaiacol	Cravo, curry, tempeiro	0,3
<i>Compostos carbonílicos</i>		
2,3-Butanediona (diacetil)	Manteiga	0,15
Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	25

Duas leveduras do gênero *Saccharomyces* (figura 2) são predominantemente utilizadas na fabricação de cerveja, sendo elas *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. *S. cerevisiae*, é conhecida como levedura de alta fermentação, sendo responsável pela fermentação de cervejas do tipo *Ale*. Essas

leveduras têm sua temperatura ótima de fermentação por volta dos 17-23°C, e é possível encontrar uma grande diversidade entre as diferentes linhagens utilizadas na produção de cervejas. (BOULTON & QUAIN, 2001; MENEZES, 2019).

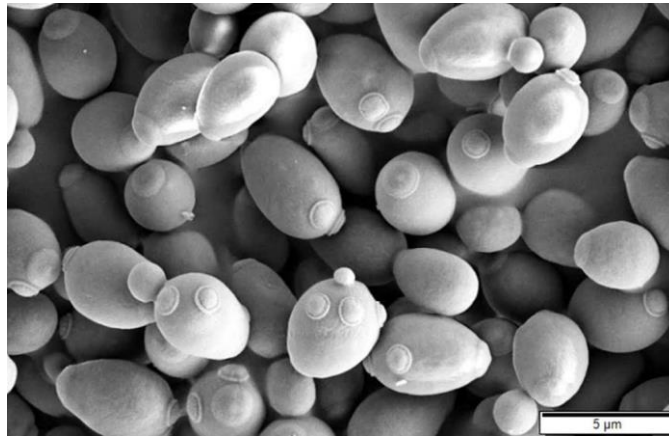


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de uma amostra de *Saccharomyces cerevisiae*. Retirado de Murtey & Ramasamy (2016).

A espécie *S. pastorianus* é responsável pela fermentação de cervejas do tipo *Lager*, que são conduzidas a temperaturas mais baixas (8-15°C) (BOULTON & QUAIN, 2001). Essa levedura, ao contrário do observado para *S. cerevisiae*, apresenta estrutura genética mais complexa. A origem de *S. pastorianus* é, até o momento, muito debatida. Por décadas, foi reconhecido pelos cientistas que esta levedura é um híbrido entre uma *S. cerevisiae* e outra levedura do gênero que possuísse características de criotolerância (BOYNTON & GREIG, 2014). Libdink e colaboradores (2011) propuseram que esta segunda espécie, que contribuiu para a formação de *S. pastorianus*, foi *Saccharomyces eubayanus*, uma espécie de levedura descrita a partir de isolados obtidos de casca de árvore na Patagônia argentina. *S. eubayanus* é rotineiramente isolada em ambientes frios, mas ainda não há consenso se essa hibridização ocorreu na Ásia ou Europa (BOYNTON & GREIG, 2014; EIZAGUIRRE et al, 2018), apesar de estudos apontarem as linhagens de *S. eubayanus* tibetanas como as mais similares geneticamente à *S. pastorianus* (Bing et al. 2014; Salazar et al. 2019).

1.3. O mercado cervejeiro

No início, a produção de cerveja era realizada em pequena escala, de modo caseiro e, posteriormente, de maneira local ou regional. Apenas após 1ª e 2ª guerras

mundiais, a fabricação da cerveja ganhou status de empreendimento lucrativo. Apesar disso foi apenas a partir da década de 1970 que grandes companhias cervejeiras cresceram mundialmente. Esta produção em massa em escala global levou a uma homogeneização do produto que estava sendo consumido. A cerveja “*mainstream*”, como é chamada aquela produzida por grandes conglomerados cervejeiros, é do tipo *American Light Lager*, com perfil sensorial neutro, baixa ou nenhuma percepção de lúpulo e de características de fermentação, proporcionados pela levedura utilizada no processo (MORADO, 2017). Essa homogeneização abriu, ao final do século XX, espaço para a mudança de comportamento de consumo de cerveja. Um resgate das tradições e cultura cervejeira tem sido observado, lado a lado com o desenvolvimento tecnológico e científico permitindo que novas técnicas sejam adotadas, gerando inovação no setor.

Nos Estados Unidos, o setor de cervejas artesanais nacional detém uma parcela de 12,7% do mercado no país. O número de cervejarias alcançou a marca de 6372 em 2017, ao passo que no ano 2000 havia apenas 1566 (BREWERS ASSOCIATION, 2018). No Brasil o mercado cervejeiro também passa por uma fase de crescimento exponencial (figura 3). Segundo dados do Ministério da Agricultura, a expansão do mercado teve início em meados de 2010, sendo as regiões Sul e Sudeste onde está localizada a grande maioria das cervejarias.

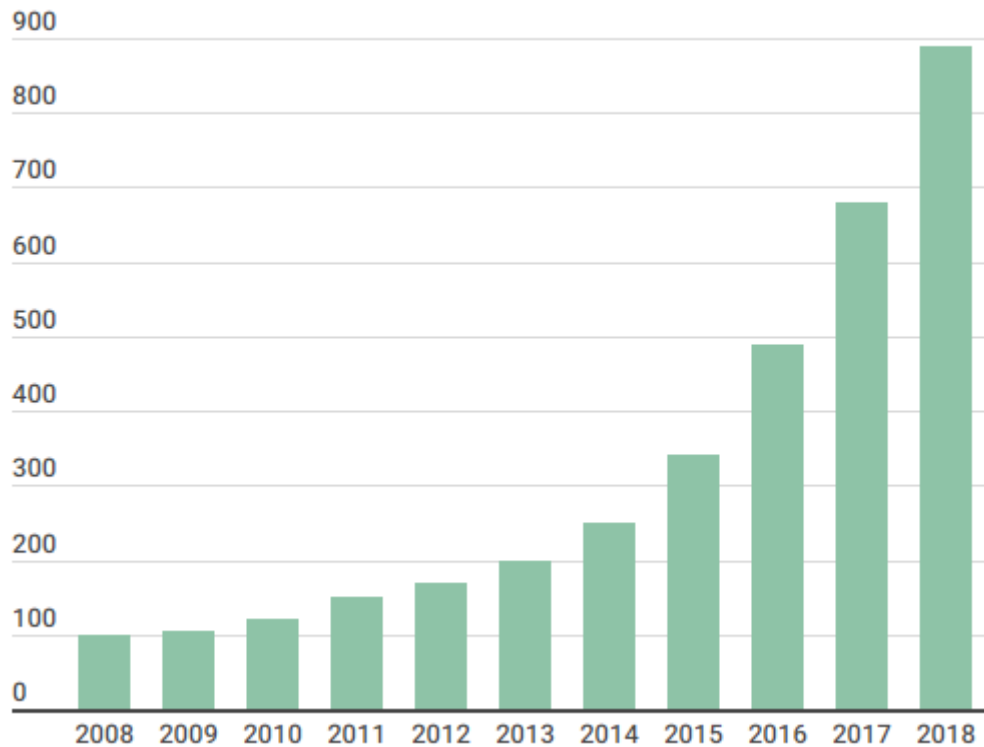


Figura 3. Número total de cervejarias por ano no Brasil. Ministério da Agricultura (2018).

O último anuário publicado pelo Ministério da Agricultura discorre sobre o mercado cervejeiro no ano de 2018. Aproximadamente 200 novas cervejarias foram registradas no país, perfazendo 900 no total. Já no ano de 2019 foi registrada a cervejaria de número 1000. Segundo o MAPA, Nova Lima, cidade próxima a Belo Horizonte, desponta como a cidade com mais cervejarias per capita do Brasil. Ainda segundo Morado (2017), em seu livro *Larousse da Cerveja*, o perfil de consumo deste produto tem mudado. As cervejas especiais e “*Premium*” ganham espaço por apresentarem inovação, criatividade e diferentes características sensoriais. Os dados globais e brasileiros apontam a consolidação do nicho das microcervejarias.

1.4. Novas leveduras cervejeiras

A utilização de diferentes linhagens de fermento sempre foi fonte de diferenciação na produção de bebidas, ainda que realizado de maneira empírica. Com a descoberta da fermentação e suas consequências no processo produtivo, é natural que se busque novas linhagens, mais adequadas à produção da bebida. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para a seleção de novas linhagens de *S. cerevisiae* para a produção de cerveja. No Brasil, em particular, tem-se buscado por leveduras

isoladas a partir do processo produtivo de cachaça (MONTANDON, 2016). Além disso, é possível utilizar a biodiversidade de um local como fonte de novos isolados cervejeiros (ARAUJO et al, 2018; GIBSON et al, 2017; STEENSELS et al, 2014; ALPERSTEIN 2020).

A produção de híbridos entre *Saccharomyces* com características de interesse também é campo de estudo de alguns pesquisadores (BIJAZ et al, 2012; FIGUEIREDO, 2016; GIBSON et al, 2017). Essa estratégia consiste na obtenção de híbridos entre duas linhagens que apresentam características de interesse para o processo produtivo. Figueiredo e colaboradores (2017) obtiveram híbridos entre linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de destilarias de cachaça para produção de cervejas *Lager*. Uma das linhagens floculava fortemente e a outra era boa produtora de ésteres. Outras características podem ser exploradas nos cruzamentos, como linhagens com baixa produção de H₂S, tolerância às condições de estresse (BIJAZ et al, 2012).

Apesar da levedura *S. cerevisiae* ser a maior produtora de cervejas *Ale*, historicamente, alguns estilos se dependem da participação de outros microrganismos, pois estes podem ser responsáveis pela produção de compostos de aroma e sabor diferenciados. O metabolismo microbiano durante as fermentações é muito mais complexo do que apenas produzir etanol (VARELA, 2016) e a complexidade aromática de bebidas alcoólicas de fermentação espontânea tem sido atribuída à presença de várias espécies de leveduras (GIBSON et al, 2017; RAVASIO et al, 2018; GAMERO et al, 2018). Um exemplo seria *Kluyveromyces marxianus*, que produz altos níveis de feniletanol e 2-feniletil acetato, responsáveis por aroma similar a rosas (CARLQUIST et al, 2015). O uso de leveduras não-*Saccharomyces* na fermentação também é reportado para o melhoramento de parâmetros de qualidade como redução de álcool (principalmente na indústria de vinho) (CONTREARAS et al, 2014), produção de glicerol (BELDA et al, 2015; LEMOS JÚNIOR et al, 2018), entre outros.

Nem todas as espécies de levedura são capazes de fermentar grandes quantidades dos açúcares do mosto produzindo etanol. Porém, essas podem ser utilizadas como bioflavorizantes quando em cultivo misto com linhagens de *S. cerevisiae*, sendo a última responsável pela fermentação dos açúcares e produção de etanol (CANONICO et al., 2017; SEARENS & SWIGERS, 2014). É reconhecido o sucesso de *Brettanomyces*, principalmente as espécies *B. bruxelensis* e *B. anomala*,

na produção de cervejas tradicionais nos estilos Lambic. Alguns aromas característicos destas espécies são compostos fenólicos voláteis que lembram defumado e celeiro (GIBSON et al, 2017). A maioria dos nichos ecológicos conhecidos das espécies de *Brettanomyces* é caracterizado por processos espontâneos de fermentação alcoólica e outras bebidas, como laticínios e *kombucha*, por exemplo. Esses nichos são caracterizados por apresentarem uma combinação de fatores de estresse: altas concentrações de etanol, baixo pH, ausência de fontes prontamente fermentáveis de carbono e fontes de nitrogênio. As pressões seletivas que estas leveduras enfrentam levaram a seleção de adaptações a essas condições, possibilitando que sobrevivam nestes nichos e por vezes até superem outras espécies por mecanismos de competição (STEENSELS et al, 2015).

Outra levedura com grande potencial para a produção de cerveja é a espécie *Torulaspora delbrueckii*, que possui linhagens resistentes a muitos estresses encontrados no ambiente cervejeiro, além de produzir altos níveis de aromas frutados (MICHEL et al, 2016). Porém a habilidade de fermentar açúcares do mosto é variável entre linhagens de *T. delbrueckii* (TARARIDIS et al, 2013; LOIRA ET AL. 2014; CANONICO et al, 2016; MICHEL et al, 2016). Canonico e colaboradores (2016, 2017) investigaram a contribuição de fermentações mistas entre *S. cerevisiae* e vinte e oito linhagens de *T. delbrueckii* na produção de cerveja. A linhagem DiSVA 254 de *T. delbrueckii* contribuiu com a produção de altos níveis de alcoóis superiores, acetato de etila e acetato de isoamila e baixos níveis de hexanoato de etila e octanoato de etila. Independente da linhagem de *S. cerevisiae* utilizada, *T. delbrueckii* teve influencia em todas as fermentações mistas.

O papel de *T. delbrueckii* e espécies de *Starmerella* na indústria do vinho é investigado. *T. delbrueckii* é, entre as não *Saccharomyces*, a levedura melhor estudada, comercializada e utilizada a nível industrial (BELDA et al, 2017). Altos níveis de ésteres frutados, tióis, terpenos e alterações nos níveis de alcoóis superiores foram relatados em alguns estudos utilizando *T. delbrueckii* (AZZOLINI et al, 2015; RENAUT et al, 2016; BELDA et al, 2017). Renaut e colaboradores (2015) reportaram diferenças no aroma, especialmente no caráter frutado de vinhos produzidos com fermentações mistas sequenciais (inoculação de *S. cerevisiae* após fermentação inicial com *T. delbrueckii*), quando comparadas com cultivos puros com *S. cerevisiae*. A figura 4 mostra a influência na percepção sensorial de *T. delbrueckii* em produtos fermentados, evidenciando melhor impressão geral, qualidade do aroma, estrutura,

caráter tropical e varietal da bebida, bem como menor acidez geral e menor percepção de ácido acético.

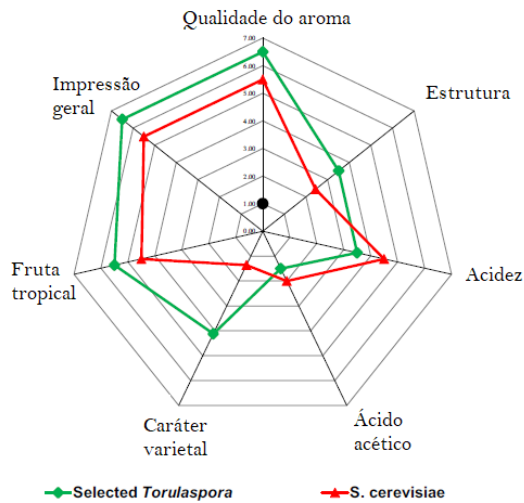


Figura 4. Influência na percepção sensorial de produtos fermentados com *Torulaspora delbrueckii* comparado com fermentações típicas com *Saccharomyces cerevisiae* (Benito, 2018).

As leveduras do gênero *Starmerella* também vêm sendo estudadas, em especial *S. bacillaris* na produção de vinho, contribuindo com maiores concentrações de glicerol e menores concentrações de álcool, além de afetar a concentração de compostos voláteis de acordo com a linhagem e o protocolo de fermentação testado (SILVA et al, 2019; LEMOS JÚNIOR et al, 2018; NISIOTOU et al, 2018; ENGLÉSOS et al, 2018a; 2018b).

A espécie *Starmerella meliponinorum* foi originalmente descrita a partir de isolados do Brasil e Costa Rica em associação com abelhas sem ferrão da subfamília Meliponinae (TEIXEIRA et al, 2003). Um trabalho recente de Silva e colaboradores (2019) explora microrganismos isolados de substratos relacionados às abelhas como possíveis produtores de bebidas alcoólicas, dentre estes, nove isolados de *S. meliponinorum*. Estes isolados não apresentaram bom desempenho no teste de tolerância às condições de estresse (20% de glicose e 5% etanol), utilizado como critério de seleção inicial e não avançaram para etapas posteriores. Todavia, este trabalho foi apenas o primeiro a testar leveduras dessa espécie em fermentações de bebidas alcoólicas, sendo necessários mais estudos para avaliar o desempenho da espécie e comportamento de diferentes linhagens.

Muitos são os nichos de onde leveduras não *Saccharomyces* podem ser recuperadas. Diferentes autores estudam material vegetal (flores, frutos, casca de

árvores), insetos (BUZZINI & MARTINNI, 2002; KANG et al 2017; SILVA et al, 2019) e fermentações espontâneas de comidas e bebidas (APONTE & BLAIOTTA 2016; CAPOZZI et al. 2015; DE PONZZES-GOMES et al. 2014; SULAIMAN et al. 2014; TAMANG et al. 2016) como fonte de isolamento de leveduras que possam contribuir na produção de bebidas alcoólicas. Cada nicho escolhido possui vantagens e desvantagens. Leveduras isoladas de processos fermentativos podem estar mais adaptadas a condições adversas as quais serão submetidas, ao passo que o meio ambiente pode fornecer leveduras com menor capacidade de tolerância ao estresse, mas com interessantes adaptações fisiológicas às condições ambientais nas quais estão inseridas (PRETORIUS 2000; ALPERSTEIN et al. 2020). Estas leveduras não *Saccharomyces* são, tradicionalmente, tidas como contaminantes do processo produtivo de bebidas fermentadas, mas seu papel sensorial exercido no produto final tem sido desvendado (VAN DER KUHLE & JESEPERSEN, 1998; PRETORIUS 2000; PRIEST, 2003; FLEET, 2006; JOLLY et al. 2014; STEENSELS et al, 2015; STERNES et al. 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O crescimento do mercado de cervejas especiais e a mudança de comportamento do consumidor tornam necessário o desenvolvimento de novos produtos, com características sensoriais diferenciadas. Os consumidores de cerveja artesanal prezam pela diversidade sensorial da bebida, e as leveduras têm um papel primordial nesse aspecto.

As leveduras são produtoras de uma gama de metabólitos que podem contribuir com o sabor e aroma da bebida, sem a necessidade de utilização de saborizantes e aromatizantes artificiais. A exploração de novas linhagens e espécies destes microrganismos é uma promissora ferramenta de inovação no processo produtivo de cerveja.

A aplicação de leveduras não *Saccharomyces* é uma opção viável para resolver essa demanda de mercado. O perfil de produção de compostos voláteis de sabor e aroma de diferentes espécies é distinto daquele apresentado por linhagens de *S. cerevisiae*. Algumas espécies comumente empregadas pertencem ao gênero *Brettanomyces*, e essas leveduras conferem características sensoriais únicas à bebida.

A biodiversidade brasileira constitui uma importante fonte de microrganismos selvagens, que podem trazer características de interesse para a indústria. Dessa forma, explorar estes microrganismos significa novas possibilidades de desenvolvimento de cervejas de alta qualidade e com possibilidades de diversificação sensorial. Portanto estas leveduras não *Saccharomyces* podem contribuir para o desenvolvimento do mercado de cervejas especial

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar e selecionar linhagens de leveduras indígenas não-*Saccharomyces* com potencial para produção de cervejas especiais.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fisiologicamente os isolados ambientais de leveduras não *Saccharomyces* quanto à produção de H₂S, fermentação de maltose, tolerância às condições de estresse intrínsecas do processo de produção;
- Realizar testes fermentativos em escala de bancada para determinação da contagem populacional, consumo de açúcares e produção de metabólitos em cultivo puro destas leveduras e comparar com o cultivo misto com linhagem comercial de *S. cerevisiae*;
- Realizar a produção de cerveja em escala piloto utilizando as melhores linhagens de leveduras não *Saccharomyces*;
- Caracterizar o perfil de compostos voláteis das cervejas produzidas;
- Realizar análise sensorial das cervejas produzidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens

As linhagens utilizadas no estudo pertencem à Coleção de Microrganismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. No total, 150 isolados foram utilizados para triagem. Estes isolados pertencem aos gêneros *Candida*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Starmerella*, *Torulaspota*, *Wickehamomyces*, *Zygossacharomyces* e *Zygotorulaspota*. Estas leveduras foram obtidas a partir dos mais diversos substratos, como chicha, mandioca, flores, madeira, entre outros (Tabela 1). As linhagens comerciais *S. cerevisiae* SafAle™ T58 foi usada como referência nos testes fisiológicos e fermentativos, em conjunto com *S. pastorianus* SafLager W-34/70 (Fermentis) no teste de habilidade de fermentação de maltose.

4.2. Habilidade de fermentação de maltose

As leveduras foram submetidas à análise de habilidade de fermentação de maltose. Para este teste, as leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio (acrescidos de tubos de Durham em seu interior) contendo meio mínimo rico em maltose (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5% e maltose 6%) e incubadas a 20°C por 12 dias. As linhagens positivas para fermentação a 20°C foram, então, submetidas novamente ao mesmo ensaio, porém incubadas a 10°C. A habilidade de fermentação de maltose foi verificada por meio da formação de gás no interior dos tubos de Durham.

Tabela 2. Linhagens e origem das leveduras não *Saccharomyces* submetidas à triagem no presente estudo

(continua)

Código	Identificação	Substrato	Código	Identificação	Substrato
UFMG-CM-Y4924	<i>Candida sake</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4797	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4940	<i>Candida sake</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4826	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4734	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4925	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4741	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4749	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha
UFMG-CM-Y3525	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Água	UFMG-CM-Y4748	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4677	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4939	<i>Pichia kluyveri</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4682	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	UFMG-CM-Y2833	<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4724	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	UFMG-CM-Y1796	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4725	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	UFMG-CM-Y1841	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4721	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	UFMG-CM-Y415	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4722	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	45TA.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4728	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	46TA.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4703	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Chicha	47TA.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4843	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Chicha	NRRCY 27907	<i>Spathaspora passalidarum</i>	
R1CS 22.4	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Casca de árvore	UFMG-CM-Y2565	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4792	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y2569	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4887	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y2594	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4937	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y2601	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4795	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y2607	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4798	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5534	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor
UFMG-CM-Y4801	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5554	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor
UFMG-CM-Y4813	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5563	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor
UFMG-CM-Y4830	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5575	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor
UFMG-CM-Y4826	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5582	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor
UFMG-CM-Y4829	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y5597	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor

Tabela 2. Linhagens e origem das leveduras não *Saccharomyces* submetidas à triagem no presente estudo

(continuação)

Código	Identificação	Substrato	Código	Identificação	Substrato
UFMG-CM-Y4817	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y4743	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4818	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y4745	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4888	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y4753	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mandioca
UFMG-CM-Y4890	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	UFMG-CM-Y4757	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mandioca
UFMG-CM-Y5537	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Flor	UFMG-CM-Y2681	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y5354	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Flor	UFMG-CM-Y2804	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4882	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	UFMG-CM-Y714	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor
UFMG-CM-Y4879	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	UFMG-CM-Y859	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor
UFMG-CM-Y4880	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	UFMG-CM-Y1524	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Fermentado de uva
UFMG-CM-Y4876	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4619	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água do mar
UFMG-CM-Y4040	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Água do mar	UFMG-CM-Y750	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor
UFMG-CM-Y4048	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Areia	UFMG-CM-Y1035	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor
UFMG-CM-Y4885	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	UFMG-CM-Y5714	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor
UFMG-CM-Y3781	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	UFMG-CM-Y4938	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y3795	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	UFMG-CM-Y4763	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y3799	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	UFMG-CM-Y4915	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y3812	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	UFMG-CM-Y4919	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha
UFMG-CM-Y3816	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3822	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C89	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3830	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C59	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3846	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C68	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3848	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C70	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3863	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C110	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3894	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	C102	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y3905	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	UFMG-CM-Y3912	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco

Tabela 2. Linhagens e origem das leveduras não *Saccharomyces* submetidas à triagem no presente estudo

(conclusão)

Código	Identificação	Substrato	Código	Identificação	Substrato
UFMG-CM-Y5067	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	C104	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y5083	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	C117	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y5085	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	C120	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4363	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Areia	C112	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4393	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Areia	BX22B	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço de cana
UFMG-CM-Y4702	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	F7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor
UFMG-CM-Y4789	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	F217	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor
UFMG-CM-Y4790	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	F218	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor
UFMG-CM-Y4796	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	C107	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4800	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	C115	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4839	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4295	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia
UFMG-CM-Y4936	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	MH1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço de cana
UFMG-CM-Y4770	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	MH2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço de cana
UFMG-CM-Y4931	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4245	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia
UFMG-CM-Y4712	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4134	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia
UFMG-CM-Y4874	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	24F.118	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y4868	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	C77	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4921	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	C96	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4891	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	F216	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor
UFMG-CM-Y4906	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	FR13	<i>Wickerhamomyces</i> sp1.	Fruto
UFMG-CM-Y4922	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	C31	<i>Wickerhamomyces</i> sp2.	Casca de árvore
UFMG-CM-Y4923	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG L10	<i>Zigosaccharomyces bailli</i>	
UFMG-CM-Y4920	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4727	<i>Zygotorulaspora florentina</i>	Chicha
UFMG-CM-Y4921	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y6047	<i>Zygotorulaspora</i> sp.	Casca <i>Tapirira guianensis</i>
UFMG-CM-Y4908	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	UFMG-CM-Y4910	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha

4.3. Caracterização fisiológica das leveduras

4.3.1. Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

O teste para verificar a produção de H₂S foi realizado pela utilização de meio diferencial contendo indicador de bismuto Difco *Bismuth Sulfite Agar* (ZAMBONELLI; SOLLI; GUERRA, 1984). Cada levedura foi inoculada em placa de Petri e incubada a 25°C por seis dias em triplicata. A produção de H₂S foi considerada positiva quando houve crescimento de colônias escurecidas em dois dos três testes.

4.3.2. Tolerância à condições de estresse

Para avaliar a tolerância aos fatores de estresse impostos pelo processo fermentativo, as leveduras foram crescidas em diferentes pHs, temperaturas, concentrações de glicose e etanol, de acordo com Belloch e colaboradores (2008), com modificações. Para cada fator de estresse foram testadas as seguintes condições: pH: 2, 3 e 4; glicose: (p/v) 8, 10 e 12%; temperatura: 10, 15, 25, 30, 37°C; e etanol (v/v) 5, 10, 15%. Os meios de cultivo para cada condição de estresse foram preparados utilizando como base o meio YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, glicose 2%, ágar 2%). Alíquotas de 5 µl de cada diluição dos inóculos foram utilizadas. Exceto para testes de temperatura, todos os outros foram incubadas a 25°C.

As leveduras foram previamente crescidas em caldo YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, glicose 2%) por 48 horas a 25°C. Posteriormente, as culturas foram diluídas para uma D.O. de 1 em absorbância 655nm, utilizando água destilada estéril e cinco diluições seriadas foram realizadas. O crescimento das colônias foi avaliado visualmente de 1 a 5 dias. Em todos os casos foi realizado um controle de crescimento positivo com células de levedura que não foram expostas a qualquer condição de estresse e incubadas a 25 °C. Os testes foram realizados em triplicata.

Os dados de crescimento das colônias no ensaio de tolerância a para todas as condições de estresse foram somados para visualização da tolerância global de cada levedura testada. Um teste de Kruskal-Wallis (análise de variância não paramétrico) seguido de múltiplas comparações de Dunn foi realizado comparando-se as pontuações de cada levedura obtidas nos ensaios de caracterização fisiológica vs. a pontuação obtida pela levedura comercial referência *S. cerevisiae* T58 foi realizado.

4.4. Fermentação em escala laboratorial

A fermentação foi feita de acordo com as metodologias descritas por Lopes e colaboradores (2015) e Canonico e colaboradores (2016), com modificações. As leveduras foram submetidas à fermentação em extrato de malte lupulado (*Coopers "86 days pilsner"*) ajustado para 12°BRX e pH 5,5. A fermentação com cultivo puro de *S. cerevisiae* (SafAle™ T58) e para as leveduras não *Saccharomyces* ou para cultivos mistos, nas proporções 1:1 e 1:10 de *S. cerevisiae* para levedura não *Saccharomyces*, foram feitas em frasco Erlenmeyer de 200 mL com volume de 100 mL de mosto. O inóculo das leveduras foi ajustado para 10^6 células.mL⁻¹ por meio, sendo as contagens determinadas com auxílio de câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em duplicata, e alíquotas foram retiradas a cada 24 horas até completar-se 168 horas de fermentação. A detecção e quantificação dos metabólitos produzidos (etanol, glicerol e ácidos acético) e carboidratos foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão).

Para determinação da cinética populacional durante a fermentação foi retirada uma alíquota de 100 µl do cultivo e realizado diluições seriadas até atingir diluições de 10⁻⁵. As diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram inoculadas em duplicata em placas contendo meios de cultura YM (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%, cloranfenicol 0,01%) e ágar lisina (YCB 1,17%, lisina 0,056%, ágar 2%, cloranfenicol 0,01%). O número de unidades formadoras de colônia.mL⁻¹ (UFC.mL⁻¹) foi estimado contando-se o número total de colônias das placas que apresentaram crescimento entre 30 e 300.

O valor de UFC.mL⁻¹ obtido nas placas contendo meio YM representa a população total nos cultivos, o valor obtido nas placas de ágar lisina representa a população de leveduras não *Saccharomyces*. A diferença entre as contagens obtidas nos meios YM e ágar lisina representa a população de *S. cerevisiae*.

4.5. Produção em escala piloto

As linhagens selecionadas foram utilizadas, então para produção de cerveja em escala piloto. A produção consistiu em bateladas de 40 litros, que foram realizadas nas instalações do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do ICB (UFMG) utilizando o método de 3 painéis. Um mosto de *Belgian*

Blonde Ale foi elaborado de acordo com as características descritas para o estilo no guia de estilos produzido pelo *Beer Judge Certification Program* – BJCP (figura 5). Para produção de 40 litros de cerveja foram utilizados 9 kg de malte *pilsner*, 1 kg de malte *munich*, 0,5 kg de malte *biscuit*, 50 g de lúpulo *Styrian Golding* (amargor) e 50 g de lúpulo *Saaz* (aroma).

Vinte e oito litros de água foram aquecidos a 74°C. Os maltes moídos foram adicionados e a mostura foi mantida a 67°C por 90 minutos, período durante o qual o mosto foi recirculado, propiciando a clarificação do líquido. Após sacarificação, a mostura foi aquecida a 76°C por 10 minutos para total inativação das enzimas do malte (*mash out*). O mosto obtido (mosto primário) foi transferido para a panela de fervura e a cama de bagaço resultante foi lavada com 35 litros de água a 76°C para máxima extração dos açúcares ainda retidos no bagaço.

O mosto obtido foi submetido à fervura vigorosa por 60 minutos, para redução da carga microbiana, volatilização de DMS (dimetil sulfeto), coagulação de proteínas e conversão dos alfa-ácidos do lúpulo. Cinco minutos após início da fervura, o lúpulo de amargor foi adicionado. Cinquenta minutos após o início da fervura, foi adicionado 1 kg de açúcar de cana e faltando 2 minutos para o fim da fervura o lúpulo de aroma foi adicionado. A densidade do mosto foi expressa em gravidade específica e aferida através de um refratômetro. Após fervura, foi executado o *whirlpool*, onde o mosto é agitado circularmente para permitir que as proteínas coaguladas durante a fervura e a biomassa de lúpulo precipitem ao fundo da panela por força centrípeta, impedindo que esse precipitado seja transferido para a etapa de fermentação. O mosto obtido foi resfriado com auxílio de um *chiller* até a temperatura de 25°C.

Condução da mostura

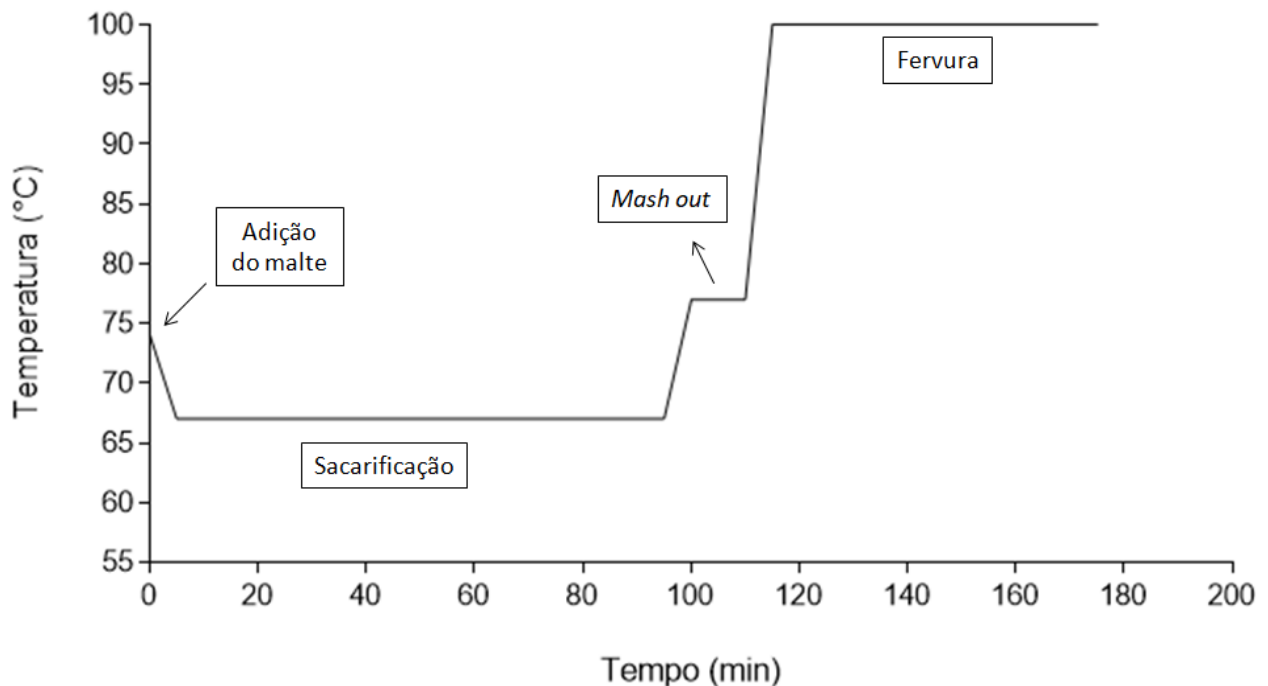


Figura 5. Esquema das etapas da mostura para produção de cerveja em escala piloto.

O mosto frio foi dividido em quatro baldes de fermentação previamente sanitizados com solução de ácido peracético (PAC 200) preparado conforme indicação do fabricante. Cada um dos baldes de fermentação foi inoculado com quatro preparações independentes de fermento: levedura controle *S. cerevisiae* comercial (linhagem T58) em cultivo puro; levedura não *Saccharomyces* em cultivo puro; cultivo misto entre *S. cerevisiae* comercial e não *Saccharomyces* na proporção 1:1 (levedura não *Saccharomyces*:*S. cerevisiae* comercial); e cultivo misto entre *S. cerevisiae* comercial e levedura não *Saccharomyces* na proporção de 1:10 (levedura não *Saccharomyces*:*S. cerevisiae* comercial).

O inóculo de leveduras foi preparado anteriormente à brassagem. As leveduras teste e controle foram reativadas a partir de tubos de preservação de longo prazo em meio de cultivo YM. Após crescimento, foram reinoculadas em novas placas contendo YM, formando uma camada uniforme por toda a superfície do meio, e incubadas por 48h a 25°C. Após incubação, todo o crescimento celular foi raspado com auxílio de uma alça e inoculado em 100 mL de mosto produzido a partir de DME (extrato de malte seco), ajustado para 10 °Plato e incubadas em agitação (150 rpm) a 25°C por 24 horas. A totalidade deste cultivo foi adicionada a 900 mL de um novo mosto, desta

vez ajustado para 13°P, e incubado nas mesmas condições. A partir deste pré-inóculo, foi montado um inóculo ajustado para 10^6 células.mL⁻¹ para adição nos baldes de fermentação contendo 10 litros de mosto da cerveja piloto. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer.

O mosto inoculado foi mantido a 18°C em estufa BOD até atenuação adequada da cerveja ou no máximo sete dias. A concentração de açúcares foi aferida diariamente com auxílio de um densímetro. Após fermentação, a cerveja verde foi maturada durante três semanas a 1°C. O envase se deu em garrafas âmbar sanitizadas e a carbonatação foi feita por meio de adição de *priming* na concentração de 6 g/L. As cervejas recém envasada foram mantidas a 22°C por sete dias para permitir fermentação dos açúcares do *priming* e incorporação de CO₂ na bebida. Após carbonatação a cerveja foi armazenada a 4°C até realização de análise sensorial. A concentração de álcool por volume (ABV) obtido em cada cerveja foi calculado teoricamente pela aplicação da equação $ABV = \left(\frac{OG-FG}{0,75} \right) * 100$.

Alíquotas do mosto e da cerveja finalizada foram coletadas para determinação de consumo de açúcares, produção de etanol, ácido acético, glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e perfil de compostos voláteis por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS) e mantidas em freezer a -20°C até o momento da análise. A concentração real de álcool foi determinada pela equação

$$ABV \text{ real} = \frac{\left(\frac{[EtOH \frac{g}{L}]}{0,79} \right) * 100}{1000}.$$

4.6. Análises cromatográficas

4.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os conteúdos de açúcares, etanol, glicerol e ácidos orgânicos do mosto e das amostras de cerveja foram analisados por CLAE. Para isto, amostras de um mL do mosto ou do cultivo foram previamente filtradas em membrana de acetato celulose 0,22 µm e D13 mm (Sartorius) e analisadas de acordo com metodologia descrita por Montandon (2016) em cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu, Japão), acoplado a dois detectores, índice de refração RID 10-A e um detector UV-visível. Os conteúdos de açúcares, etanol, glicerol e ácido acético do mosto e das amostras dos ensaios fermentativos foram analisados por CLAE. Foram utilizadas as seguintes condições:

coluna Supelcogel™ C-610H HPLC Column (30 cm x 7,8 mm) (Sigma-Aldrich), mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 10-A; fase móvel H₂SO₄ 5 mM e fluxo de 0,6 mL.minuto⁻¹.

4.6.2. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas

O perfil de compostos voláteis produzidos durante fermentação foi analisado por cromatografia gasosa por microextração em fase sólida por *headspace* e detecção por espectrometria de massas (HS-SPME-GC/FID), como descrito por Li e colaboradores (2005). Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado Shimadzu QP2010 (Shimadzu, Japão) e coluna capilar HP INNOWAX 60m x 0,25m a temperatura de 40°C.

As amostras foram preparadas em *vials* de 20 mL, com septo de silicone. Cinco mL da amostra foram aliqüotados nos *vials* e 1,5 g de NaCl e 25 µL de 5-nonanol 0,001% (padrão interno) foram adicionados à amostra. A mistura foi incubada a 40°C por 30 minutos para volatilização dos compostos até o ponto de equilíbrio entre os compostos voláteis no líquido e na fase gasosa. O septo foi perfurado por uma agulha e a fibra de poliacrilato para SPME foi exposta no *headspace* por 30 minutos, para permitir adsorção dos compostos voláteis da amostra. A fibra foi, então, injetada no cromatógrafo gasoso com fluxo de gás hélio a 1 mL/min a temperatura de 250°C e exposta por 5 minutos, para permitir dessorção completa dos compostos voláteis.

A partir dos cromatogramas obtidos, para cada cerveja analisada, foi gerada arbitrariamente uma lista com os 50 compostos voláteis mais abundantes. Posteriormente, uma matriz de frequência foi construída para cada brassagem individual a partir dos compostos encontrados nas amostras.

Previamente, uma lista com os 20 compostos voláteis mais relevantes para cerveja (tabela 1) foi determinada de acordo com literatura e, a partir do relatório de 50 compostos mais abundantes em cada amostra, verificou-se a presença ou ausência destes compostos relevantes nas cervejas obtidas. A partir da área sob o pico dos compostos voláteis de interesse (tabela 1) e a área sob o pico do padrão interno 5-nonanol em cada amostra, foram determinadas as quantidades relativas destes compostos. Primeiramente, a área sob o pico do composto foi dividida pela área sob o pico do padrão interno e após a aplicação desta divisão para todos os compostos de interesse presentes na amostra, a relação obtida para cada um foi dividida pela soma de todas as relações calculadas. Dessa forma, foi possível, além

de determinar presença e ausência dos compostos nas amostras, comparar as quantidades relativas entre elas. Informações sobre os compostos voláteis e descritores sensoriais foram obtidos através de PubChem, The Good Scents Company e Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA). Para cada levedura não *Saccharomyces* testada, foi realizada uma análise de componentes principais a partir das quantidades relativas dos 20 compostos voláteis mais importantes seguida de agrupamento hierárquico.

4.7. Análise sensorial

Os testes sensoriais foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor (LASEC) da FAFAR e tiveram como público alvo a comunidade da UFMG, de ambos os gêneros e com idade entre 18 e 65 anos. O recrutamento dos participantes para os testes sensoriais foi realizado por meio de convite divulgado na comunidade da FAFAR e ICB/UFMG, extensivo a todos os professores, funcionários e alunos que façam a ingestão de bebidas alcoólicas. Cada análise sensorial foi realizada com o mínimo de 60 provadores.

Testes de aceitação e intenção de compra foram realizados com a cerveja produzida. A aceitação das bebidas foi avaliada quanto a atributos de aparência (cor), aroma (aroma característico das bebidas), sabor (sabor característico das bebidas), carbonatação, corpo e impressão global (aparência, aroma, sabor e corpo em conjunto) por meio de fichas graduadas em uma escala de 1 a 7, onde 1 representa menor aceitação e 7 maior aceitação. A intenção de compra das cervejas desenvolvidas foi avaliada por meio de uma escala de atitude estruturada de cinco pontos, onde 1 representa a menor intenção de compra e 5 a maior.

As amostras de cerveja foram mantidas refrigeradas a 4°C até o momento da análise e foram fornecidas aos provadores em taças de vidro com o volume de 25 mL por amostra. Cada provador recebeu os quatro tratamentos produzidos em cada brassagem individual. As amostras foram apresentadas balanceadas e codificadas. Cada provador recebeu um conjunto individual de códigos, para evitar que informações fossem trocadas entre provadores.

Os provadores foram acomodados em bancadas individuais isoladas e receberam três fichas: termo de consentimento livre e esclarecido, questionário socioeconômico e ficha de avaliação das amostras (Anexos A, B e C). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Pró-Reitoria de Pesquisa da

UFMG e aprovado sob o n ° de registro 79241317.3.0000.5149. Após o preenchimento do TCLE e do questionário, as amostras foram apresentadas aos provedores, que eram orientados a prová-las na ordem fornecida, da direita para a esquerda, tomando água em temperatura ambiente entre cada uma delas.

4.8. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 7.0 e MatLAB R2010a.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Habilidade de fermentação de maltose

Tabela 2 mostra o desempenho de cada levedura testada quanto a habilidade de fermentação de maltose a 20 e 10 °C. Os números presentes na coluna “dias” se referem ao primeiro dia onde se observou preenchimento total do tubo de Durham por gás. As leveduras que apresentaram resultados positivos para fermentação de maltose nas duas temperaturas e com tempo não superior ao dobro das referências comerciais foram selecionadas para caracterização fisiológica. Das 150 leveduras testadas, apenas 53 foram capazes de fermentar o açúcar. Dessas, apenas 21 em ambas as temperaturas. Leveduras com as melhores habilidades fermentativas pertenciam principalmente às espécies *Torulaspora delbrueckii* e *Starmerella meliponinorum*.

A habilidade de fermentação de maltose é uma ferramenta chave na seleção de novas linhagens de *S. cerevisiae* para o processo produtivo de cerveja (MONTANDON, 2016), pois a maltose é o açúcar mais importante do mosto cervejeiro, perfazendo de 50 a 60% do total de açúcares disponíveis. Desta forma, no presente trabalho, o critério foi adotado como parâmetro inicial para seleção.

As linhagens cervejeiras fermentaram rapidamente a maltose (48 h a 20°C e 120 h a 10°C). Exceto a linhagem UFMG-CM-Y2681 de *T. delbrueckii*, que fermentou maltose em 96 h a 10°C, todas as outras linhagens positivas para a fermentação da maltose fermentaram em maior tempo que as linhagens comerciais em uma ou ambas as temperaturas testadas. Vinte e uma leveduras (14%) testadas foram capazes de fermentar nas duas temperaturas, porém apenas 16 (10,6%) cumpriram o requisito de seleção (apresentaram resultados positivos para fermentação de maltose nas duas temperaturas e com tempo não superior ao dobro das referências comerciais) e avançaram para a próxima etapa.

Das leveduras positivas para ambas as temperaturas, apenas uma linhagem não pertence às espécies *S. meliponinorum* ou *T. delbrueckii*, sendo esta um isolado de *Zygotorulaspora florentina*. Dentre os isolados de *T. delbrueckii* testados, a capacidade de fermentação de maltose foi variável, com performances melhores ou iguais as leveduras comerciais ou até total ausência de fermentação. Isso pode indicar que a habilidade de fermentação da maltose é dependente da linhagem para essa

espécie. Essa característica foi observada também em *S. cerevisiae* (MONTANDON, 2016), tão largamente utilizada nos processos produtivos de bebidas alcoólicas.

Canonico e colaboradores (2016) avaliaram 28 isolados de *T. delbrueckii* para produção de cerveja. Testes iniciais de fermentação de maltose com tubo de Durham foram utilizados como seleção inicial por estes autores. Destas 28 linhagens, apenas oito foram capazes de fermentar o açúcar e testes posteriores em mosto cervejeiro indicaram parâmetros fermentativos inferiores à *S. cerevisiae* comercial.

Tabela 3. Capacidade de fermentação da maltose a 10° C e 20° C por leveduras não *Saccharomyces* testadas no presente trabalho (continua)

Código	Espécie	Substrato	20°C	Dias	10°C	Dias
W3470	<i>S. pastorianus</i>	Industrial	+	2	+	5
T58	<i>S. cerevisiae</i>	Industrial	+	2	+	5
UFMG-CM-Y2681	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Madeira em decomposição	+	2	+	4
UFMG-CM-Y4922	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	6
UFMG-CM-Y4789	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	8
UFMG-CM-Y4790	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	8
UFMG-CM-Y4796	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	8
UFMG-CM-Y4743	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	8
UFMG-CM-Y4908	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	10
UFMG-CM-Y4910	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	10
UFMG-CM-Y4757	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mandioca	+	2	+	10
UFMG-CM-Y4753	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mandioca	+	2	+	10
UFMG-CM-Y 4920	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	12
UFMG-CM-Y4839	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	12
UFMG-CM-Y4874	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	+	12
UFMG-CM-Y4745	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	3	+	4
UFMG-CM-Y5534	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	3	+	5
UFMG-CM-Y5554	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	3	+	5
UFMG-CM-Y5575	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	3	+	5
UFMG-CM-Y4727	<i>Zygotorulaspora florentina</i>	Chicha	+	3	+	8
UFMG-CM-Y5582	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	3	+	9
UFMG-CM-Y5563	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	4	+	11
UFMG-CM-Y5597	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Flor	+	4	+	12
UFMG-CM-Y4702	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4800	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4936	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4770	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4868	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4906	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4921	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4677	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y6047	<i>Zygotorulaspora sp.</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	+	3	-	-
UFMG-CM-Y4763	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	3	-	-
UFMG-CM-Y4915	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	3	-	-
UFMG-CM-Y4919	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	3	-	-
UFMG-CM-Y4924	<i>Candida sake</i>	Chicha	+	3	-	-
UFMG-CM-Y4940	<i>Candida sake</i>	Chicha	+	4	-	-
UFMG-CM-Y4938	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	+	4	-	-
C70	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	+	4	-	-
C102	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	+	5	-	-
C68	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	+	5	-	-

Tabela 3. Capacidade de fermentação da maltose a 10° C e 20°C por leveduras não *Saccharomyces* testadas no presente trabalho (continuação)

Código	Espécie	Substrato	20°C	Dias	10°C	Dias
NRRCY 27907	<i>Spathaspora passalidarum</i>		+	5	-	-
UFMG-CM-Y4393	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Areia	+	5	-	-
C99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
C89	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
C117	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
C120	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
F218	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
MH1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço cana	+	5	-	-
CLQCA 24F.118	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Madeira em decomposição	+	5	-	-
C77	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	+	5	-	-
UFMG-CM-Y4741	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Chicha	+	5	-	-
UFMG-CM-Y3525	<i>Dekkera bruxelensis</i>	Água	+	5	-	-
UFMG-CM-Y4712	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Chicha	+	2	-	-
UFMG-CM-Y4682	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4724	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4725	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4721	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4722	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4728	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4703	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4843	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Chicha	-	-	-	-
R1CS 22.4	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Casca de árvore	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4792	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4887	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4937	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4795	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4798	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4801	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4813	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4830	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y 4826	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4829	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4817	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4818	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4888	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4890	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5537	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5354	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4882	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4879	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	-	-	-	-
C110	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	-	-	-	-

Tabela 3. Capacidade de fermentação da maltose a 10° C e 20°C por leveduras não *Saccharomyces* testadas no presente trabalho (continuação)

Código	Espécie	Substrato	20°C	Dias	10°C	Dias
UFMG-CM-Y4880	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4876	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4040	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Água do mar	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4048	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Areia	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4885	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4797	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4826	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4925	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4749	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4748	<i>Pichia fermentans</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4939	<i>Pichia kluyveri</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2833	<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y1796	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y1841	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y415	<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
45TA.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
46TA.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
47TA.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2565	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2569	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2594	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2601	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2607	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y2804	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Madeira em decomposição	-	-	-	-
UFMG-CM-Y714	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y859	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y1524	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Fermentado de uva	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4619	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água do mar	-	-	-	-
UFMG-CM-Y750	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor	-	-	-	-
C104	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	-	-	-	-
C59	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4891	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4931	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	-	-	-	-
MH2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço de cana	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4245	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4134	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia	-	-	-	-
C96	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca Tapirira guianensis	-	-	-	-
F216	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor	-	-	-	-
FR13	<i>Wickerhamomyces</i> sp1.	Fruto	-	-	-	-
C31	<i>Wickerhamomyces</i> sp2.	Casca de árvore	-	-	-	-
UFMG L10	<i>Zigosaccharomyces bailli</i>		-	-	-	-

Tabela 3. Capacidade de fermentação da maltose a 10° C e 20°C por leveduras não *Saccharomyces* testadas no presente trabalho (continuação)

Código	Espécie	Substrato	20°C	Dias	10°C	Dias
UFMG-CM-Y4923	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Chicha	-	-	-	-
BX22B	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bagaço de cana	-	-	-	-
F7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor	-	-	-	-
F217	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Flor	-	-	-	-
C107	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	-	-	-	-
C115	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca <i>Tapirira guianensis</i>	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4295	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Areia	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4734	<i>Dekkera anomala</i>	Chicha	-	-	-	-
UFMG-CM-Y1035	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5714	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Flor	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3781	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3795	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3799	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3812	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3816	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3822	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3830	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3846	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3848	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3863	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3894	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3905	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y3912	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Água de coco	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5067	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5083	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	-	-	-	-
UFMG-CM-Y5085	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Suco de laranja	-	-	-	-
UFMG-CM-Y4363	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Areia	-	-	-	-
C112	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Casca de Tapirara	-	-	-	-

Números presentes na coluna 'dias' representam o primeiro dia em que se observou o preenchimento total do tubo de Durham por gás.

5.2. Caracterização fisiológica das leveduras

A partir do resultado do ensaio de fermentação de maltose, 16 leveduras foram selecionadas para caracterização fisiológica (tabela 4). Apenas as linhagens de *S. meliponinorum* não produziram sulfeto de hidrogênio. Eder e colaboradores (2018), ao avaliarem a diferença entre populações indígenas de duas variedades de uvas de uma mesma região geográfica, constataram que a produção de H₂S por *Starmerella bacillaris* foi a mais consistente. Os autores mostraram que esta espécie produziu níveis mais elevados do metabólito em comparação com *S. cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum*. Aponte e Blaiotta (2016), ao avaliarem fisiologicamente espécies de leveduras não *Saccharomyces* para produção de vinho, observaram uma alta produção de H₂S por um isolado de *S. bacillaris*. A espécie *S. bacillaris* foi a única do gênero avaliada quanto à produção de sulfeto de hidrogênio no contexto de produção de bebidas fermentadas.

Apesar de apenas quatro isolados de *S. meliponinorum* terem sido testados no presente trabalho, nenhum produziu sulfeto de hidrogênio. Essa característica é conhecidamente variável entre linhagens de *S. cerevisiae* (MONTANDON, 2016), dessa forma, para se determinar de maneira mais abrangente o perfil de produção de sulfeto de hidrogênio por *S. meliponinorum* é necessário que o ensaio seja realizado com um maior número de isolados da espécie.

Os estudos que avaliam a contribuição de *T. delbrueckii* na produção de cerveja não exploram a produção de sulfeto de hidrogênio, mas como pôde ser observado no presente trabalho, todas as linhagens testadas da espécie produziram o composto. Assim como para *S. meliponinorum*, mais testes são necessários para avaliar a produção de sulfeto de hidrogênio por *T. delbrueckii* como espécie, pois poucos isolados foram avaliados no presente trabalho.

Os dados de crescimento das colônias no ensaio de tolerância à condições de estresse foram somados. A levedura comercial *S. pastorianus* W34/70, utilizada na produção de cervejas *Lager*, apresentou o pior desempenho no teste de tolerância à condições de estresse, somando 24 pontos. A levedura *Ale S. cerevisiae* T58 somou 45. Apenas duas linhagens de *T. delbrueckii* pontuaram acima deste valor: UFMG-CM-Y4757 e UFMG-CM-Y4753, com 46 e 49 pontos, respectivamente. Nenhuma das leveduras apresentou diferença estatística significativa quando comparada com a levedura *S. cerevisiae* comercial T58 (tabela 5).

As condições de estresse testadas no presente trabalho foram adaptadas para as variações enfrentadas por leveduras durante a produção de cerveja. O mosto cervejeiro pode possuir de aproximadamente 5 a 12% de açúcares, alcançar pHs de até 2,5 (no caso de cervejas ácidas produzidas por *kettle sour*) e concentrações de etanol de até 15% nas cervejas mais extremas. A levedura *Lager S. pastorianus* apresentou o score mais baixo de tolerância à condições de estresse. Para as variações de temperatura e concentração de etanol, este resultado corrobora o encontrado por Belloch e colaboradores (2008), que observaram um menor desempenho de *S. pastorianus*, levedura *Lager*, nessas condições quando comparada à *S. cerevisiae*, levedura *Ale*. Porém, difere no que se refere às variações de glicose e pH, onde *S. pastorianus* não teve seu crescimento afetado pelas condições de estresse.

Mukherjee e colaboradores (2017) realizaram um estudo de triagem de alto desempenho com o objetivo de traçar um panorama do fenótipo à tolerância ao estresse de várias leveduras não tradicionais para a aplicação em produção de bioetanol. A metodologia de avaliação adotada foi diferente da utilizada no presente trabalho, porém, dentre as leveduras testadas, *T. delbrueckii* foi osmotolerante (crescimento em 60% de glicose) e resistente a etanol (crescimento em 13% de etanol). No presente trabalho, foi possível observar a resistência ao etanol para os isolados de *T. delbrueckii*, porém altas concentrações de glicose prejudicaram o crescimento de todas as leveduras submetidas ao ensaio, inclusive as linhagens comerciais.

As linhagens de *S. meliponinorum* caracterizadas no presente trabalho apresentaram perfis variáveis de tolerância à condições de estresse. A linhagem UFMG-CM-Y5575 apresentou resultado muito semelhante à *S. cerevisiae* comercial, já a linhagem UFMG-CM-Y5534 apresentou o desempenho mais baixo entre todas as testadas. O crescimento das leveduras desta espécie foi principalmente prejudicado por condições adversas de pH e altas concentrações de glicose. Durante uma triagem para produção de bebidas a partir de leveduras isoladas de abelhas, Silva e colaboradores (2019) avaliaram, entre outras leveduras (*S. cerevisiae*, *Papilotrema flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida apícola*), nove isolados de *S. meliponinorum*. Estes isolados, entretanto, não foram considerados promissores, pois não apresentaram boa performance (pelo menos 50% da D.O. (densidade ótica) registrada para o crescimento da levedura comercial adotada como referência) no

teste de seleção preliminar de tolerância às condições de estresse (condições adotadas foram etanol 4% (v/v), glicose 20% (m/v) e teste cruzado, onde as duas condições foram aplicadas simultaneamente. Nenhuma outra espécie testada foi capaz de atingir crescimento igual ao apresentado por *S. cerevisiae* comercial, mas as melhores performances foram observadas para linhagens de *S. cerevisiae*, sendo as únicas consideradas promissoras dos isolados testados. Até o momento, o trabalho de Silva e colaboradores havia sido o único a utilizar leveduras desta espécie para triagem para utilização na produção de bebidas alcoólicas.

Resultados da análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn são mostrados no ANEXO D. Dado a ausência de diferença significativa entre as leveduras não *Saccharomyces* e a linhagem comercial e, sendo a não produção de H₂S uma característica desejável, porém não determinante para a exclusão da levedura, foram selecionadas para a próxima etapa das análises todas as leveduras que não produziram sulfeto de hidrogênio e as que apresentaram desempenho maior ou igual à levedura *S. cerevisiae* comercial T58 no ensaio de tolerância às condições de estresse. Foram elas: UFMG-CM-Y2681, UFMG-CM-Y4757, UFMG-CM-Y4753, pertencentes à espécie *T. delbrueckii*; e UFMG-CM-Y5534, UFMG-CM-Y5582, UFMG-CM-Y5554 e UFMG-CM-Y5575, pertencentes à espécie *S. meliponinorum*. A levedura *Zygorhynchus florentina*, única não pertencente a estas duas espécies, apesar de fermentar em ambas as temperaturas, não se encaixou nos critérios de seleção adotados e não seguiu adiante nas análises posteriores.

Tabela 4. Produção de H₂S e tolerância às condições de estresse testadas (pH, etanol, concentrato de glicose e temperatura) por leveduras não *Saccharomyces* utilizadas no presente trabalho.

Levedura	Espécie	Produção de H ₂ S	Tolerância a condições de estresse*													Soma crescimento em condições de estresse**	
			pH			Etanol (% v/v)			Glicose (% p/v)			Temperatura (°C)					
			2	3	4	5	10	15	8	10	12	10	15	25	30	37	
W3470	<i>S. pastorianus</i>	-	0	1	1	3	2	1	1	1	1	3	2	5	1	0	24
T58	<i>S. cerevisiae</i>	+	0	2	2	5	5	4	2	2	2	5	5	5	4	2	45
UFMG-CM-Y4753	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	6	5	5	2	2	2	5	5	6	4	3	49
UFMG-CM-Y4757	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	5	5	4	2	2	2	4	5	6	4	3	46
UFMG-CM-Y2681	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	3	6	5	3	2	2	2	6	6	6	3	0	45
UFMG-CM-Y4743	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	5	5	4	2	2	2	5	5	5	3	1	44
UFMG-CM-Y4745	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	6	5	4	2	2	1	5	5	6	3	1	44
UFMG-CM-Y5575	<i>Starmerella meliponinorum</i>	-	2	2	2	5	4	3	2	2	2	5	5	5	3	0	43
UFMG-CM-Y4908	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	5	4	3	2	2	2	6	4	6	3	0	41
UFMG-CM-Y5554	<i>Starmerella meliponinorum</i>	-	1	2	2	5	4	2	2	2	2	4	4	5	3	1	40
UFMG-CM-Y4796	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	3	5	4	3	2	2	2	4	4	6	3	0	39
UFMG-CM-Y4910	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	4	3	3	2	2	2	6	3	6	3	0	38
UFMG-CM-Y4790	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	4	4	3	2	2	2	4	4	6	3	1	38
UFMG-CM-Y4922	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	5	4	3	2	2	2	4	3	6	3	1	37
UFMG-CM-Y4789	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	0	2	2	4	3	2	2	2	2	5	4	6	3	0	36
UFMG-CM-Y5582	<i>Starmerella meliponinorum</i>	-	2	2	2	4	2	2	2	2	2	4	4	5	3	0	35
UFMG-CM-Y4727	<i>Zygorulaspora florentina</i>	+	1	2	2	3	3	2	2	2	2	4	4	5	2	0	34
UFMG-CM-Y5534	<i>Starmerella meliponinorum</i>	-	1	2	2	3	2	2	2	2	2	3	4	4	3	0	31

*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.

**Os dados de crescimento das colônias no ensaio de tolerância a para todas as condições de estresse foram somados para visualização da tolerância global de cada levedura testada.

5.3. Fermentação em escala laboratorial

As linhagens de *S. meliponinorum* testadas no presente trabalho tiveram comportamentos distintos em relação ao consumo de açúcares: UFMG-CM-Y5582 (figura 9) foi a única que não assimilou completamente a maltotriose, ao contrário de UFMG-CM-Y5534, UFMG-CM-Y5575 e UFMG-CM-Y5554 (figuras 6,12 e 15, respectivamente) que foram capazes de assimilar totalmente este açúcar. O consumo de maltose não pôde ser determinado para as linhagens UFMG-CM-Y5554, UFMG-CM-Y5575 e UFMG-CM-Y5582 (figuras 15,12 e 9, respectivamente) Para estas linhagens, os picos no tempo de retenção da maltose, obtidos por cromatografia líquida, apresentaram a formação de um ombro, uma distorção cromatográfica. Essa distorção deslocou o pico, impedindo a leitura do analíto. A formação de ombros nos picos pode estar associada a defeitos na coluna utilizada, mas se este for o caso, todos os picos da amostra devem apresentar esta distorção, o que não foi observado neste trabalho. Outra causa possível é a interferência de outros componentes na amostra, onde o composto esperado é coeluído com um componente desconhecido na amostra (NETO, 2010), sendo essa a aparente causa da distorção do pico de maltose nas presentes análises.

S. meliponinorum UFMG-CM-Y5534 foi a levedura que produziu as menores quantidades de etanol quando em cultivo puro, mesmo atenuando completamente os açúcares do mosto (figura 7). Esta linhagem produziu quantidades intermediárias de glicerol (6,6 g/L) em comparação com as demais linhagens testadas. Essa característica pode ser interessante para a produção de bebidas de baixo teor alcoólico (LEMOS JÚNIOR et al, 2019). Todas as linhagens de *S. meliponinorum* testadas no presente trabalho apresentaram declínio populacional em fermentações mistas com *S. cerevisiae*. Englezos e colaboradores (2018) avaliaram o impacto de fermentações mistas sequenciais de *S. bacillaris* e *S. cerevisiae*. O cultivo misto apresentou níveis mais altos de glicerol e rendimento de álcool semelhante ao cultivo puro com *S. cerevisiae*. Quanto à dinâmica populacional, os níveis de *S. bacillaris* decaíram após o inóculo de *S. cerevisiae*. Apesar de ter sido realizado com outra espécie do gênero, os resultados obtidos por estes autores foram similares ao observado no presente trabalho para as linhagens de *S. meliponinorum* testadas (figuras 8, 11, 14 e 17).

As linhagens de *T. delbrueckii* testadas no presente trabalho apresentaram menor consumo de maltose quando em comparação com as linhagens de *S.*

meliponinorum estudadas. *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 (figura 18) não consumiu maltorrose, diferentemente das linhagens UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757 (figuras 21 e 24, respectivamente). A produção de etanol dessas leveduras foi menor que o observado para as linhagens de *S. meliponinorum* (figuras 19, 22 e 25). Canonico e colaboradores (2016) avaliaram a produção de cerveja com cultivos mistos de *T. delbrueckii* nas proporções 1:1, 1:10 e 1:20 de *Saccharomyces cerevisiae*:*Torulaspota delbrueckii*. Para o cultivo na proporção 1:1, a dinâmica populacional observada indicou um aumento da população de ambas as leveduras nos primeiros 4 dias de fermentação e ligeiro declínio nas contagens até o 7º dia. Para a proporção de 1:10, observou-se um aumento em ambas as populações até o sétimo dia de fermentação. Estes resultados são similares ao comportamento observado para as fermentações conduzidas por *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 no presente trabalho (figura 20). Já para as linhagens UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757 (figuras 23 e 26, respectivamente), observa-se um cenário ligeiramente diferente. Em ambas as proporções, as populações de *T. delbrueckii* apresentam aumento na contagem nas primeiras 24 horas da fermentação e mantiveram os números até o final da fermentação de 7 dias. Este comportamento também foi observado para a linhagem comercial de *S. cerevisiae*, com apenas um ligeiro declínio nas últimas 48 h do ensaio.

Canonico e colaboradores (2016) também observaram que a fermentação conduzida apenas com *T. delbrueckii* continha 35 g/L de maltose residual (contra 64 g/L presente no mosto inicial) e uma produção de etanol bem menor que o controle com *S. cerevisiae* puro e cultivos mistos (2,66% para *T. delbrueckii* pura; 4,51% para 1:1; e 4,68% para 1:10). Esse comportamento também pode ser observado no presente trabalho, em especial para linhagem UFMG-CM-Y2681, que apresentou um residual de maltose de 35 g/L em cultivo puro e produziu 38 g/L (4,5%) de etanol. A linhagem comercial de *S. cerevisiae* consumiu quase toda a maltose (apenas 2,1 g/L de maltose residual) com produção de 57 g/L (7%) de etanol. É interessante notar que os valores de etanol encontrados no presente trabalho são maiores do que os observados para a linhagem de *T. delbrueckii* avaliada por Canonico e colaboradores (2016).

5.3.1. *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534

Starmerella meliponinorum UFMG-CM-Y5534 foi capaz de consumir de maneira mais expressiva o açúcar maltotriose (residual de aproximadamente 1 g/L para os três tratamentos contendo UFMG-CM-Y5534 e 5,5 g/L para controle *S. cerevisiae*). A linhagem UFMG-CM-Y5534 consumiu praticamente igual quantidade de maltose do que a *S. cerevisiae* comercial (aproximadamente 2,5 g/L residuais para todos os tratamentos). O residual de glicose ao final dos sete dias (10 g/L) é maior na fermentação conduzida por UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro que nos outros tratamentos (0,5 g/L), assim como observado para frutose (figura 6).

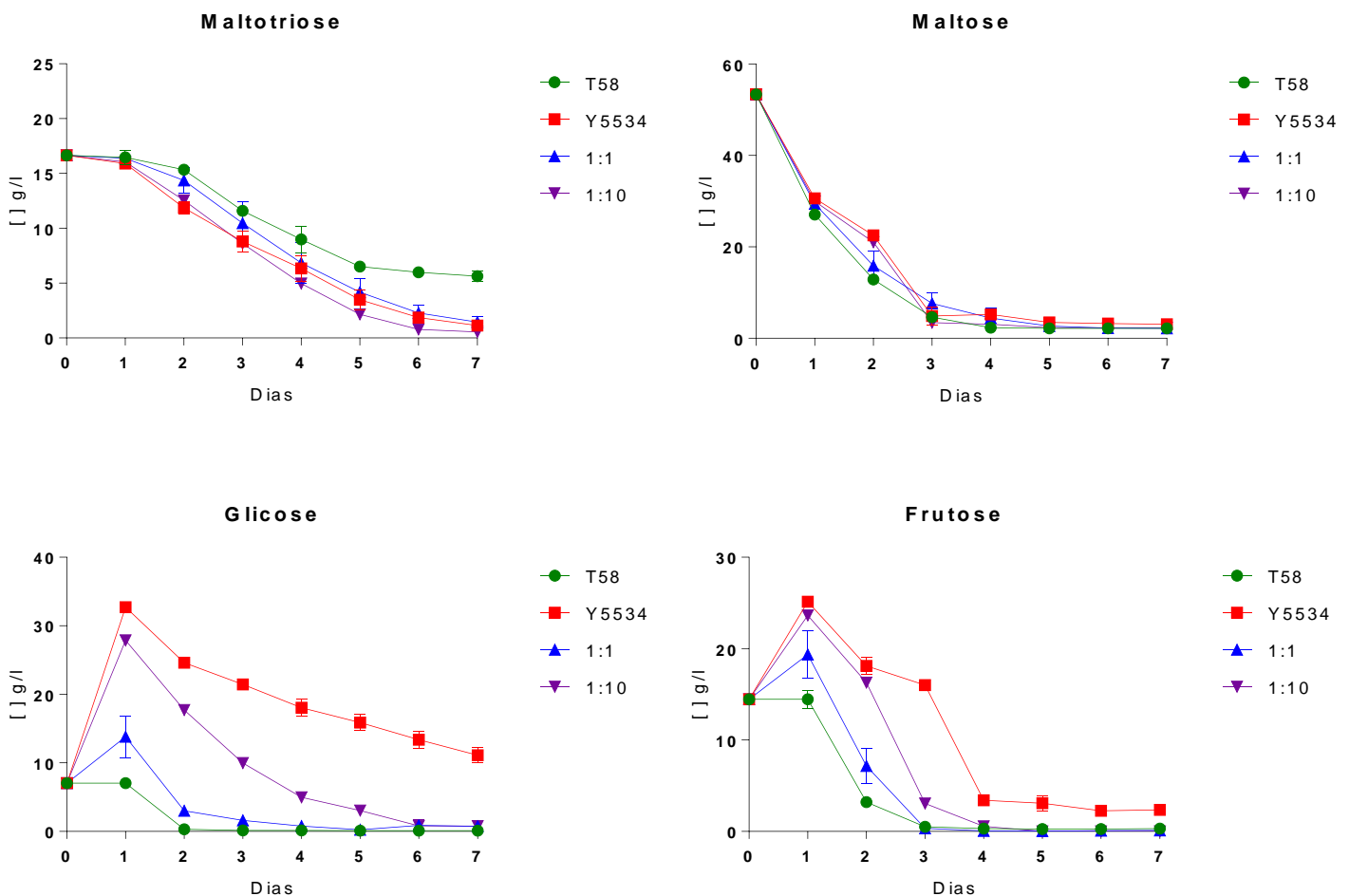


Figura 6. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Aliquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

A produção de glicerol por *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi de aproximadamente 6,6 g/L, quase o dobro do observado para a *S. cerevisiae* T58. Também foi observado um aumento nos níveis de glicerol nos cultivos mistos entre as duas espécies de leveduras. *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 produziu maiores níveis de ácido acético (0,2 g/l) e menor concentração de etanol (46 g/L) quando comparado com *S. cerevisiae* T58, que produziu 0,17 g/L de ácido acético e 57 g/L de etanol (figura 7).

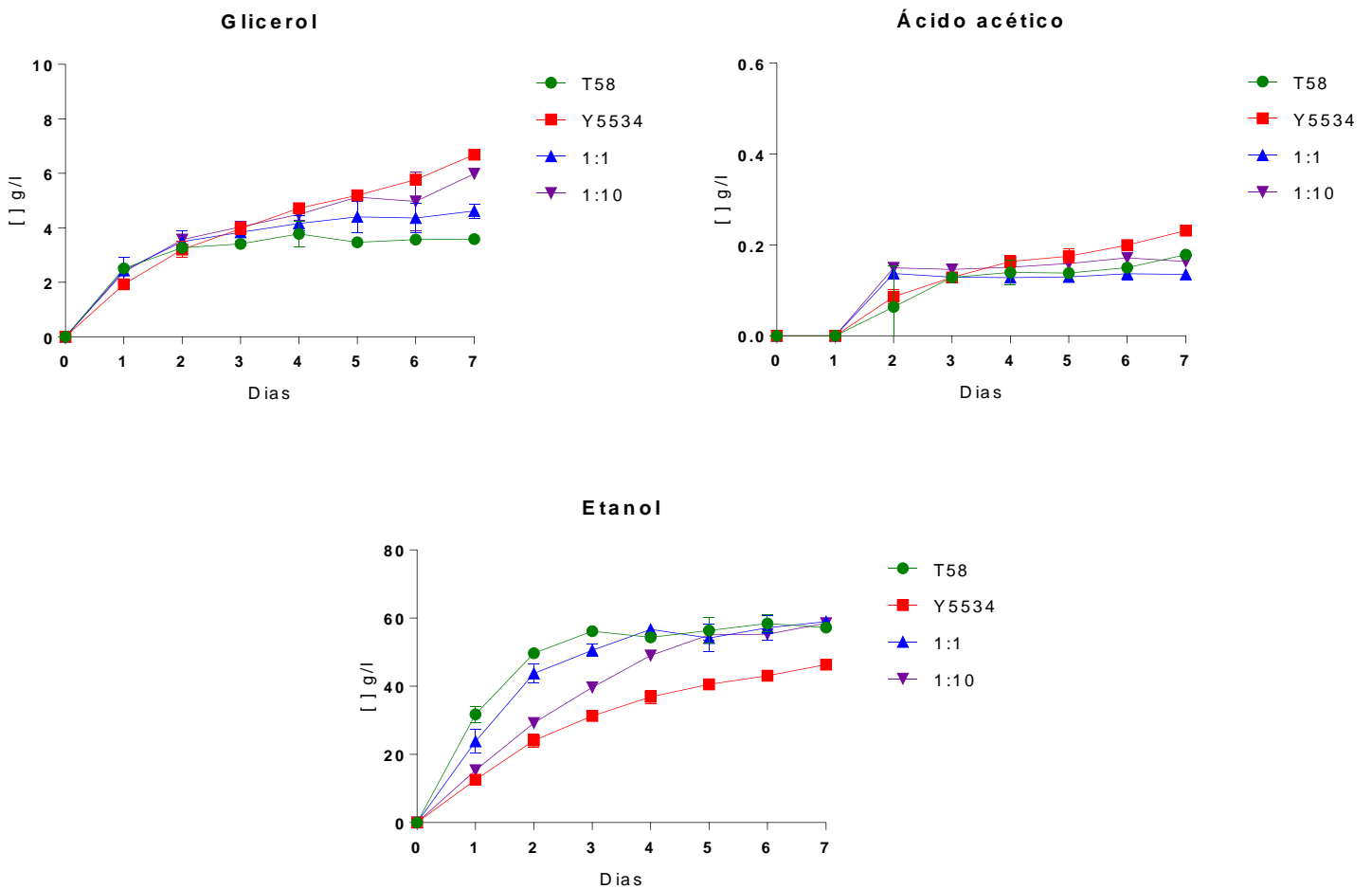


Figura 7. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

Em cultivos mistos, as populações de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 ficaram estáveis até o terceiro dia de fermentação. Na proporção 1:1, esta levedura não foi detectada a partir do 5º dia, ao passo que na proporção 1:10 não foi possível

detectar sua população no 7º dia de fermentação. Quando em cultivo misto, as populações de *S. cerevisiae* T58 apresentaram um rápido declínio no início da fermentação e posterior recuperação e aumento de sua contagem. Em cultivo puro, *S. cerevisiae* T58 apresentou um aumento inicial na contagem populacional, mantendo-se estável até o final do ensaio. A população de *S. meliponinorum* apresenta declínio mesmo em cultivo puro (figura 8).

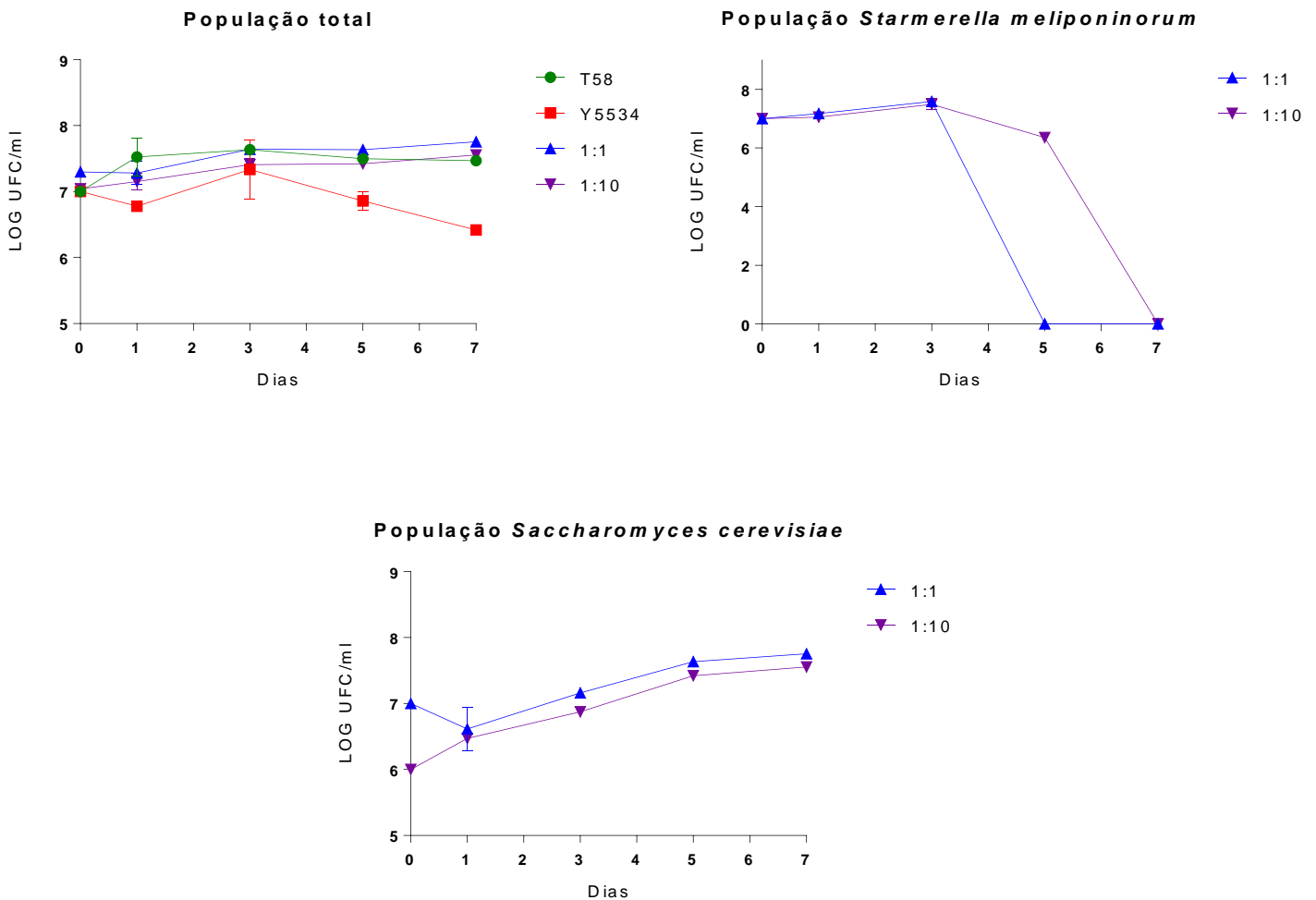


Figura 8. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro (Y5534), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.

5.3.2. *Starmarella meliponinorum* UFMG-CM-Y5582

A linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 não foi capaz de atenuar eficientemente a maltotriose, mantendo os níveis residuais próximos à *S. cerevisiae* (6 g/L). Os comportamentos em relação ao consumo de glicose e frutose foram

similares à *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534, com apenas um pequeno residual deste açúcar ao final da fermentação. (figura 9).

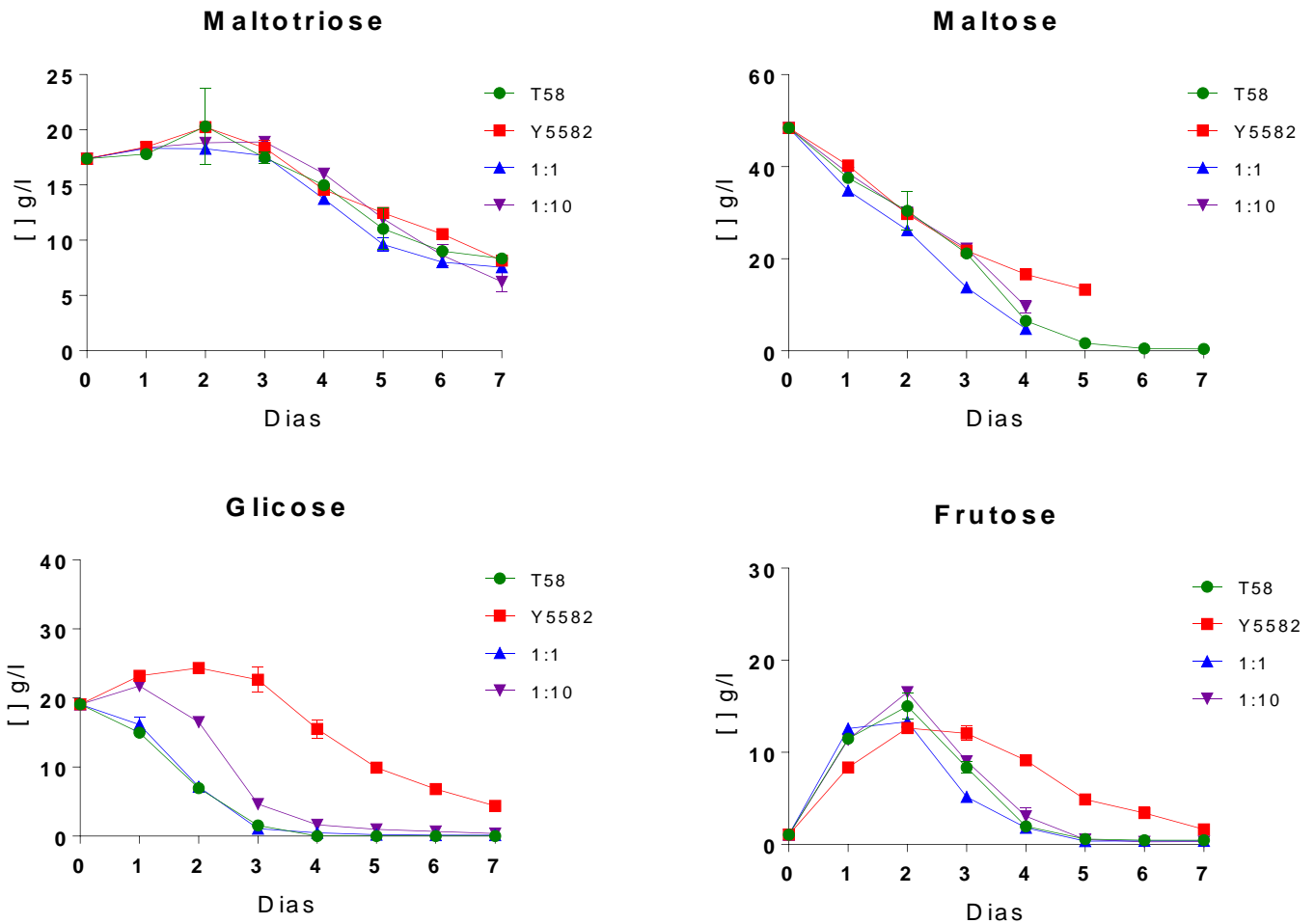


Figura 9. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

A produção de metabólitos por *S. meliponinorum* seguiu o mesmo perfil obtido para a linhagem UFMG-CM-Y5534. A produção total de glicerol foi de 6 g/L por UFMG-CM-Y5582 contra 3,5 g/L por *S. cerevisiae* T58. A produção de etanol foi de 53 g/L para *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 e de 64 g/L por *S. cerevisiae* T58. As fermentações conduzidas por cultivos mistos com estas leveduras apresentaram níveis similares aos observados apenas em *S. cerevisiae* T58 (figura 10).

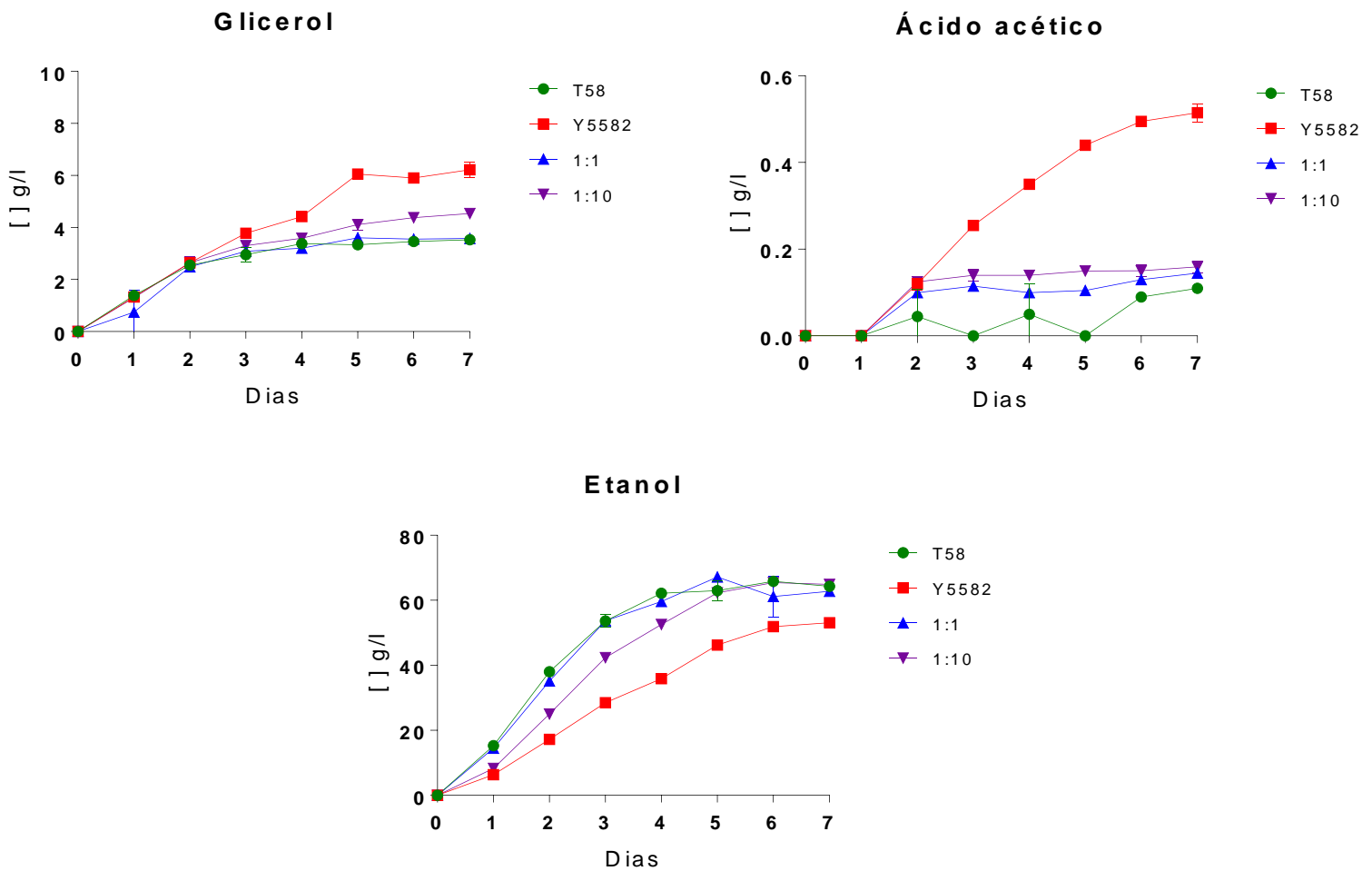


Figura 10. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

Nos cultivos mistos entre *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582 e *S. cerevisiae* T58, os níveis populacionais de *S. cerevisiae* aumentaram durante as primeiras 24 horas de fermentação, mantendo-se relativamente estáveis após este período. Novamente foi possível observar um declínio na população de *S. meliponinorum* após o terceiro dia de fermentação em cultivos mistos, porém apenas na proporção 1:1 esta levedura não foi detectada no sétimo dia de fermentação (figura 11).

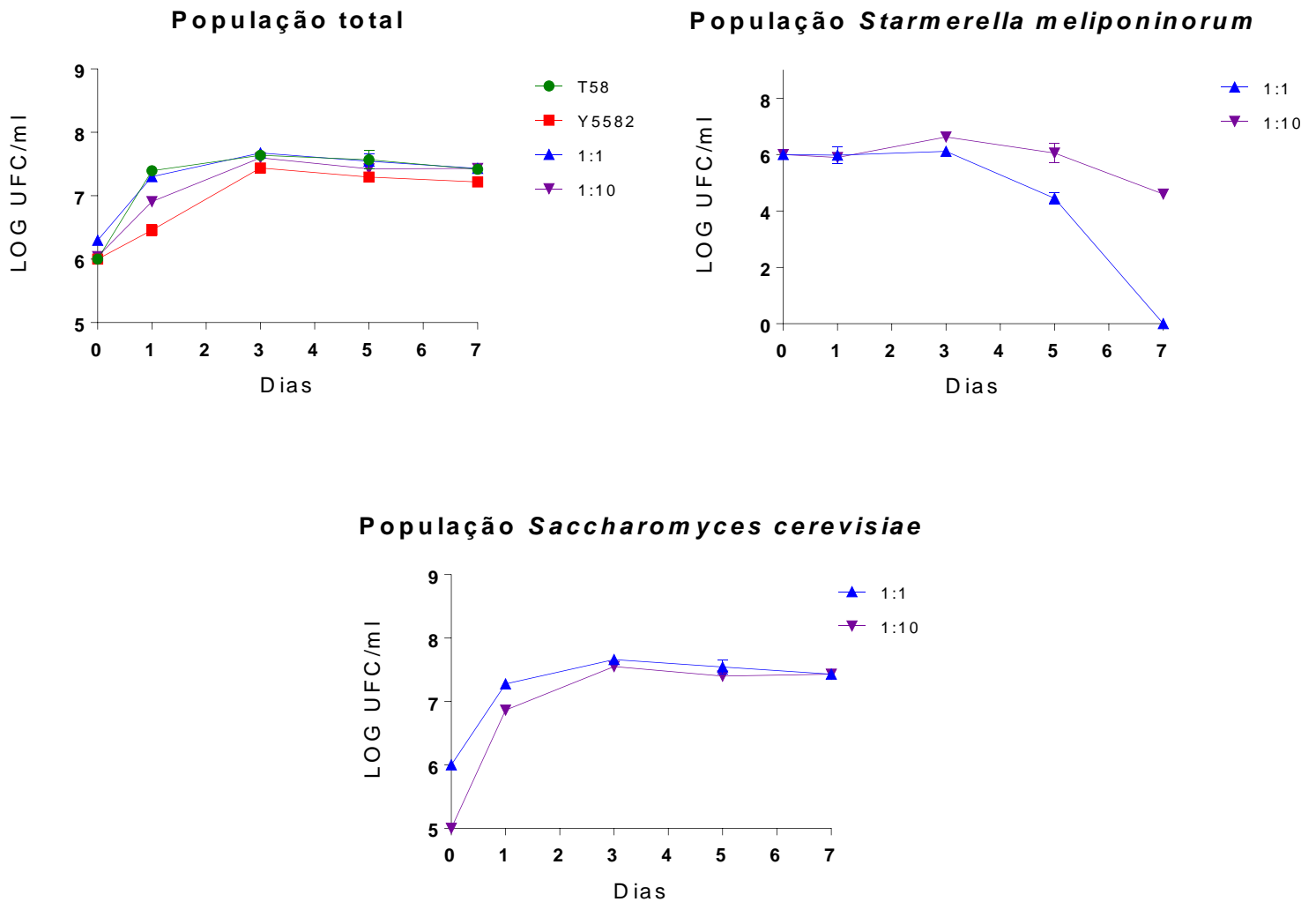


Figura 11. Contagem populacional de leveduras nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *Starmarella meliponinorum* em cultivo puro (Y5582), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.

5.3.3. *Starmarella meliponinorum* UFMG-CM-Y5575

O perfil de consumo de carboidratos é mostrado na figura 12 e foi semelhante ao obtido para *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582, exceto pela maior capacidade de atenuação da maltose (semelhante a linhagem UFMG-CM-Y5534) (figura 12). A produção de metabólitos por *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 segue a mesma tendência das anteriores, com um maior rendimento de glicerol (9 g/L) que a levedura controle comercial *S. cerevisiae* (3,5 g/L). O rendimento de etanol após 7 dias de fermentação foi de 58 g/L para o cultivo puro desta linhagem de levedura e de aproximadamente 65 g/L para os demais tratamentos (figura 13).

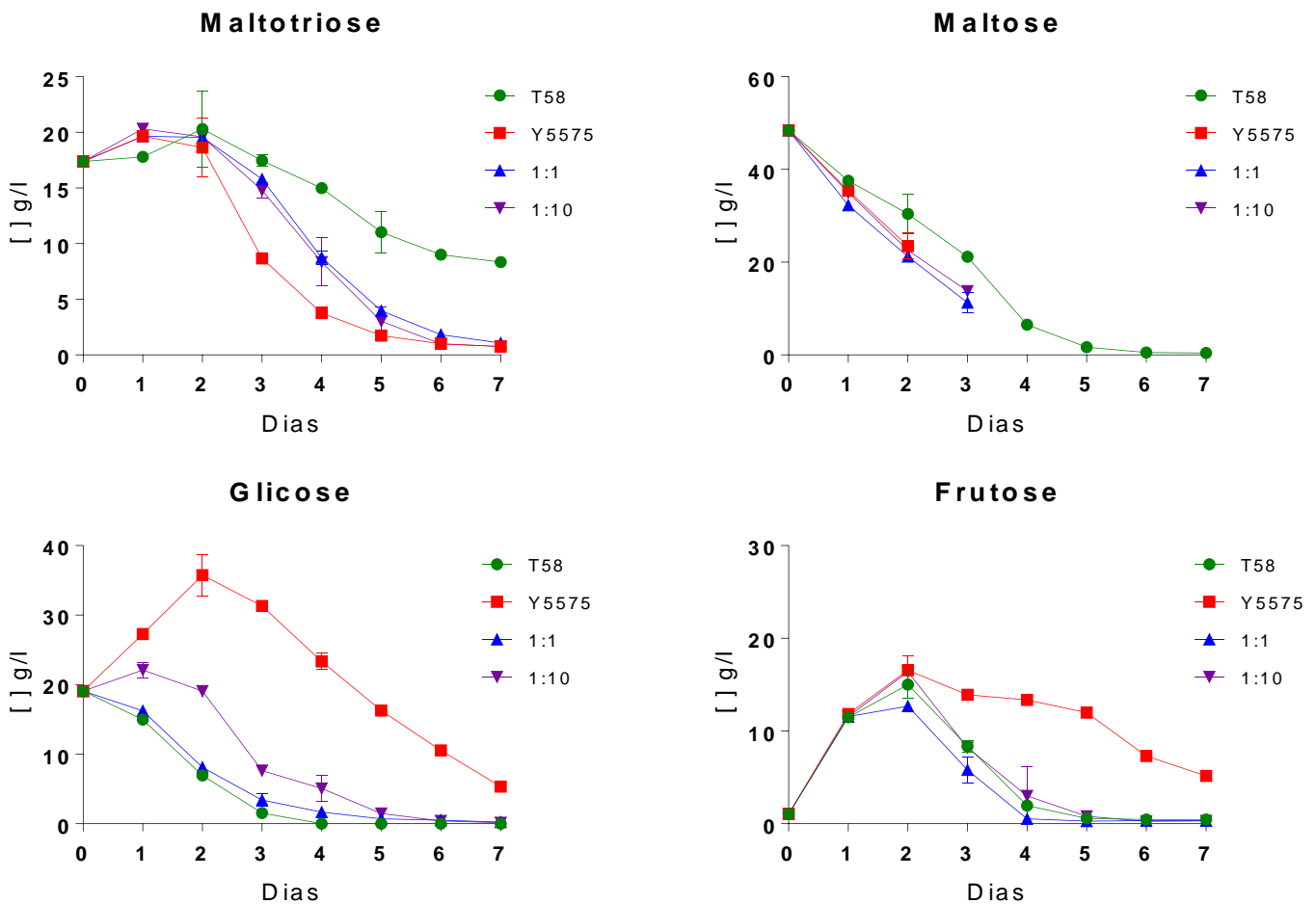


Figura 12. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro (Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

A contagem populacional nas fermentações utilizando *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 foi similar à UFMG-CM-Y5582 (figura 14). A população de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 se manteve estável até o final da fermentação, quando em cultivo puro. Em cultivo misto com *S. cerevisiae* comercial, a população desta levedura apresentou declínio a partir do 3º dia. Para a proporção 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y5575), a população de *S. meliponinorum* não foi detectada no sétimo dia do ensaio.

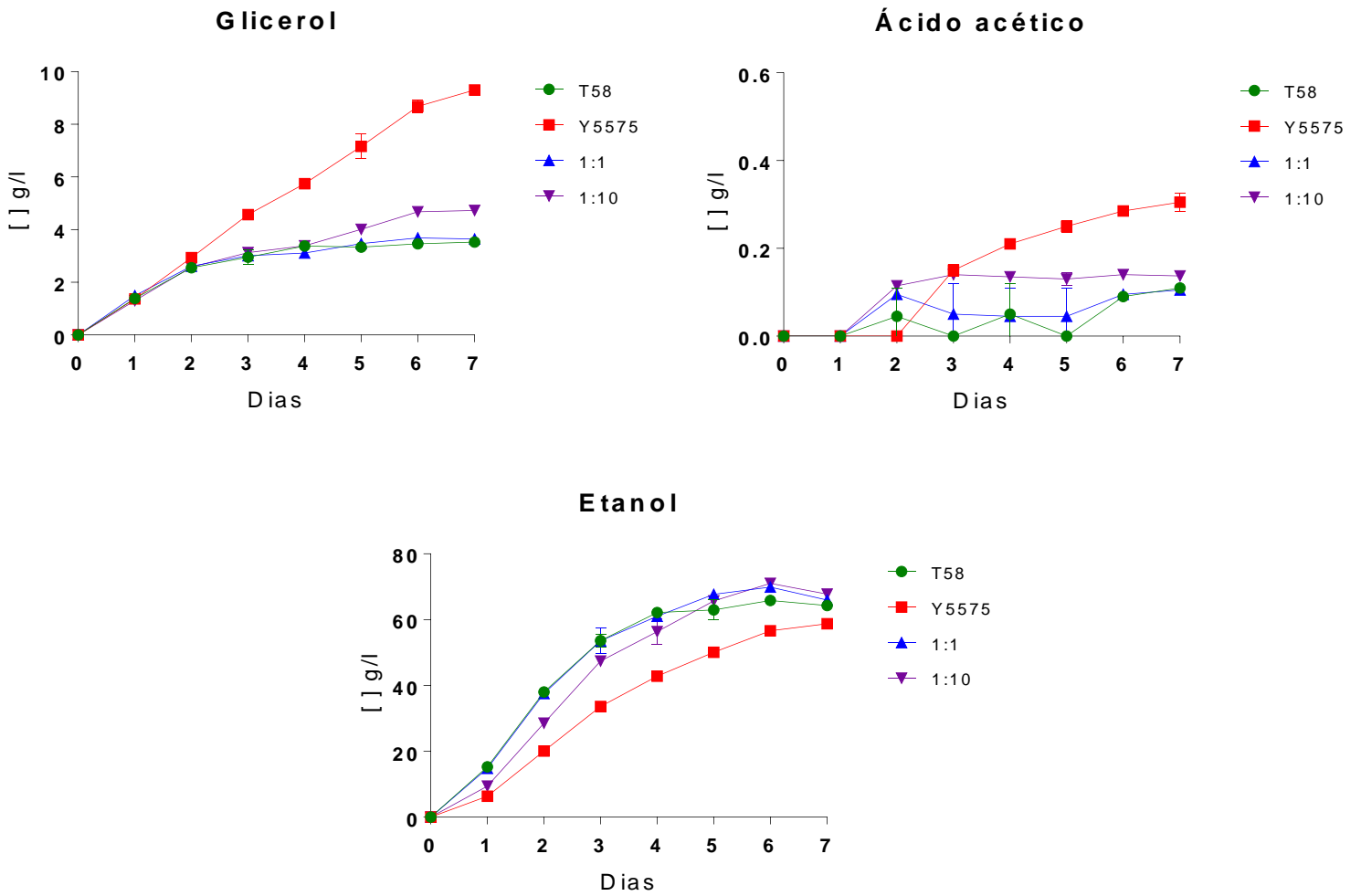


Figura 13. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro (Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

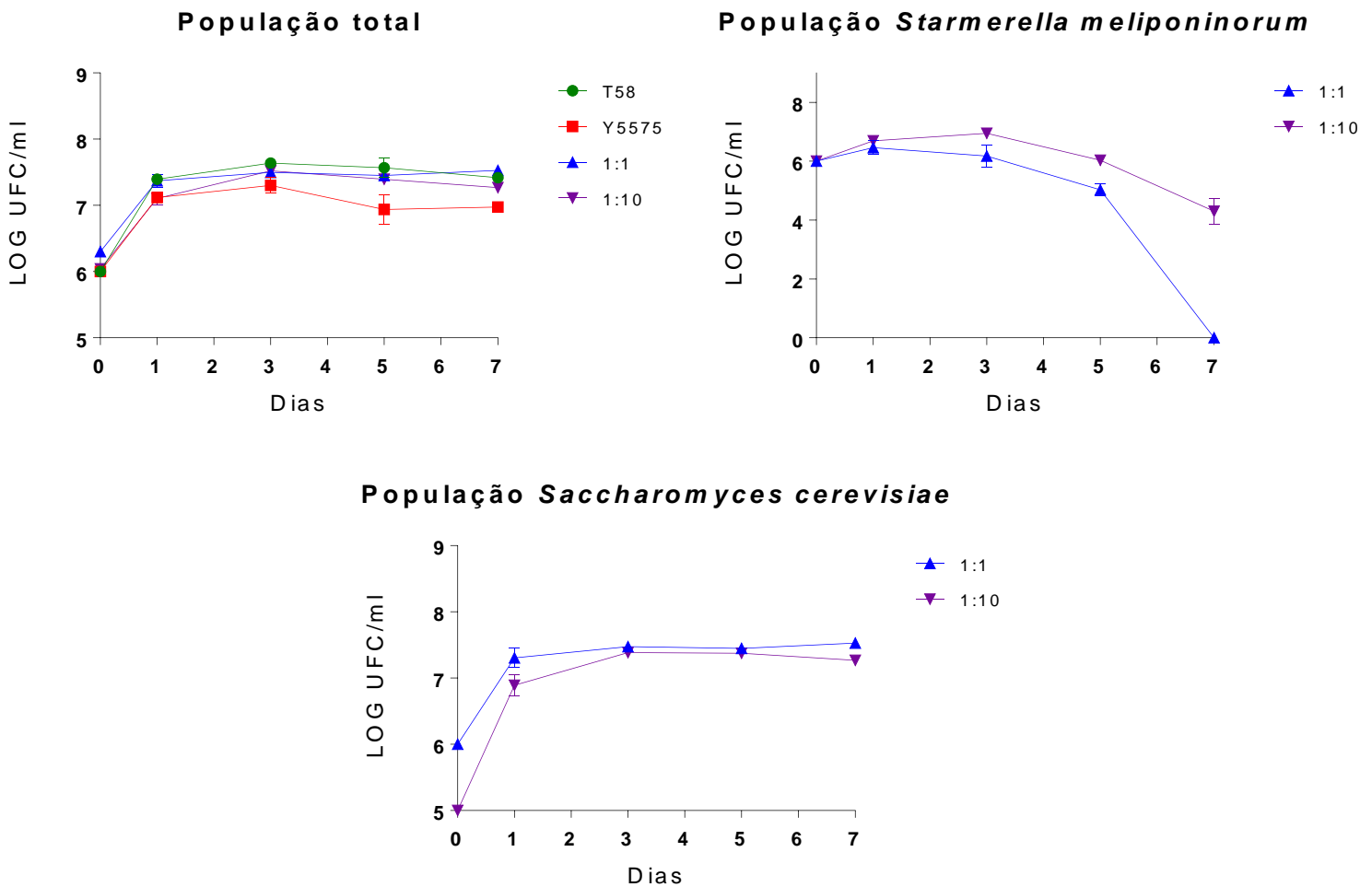


Figura 14. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5575 em cultivo puro (Y5575), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.

5.3.4. *Starmarella meliponinorum* UFMG-CM-Y5554

S. meliponinorum UFMG-CM-Y5554 apresentou perfil de consumo de açúcares semelhante as linhagens UFMG-CM-Y5534 e UFMG-CM-Y5575 da mesma espécie, atenuando completamente a maltotriose (figura 15). O perfil de produção de metabólitos de UFMG-CM-Y5554 foi similar as demais leveduras dessa espécie. UFMG-CM-Y5554 produziu maiores níveis de glicerol (8 g/L) e ácido acético (0,3 g/L) e menor nível de etanol (58 g/L) quando comparada à *S. cerevisiae* T58 (3,5, 0,1 e 64 g/L para estes metabólitos). A contagem populacional observada também foi similar ao observado para *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534, UFMG-CM-Y5575 e UFMG-CM-Y5582 (figura 17). Quando em cultivos mistos com *S. cerevisiae* T58, a população de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 apresentou declínio a partir do 5º dia de

fermentação e não foi detectada no sétimo dia para a proporção 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5554).

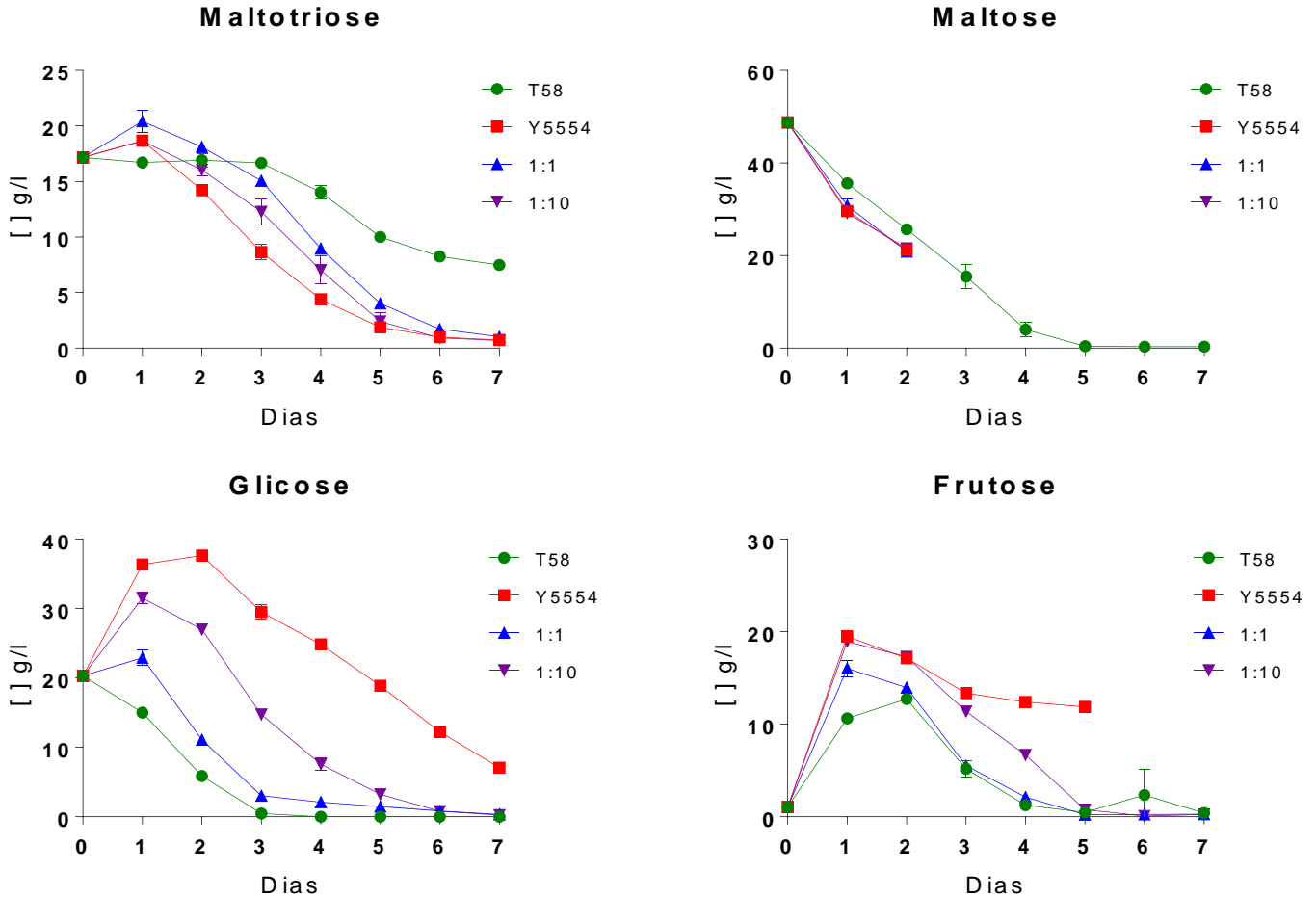


Figura 15. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Aliquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

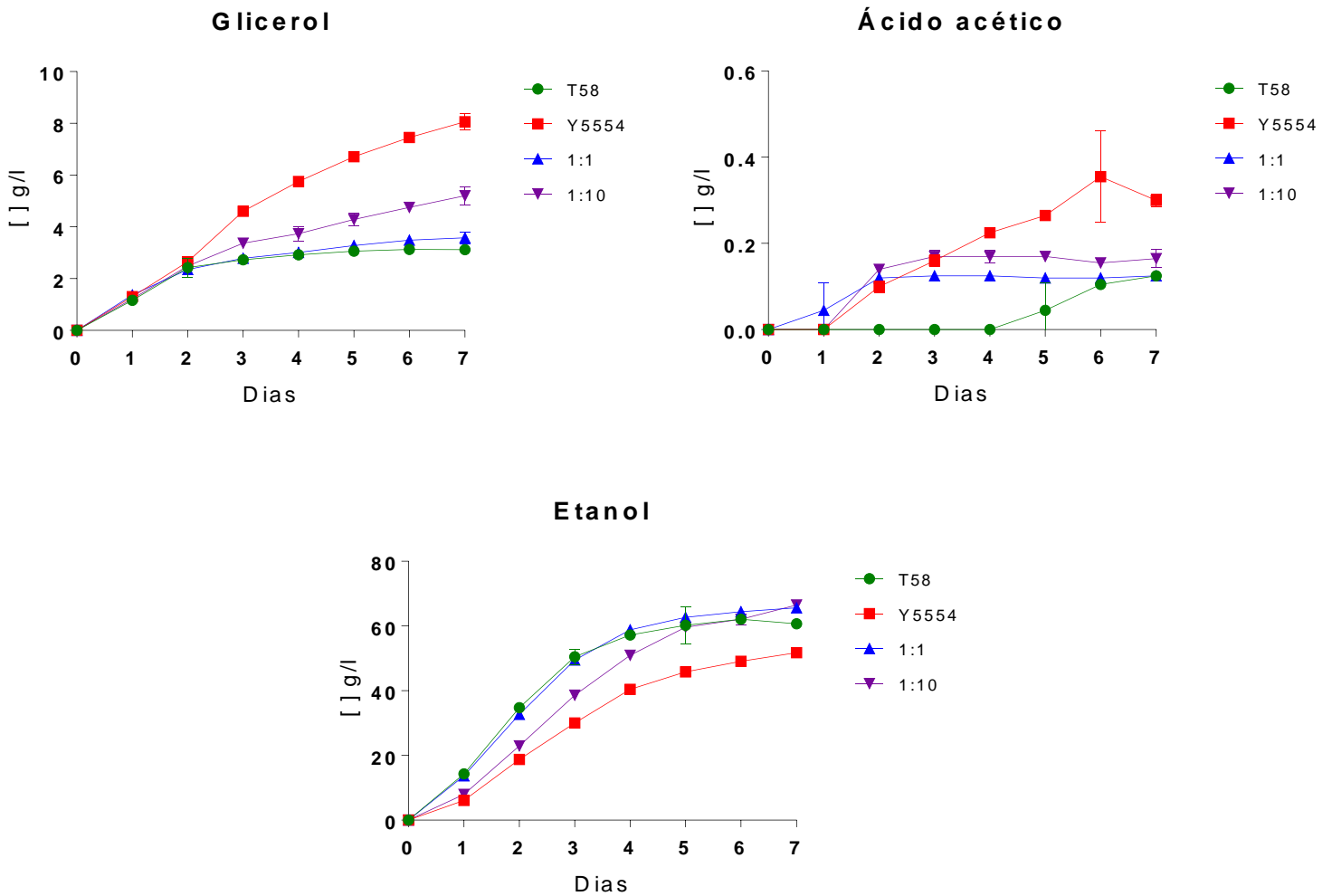


Figura 16. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

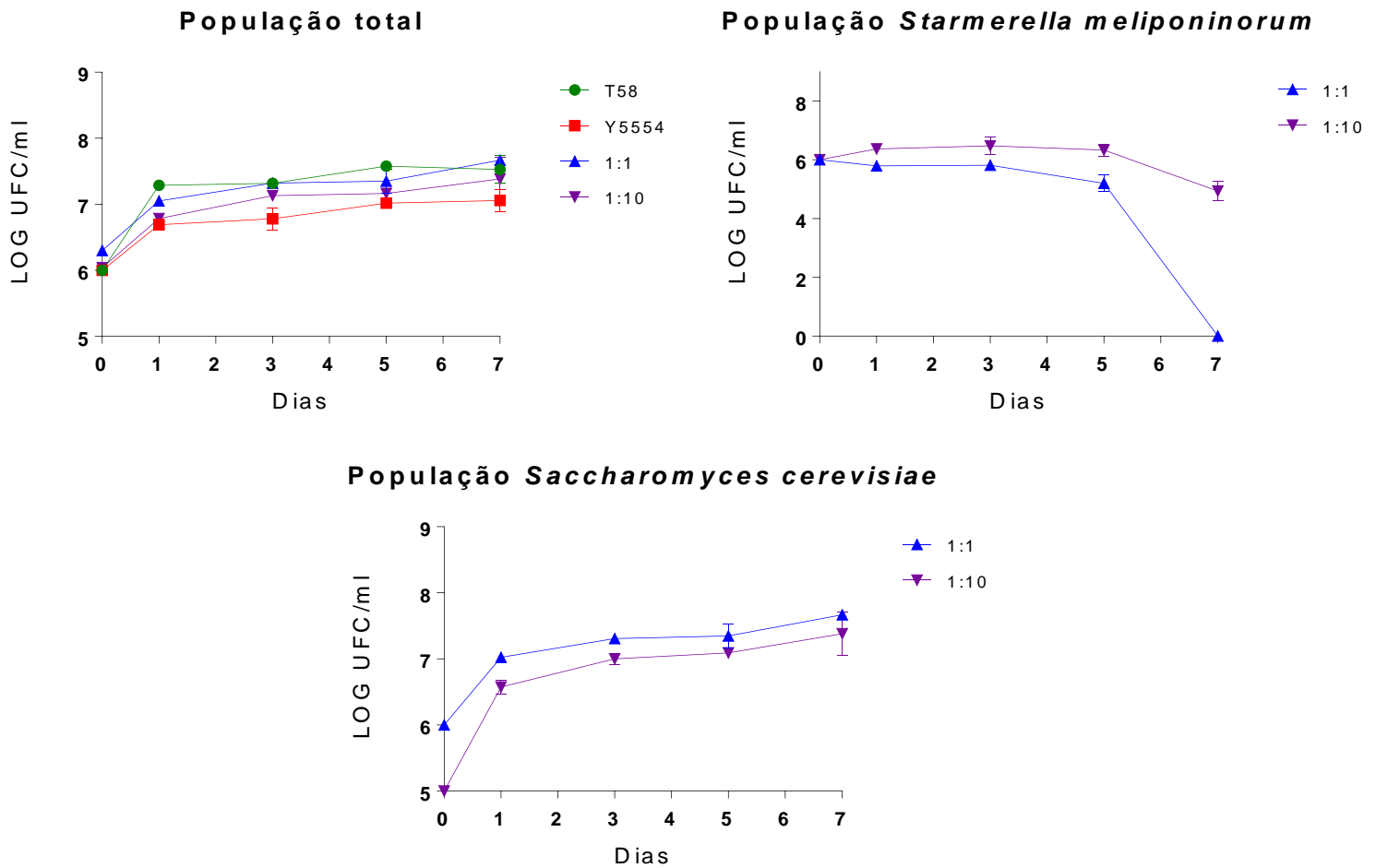


Figura 17. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5554 em cultivo puro (Y5554), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *S. meliponinorum*, respectivamente.

5.3.5. *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y2681

Diferentemente do observado para as linhagens de *S. meliponinorum*, *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 não foi capaz de utilizar o açúcar maltotriose e atenuou menos de 50% da maltose presente no mosto, deixando um residual de 34 g/L, em contraste com 2 g/L dos demais tratamentos. Glicose e frutose foram assimiladas em sua totalidade por todos os tratamentos (figura 18). A produção de glicerol foi semelhante entre os quatro tratamentos, aproximadamente 3,5 g/L, mas para etanol observou-se um menor rendimento de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 (38 g/L) quando em comparação aos demais tratamentos (50 – 60 g/L) (figura 19).

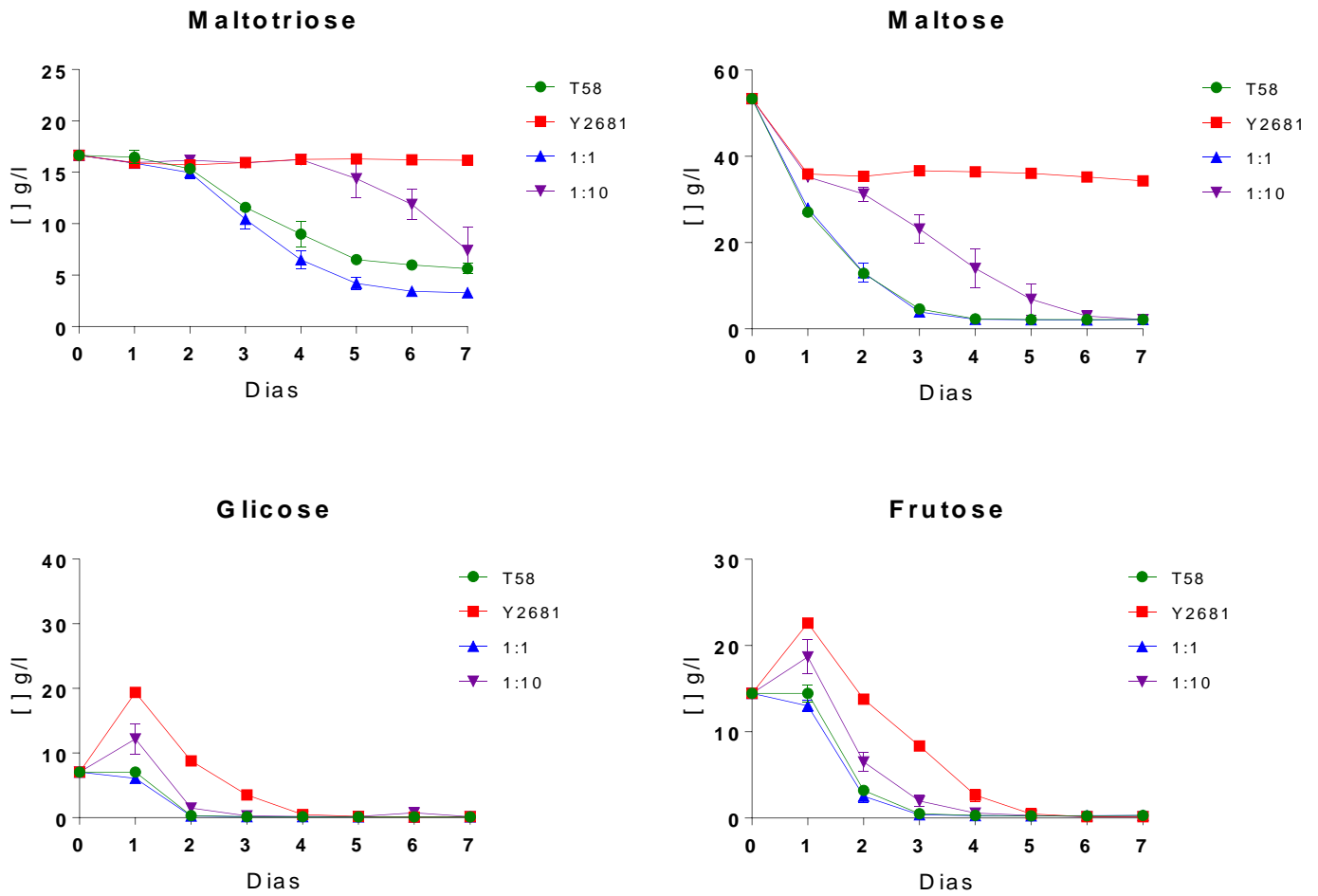


Figura 18. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

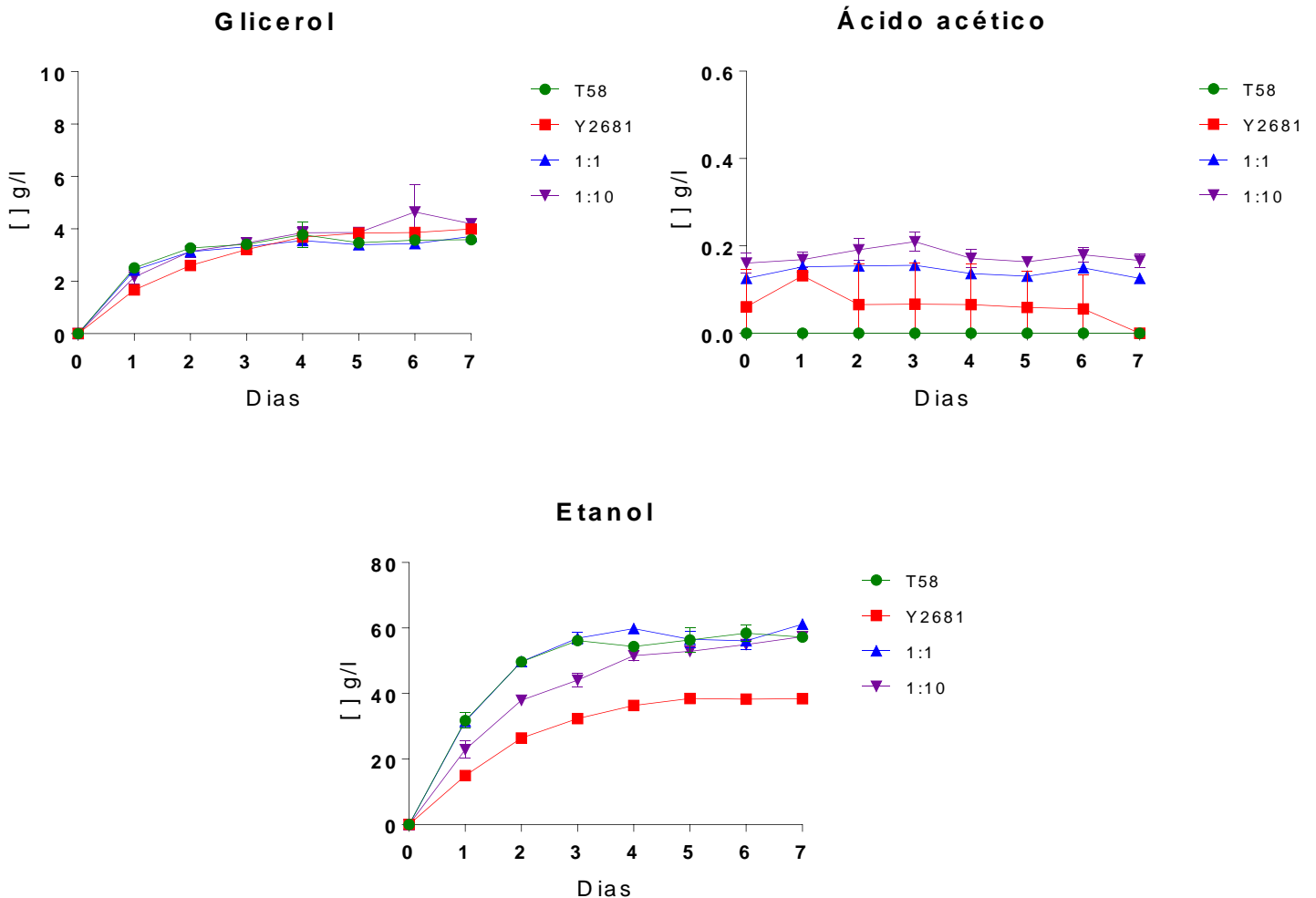


Figura 19. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos (1:1 e 1:10) entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

A população de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681, quando em cultivo puro, apresentou um aumento inicial, mantendo-se estável até o 5º dia, quando apresentou um leve declínio. *S. cerevisiae* T58 em cultivo puro, mostrou um leve aumento na contagem nas primeiras 24 horas da fermentação. Os cultivos mistos apresentaram aumento, mas a população de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 não aumentou inicialmente e sofreu um declínio após o 3º dia, não sendo mais detectada no 7º dia no tratamento de proporção 1:1 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) (figura 20).

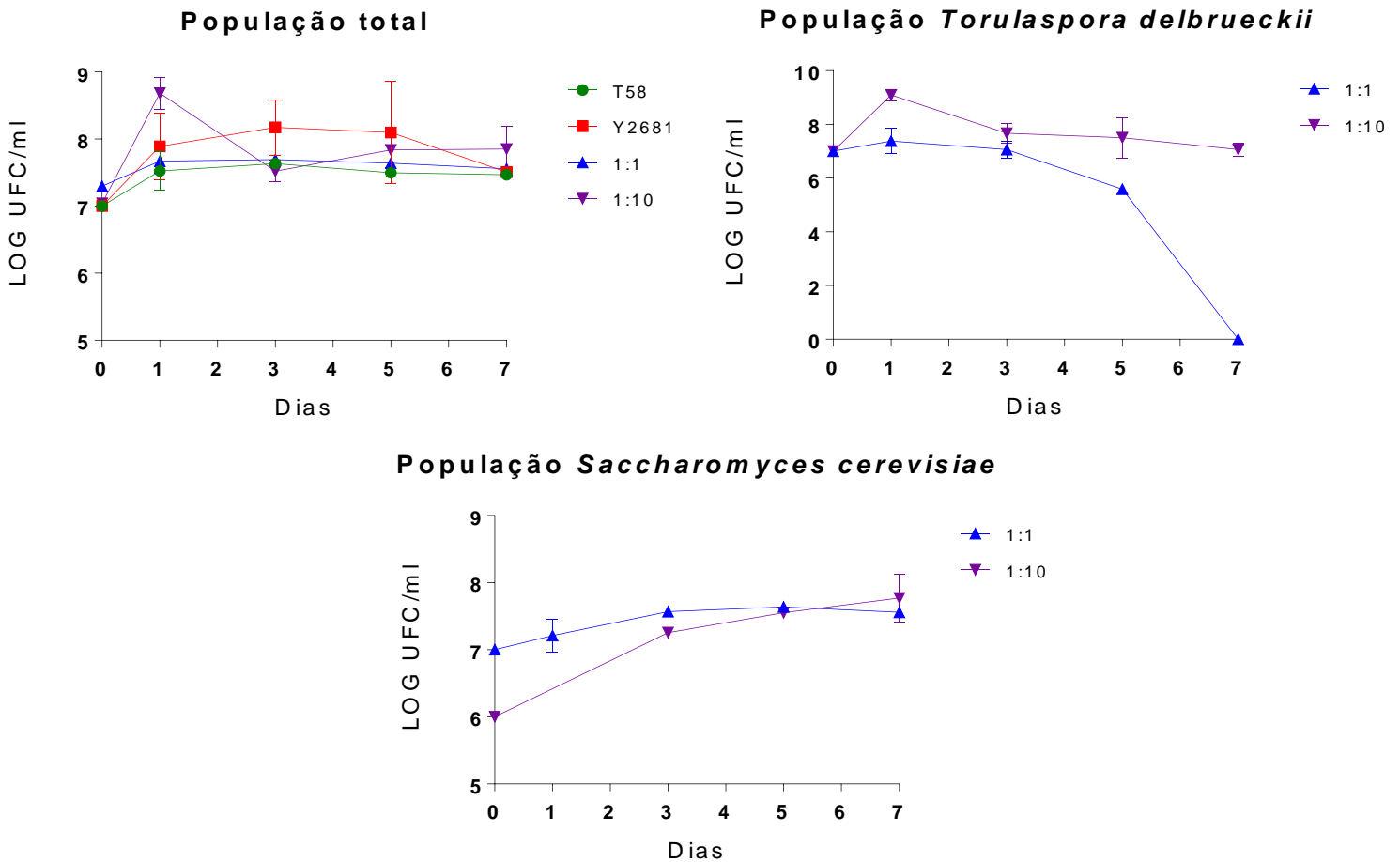


Figura 20. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro (Y2681), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.

5.3.6. *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757

Os perfis de consumo de açúcares, produção de metabólitos e contagem populacional destas duas leveduras foram similares. Ambas mostraram uma maior capacidade assimilativa de maltotriose, deixando um residual de 3 g/L contra 10 g/L para a levedura controle *S. cerevisiae* T58. Quanto à maltose, a capacidade assimilativa das linhagens UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757 foi menor em comparação à *S. cerevisiae* T58 (residual de 17 g/L contra 0,5 g/L, respectivamente). Em conjunto com os resultados obtidos para *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681, observa-se que a capacidade de fermentação de maltose é uma característica variável entre linhagens desta levedura. Toda a glicose e frutose foi consumida em todos os tratamentos (figuras 21 e 24).

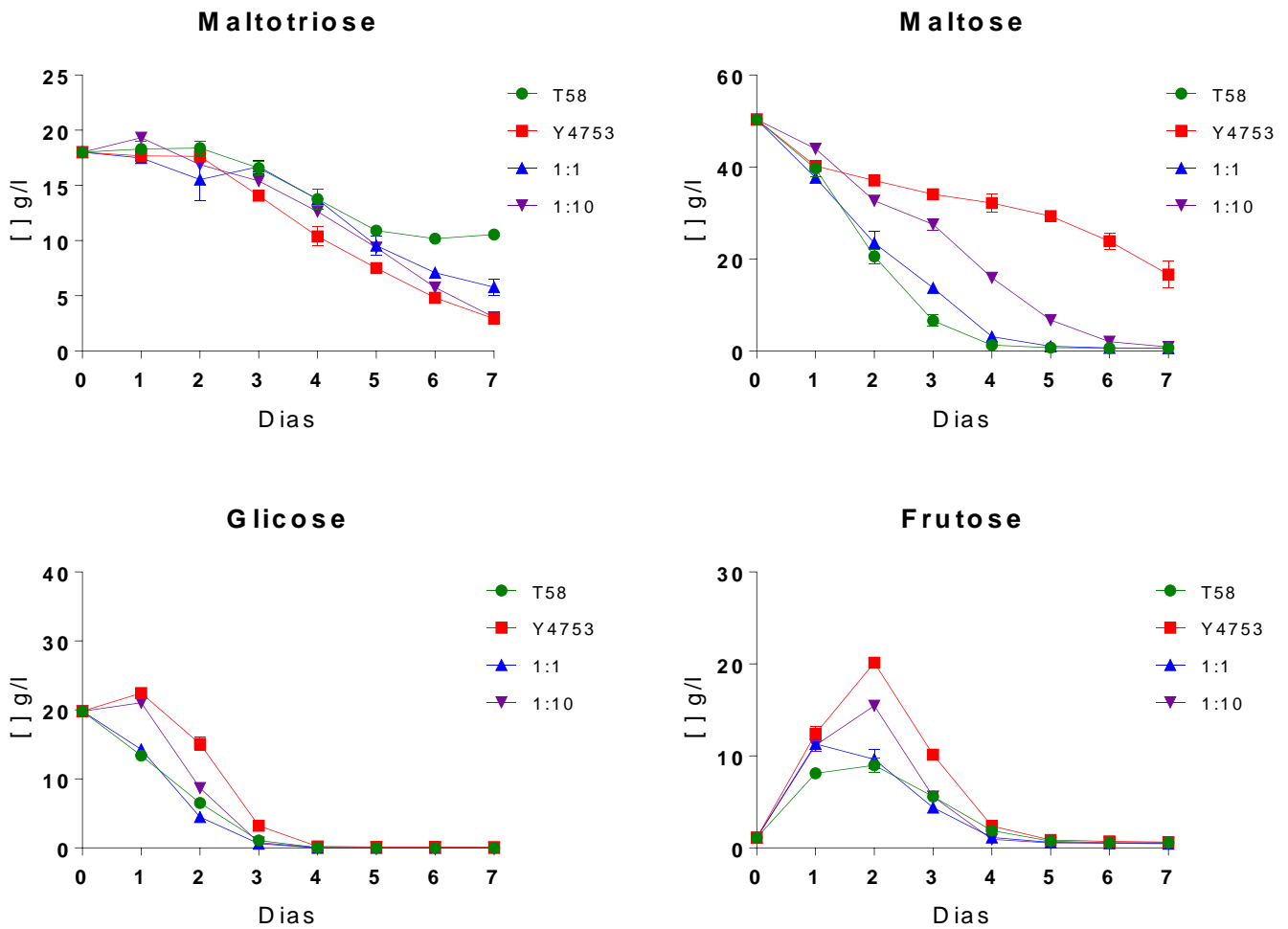


Figura 21. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Torulasporea delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Aliquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

A produção de glicerol para as linhagens UFMG-CM-Y4757 e UFMG-CM-Y4753 (5 g/L) foi maior em comparação a levedura controle *S. cerevisiae* T58 (3,5 g/L). O rendimento em álcool foi de 45 g/L para ambas as linhagens de *T. delbrueckii* e 60 g/L para *S. cerevisiae* T58 (figuras 22 e 25).

Nos quatro tratamentos observou-se um aumento na contagem populacional total das leveduras. Em contraste com o observado para todas as leveduras anteriores, as linhagens UFMG-CM-Y4757 e UFMG-CM-Y4753 não apresentaram declínio populacional quando em cultivo misto com *S. cerevisiae* T58, mantendo os números estáveis até o 7º dia de fermentação (figuras 23 e 26).

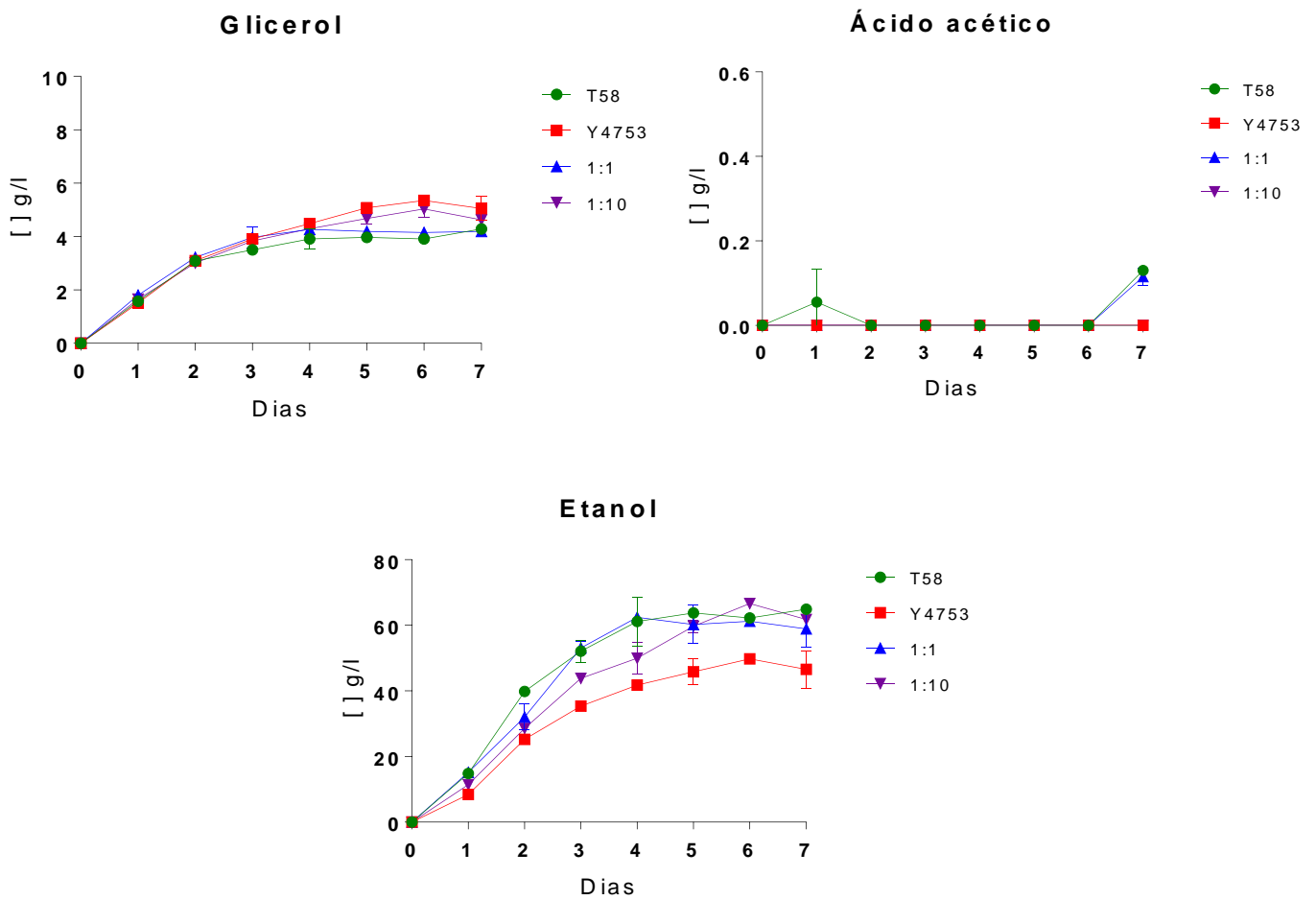


Figura 22. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Aliquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

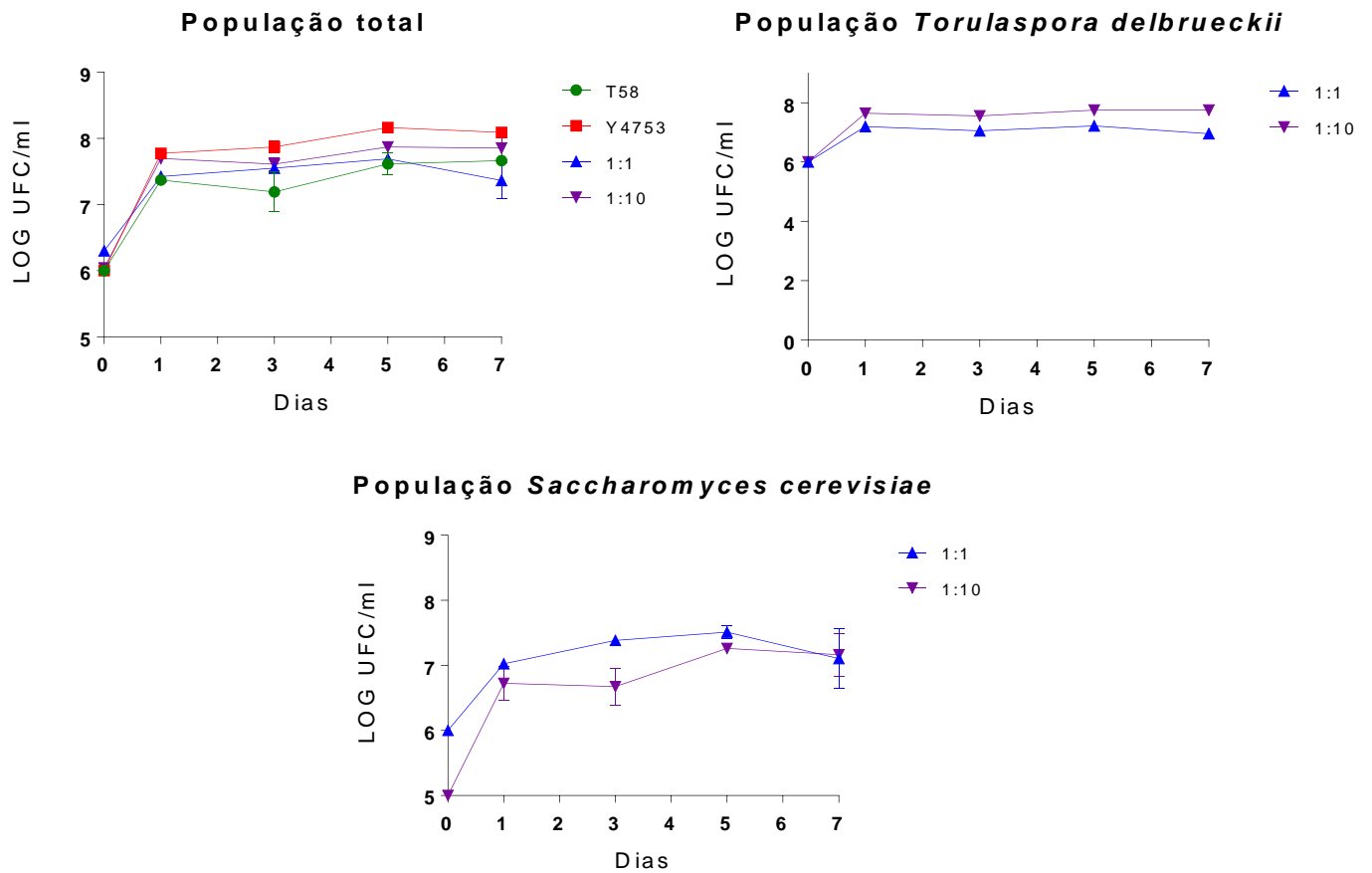


Figura 23. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro (Y4753), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.

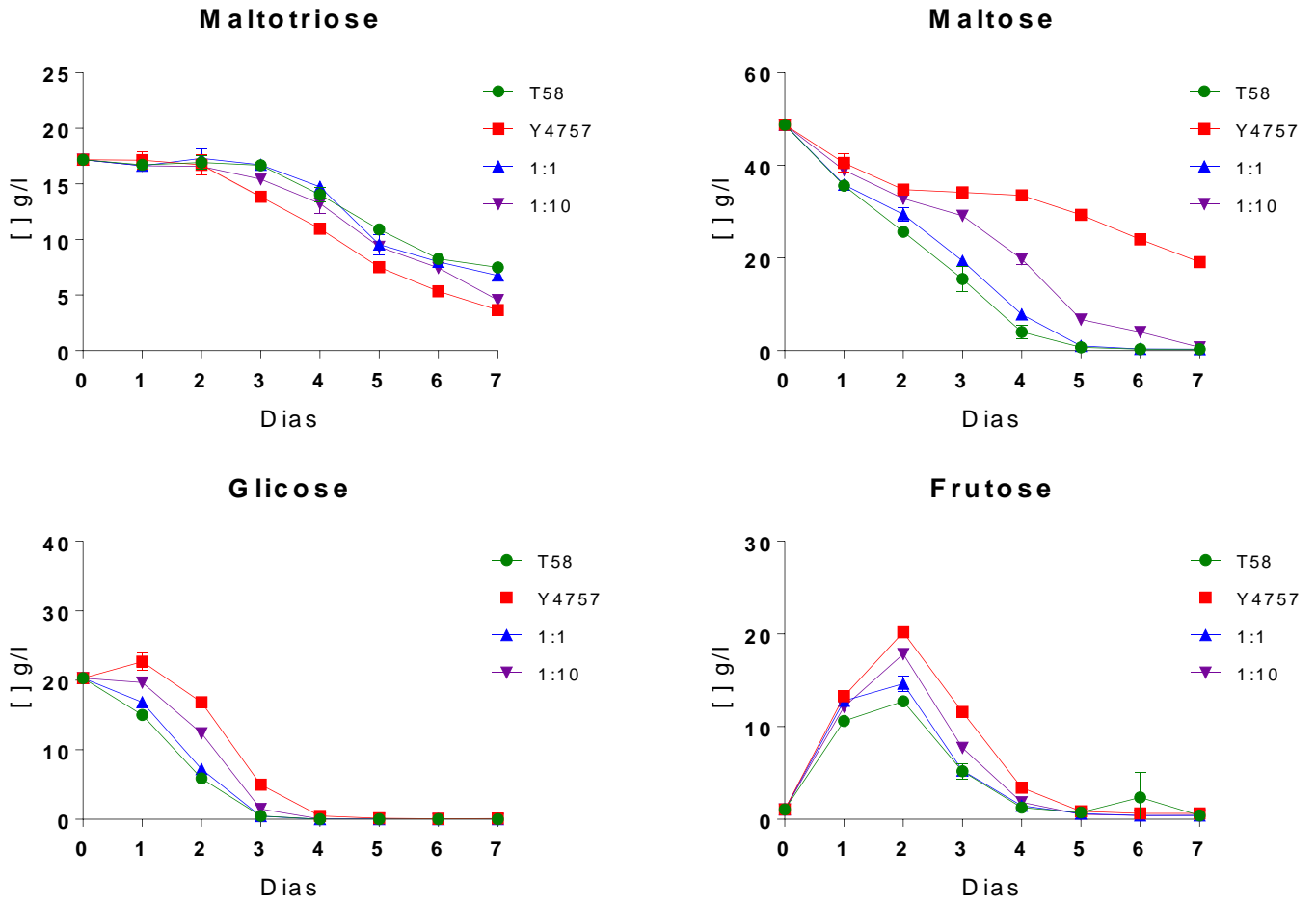


Figura 24. Consumo de carboidratos do mosto cervejeiro em escala laboratorial pela linhagem de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em c.cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em que o ensaio foi realizado.

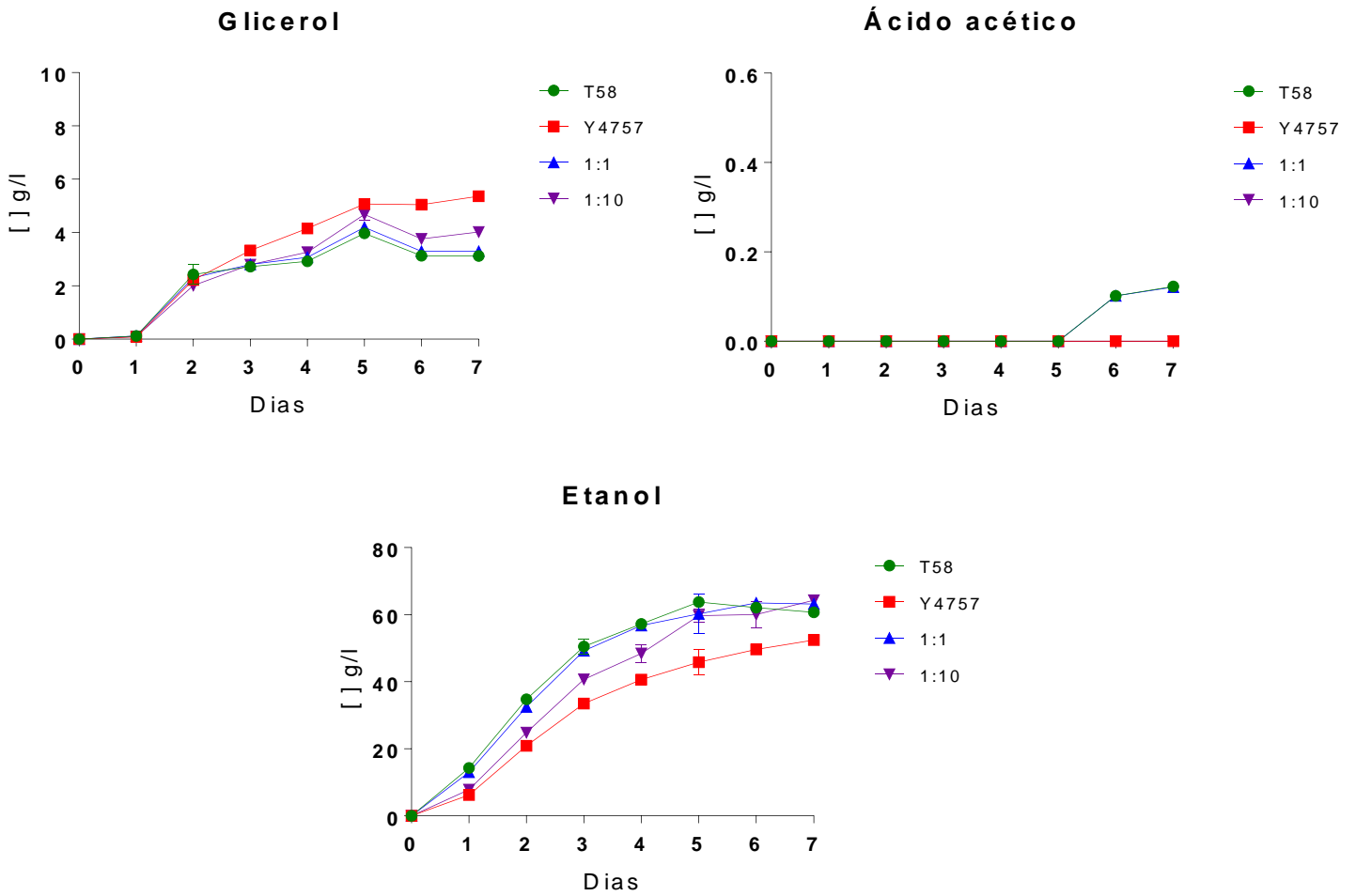


Figura 25. Produção de glicerol, ácido acético e etanol pela linhagem de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente. Alíquotas foram analisadas durante os sete dias de fermentação em escala laboratorial em que o ensaio foi realizado.

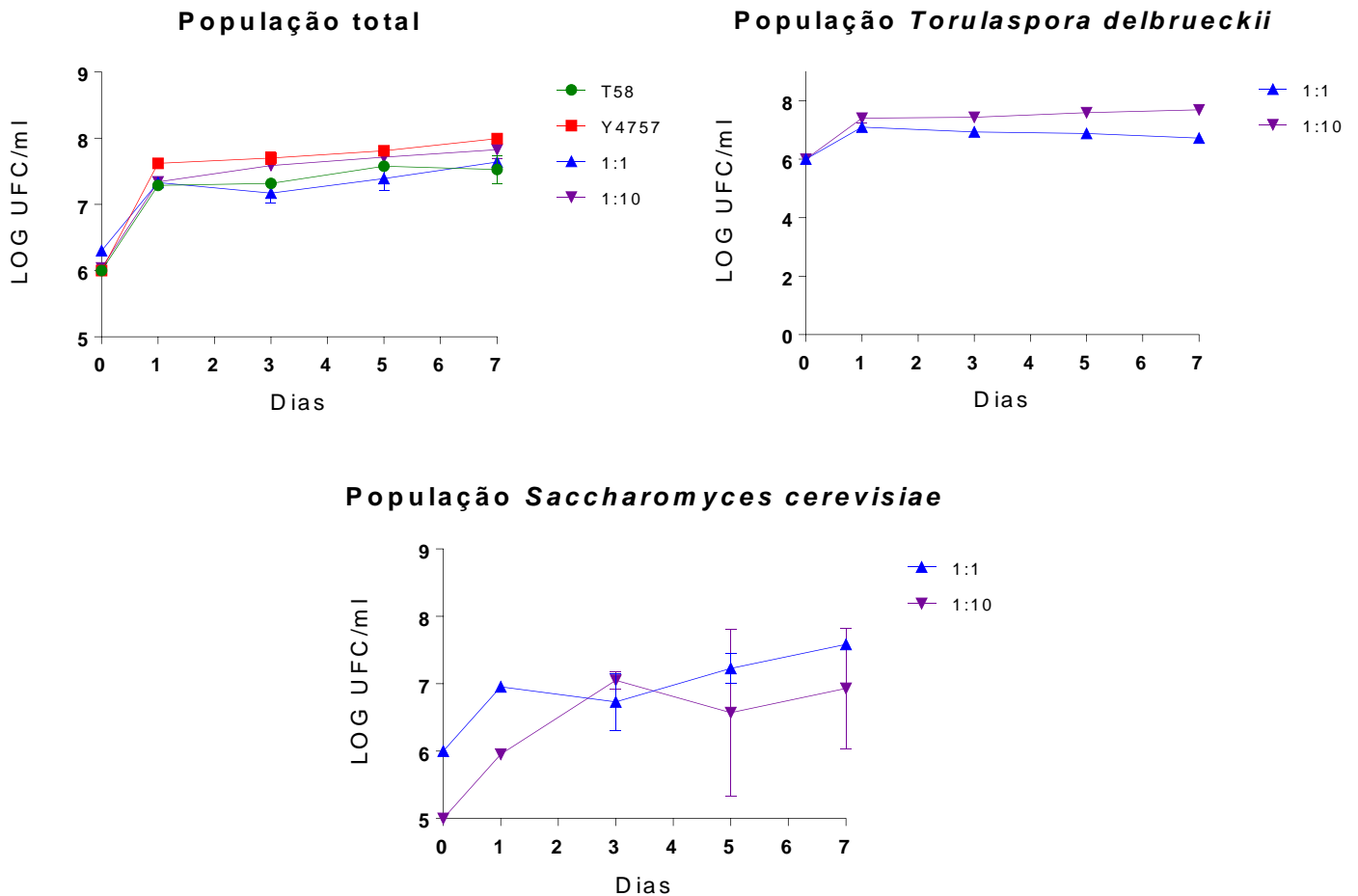


Figura 26. Contagem populacional de leveduras totais nas fermentações em escala laboratorial realizadas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro (Y4757), *S. cerevisiae* comercial controle em cultivo puro (T58) e cultivos mistos entre as duas leveduras nas proporções 1:1 e 1:10 de células de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente.

Foram selecionadas para produção de cerveja em escala piloto as leveduras *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534, pelo perfil de consumo de açúcares e baixo rendimento de etanol (característica interessante para produção de bebidas de baixo teor alcoólico); *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681, por apresentar a maior produção de glicerol; e *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 e UFMG-CM-Y4757, pelos perfis de sobrevivência de suas populações quando em cultivos mistos com *S. cerevisiae* comercial. As linhagens de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5582, UFMG-CM-Y5575 e UFMG-CM-Y5554 produziram quantidades de ácido acético acima do observado para UFMG-CM-Y5534 e *S. cerevisiae* comercial T58 e não foram selecionadas para produção piloto de cerveja.

5.4. Produção em escala piloto

5.4.1. Cervejas piloto

As quatro leveduras selecionadas foram utilizadas na produção de cerveja em escala piloto como descrito no item 4.5, em duplicata, exceto para *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757, pois, devido a uma mudança de fornecedor dos insumos, a brassagem resultou em um mosto diferente do padrão atingido anteriormente. Tabela 6 mostra as densidades populacionais obtidas para o mosto produzido e as cervejas no final da fermentação. Levando em consideração as densidades obtidas, os percentuais teóricos de álcool por volume e atenuação dos açúcares foram estimados. A levedura controle *S. cerevisiae* T58 atenuou, em média, $76,5 \pm 6,37\%$ dos açúcares do mosto. Para essa levedura, a atenuação aparente indicada pelo fabricante é de 70%.

S. meliponinorum UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro atenuou 83% dos açúcares do mosto, já os cultivos misto 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) atenuaram respectivamente 83 e 84% dos açúcares, valores acima do encontrado para a levedura comercial *S. cerevisiae* T58. Este resultado segue o mesmo perfil de consumo de açúcares observado para *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em escala laboratorial, indicando bom escalonamento dessa levedura quanto ao volume de produção. Durante o segundo experimento da produção de cerveja com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534, a cerveja produzida com o tratamento com cultivo puro desta levedura apresentou contaminação por outras leveduras não-*Saccharomyces*, confirmada por inoculação em ágar YM e lisina e observação das colônias ao microscópio, sendo excluída dos testes subsequentes.

T. delbrueckii UFMG-CM-Y2681 atenuou $50 \pm 15,5\%$ dos açúcares, resultado que apresentou variação entre as duas repetições do experimento. Os cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58 e *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 atenuaram $69 \pm 1,4\%$ e $67 \pm 2,8\%$, respectivamente. *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi capaz de atenuar 50% da maltose no ensaio de fermentação em escala laboratorial, mostrando reprodutibilidade durante o escalonamento da produção, apesar do grande desvio padrão observado. Durante o primeiro experimento com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681, o tratamento com *S. cerevisiae* T58 apresentou contaminação, sendo excluído das análises subsequentes.

T. delbrueckii UFMG-CM-Y4753, quando em cultivo puro, foi capaz de atenuar apenas $60 \pm 25,5\%$ dos açúcares do mosto, resultado que apresentou variação entre as duas repetições do experimento. *S. cerevisiae* T58 e *T. delbrueckii* UFMG-CM_Y4653 em cultivo misto nas proporções 1:1 e 1:10 foram capazes de atenuar 78% e $81,5 \pm 0,5\%$, respectivamente, dos açúcares do mosto. O resultado é condizente com o encontrado em escala laboratorial, onde o mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro apresentou um residual de 17 g/L de maltose ao final da fermentação, novamente mostrando o bom escalonamento da produção. De maneira similar à *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753, a levedura UFMG-CM-Y4757 apresentou capacidade de atenuação de 52% dos açúcares do mosto quando em cultivo puro.

A análise por CLAE permitiu determinar com mais precisão a concentração de etanol obtido ao final da fermentação do mosto (Tabela 7). Os valores encontrados por este método diferiram expressivamente do valor teórico calculado.

Tabela 5. Densidade original (OG) e final (FG) das cervejas produzidas (gravidade específica), ABV (álcool por volume) teórico calculado e grau de atenuação aparente dos açúcares totais.

		OG	FG	ABV	Atenuação
<i>Starmerella meliponinorum</i> UFMG-CM-Y5534	T58_1	1,058	1,018	5,3%	69%
	T58_2	1,060	1,012	6,4%	80%
	Y5534_1	1,058	1,010	6,4%	83%
	1:1_1	1,058	1,012	6,13%	79%
	1:1_2	1,060	1,008	6,9%	87%
	1:10_1	1,058	1,009	6,5%	84%
	1:10_2	1,060	1,007	7%	88%
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y2681	T58_2	1,061	1,018	5,7%	70%
	Y2681_1	1,062	1,024	5%	61%
	Y2681_2	1,061	1,037	3,2%	39%
	1:1_1	1,062	1,020	5,6%	68%
	1:1_2	1,061	1,018	5,7%	70%
	1:10_1	1,062	1,022	5,3%	65%
	1:10_2	1,061	1,019	5,6%	69%
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4753	T58_1	1,060	1,011	6,53%	82%
	T58_2	1,058	1,015	5,7%	74%
	Y4753_1	1,060	1,035	6%	42%
	Y4753_2	1,058	1,013	3%	78%
	1:1_1	1,060	1,013	6,26%	78%
	1:1_2	1,058	1,013	6%	78%
	1:10_1	1,060	1,011	6,53%	82%
1:10_2	1,058	1,011	6,26%	81%	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM-Y4757	T58	1,062	1,010	6,9%	84%
	Y4757	1,062	1,030	4,2%	52%
	1:1	1,062	1,015	6,2%	76%
	1:10	1,062	1,013	6,5%	79%

Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da levedura não *Saccharomyces* em teste são representadas pelo código iniciado em Y; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*:não *Saccharomyces* são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando as leveduras não *Saccharomyces* em teste.

Tabela 6. Consumo de açúcares, produção de metabólitos e porcentagem de álcool das cervejas produzidas em escala piloto*.

		Maltotriose (g/L)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)	ABV
	Mosto	34,2	59	9	0,88				
<i>Starmerella meliponinorum</i> UFMG-CM- Y5534	T58_1	1,04	0,2	0	0,37	3,4	0	53,9	6,8%
	T58_2	2,3	0,2	0	0,39	1,3	0	30,42	3,9%
	Y5534_1	0,54	0,2	0,7	0,8	7,63	0	69,35	8,8%
	1:1_1	0,6	0,3	0,36	0,24	3,6	0	69,35	8,7%
	1:1_2	0,24	0,2	0	0,2	1,68	0	42,25	5,3%
	1:10_1	0,65	0,3	0,19	0,18	4,26	0	71,64	9,0%
	1:10_2	0,28	0,2	0	0,12	2,96	0,1	46,7	5,9%
	T58_2	0	0	0	2,26	3,7	0	83,2	8,0%
	Y2681_1	12,27	0,2	0	0,5	4,3	0,2	56	7,0%
	Y2681_2	30,6	9,14	0	0,9	5,21	0,58	57,8	7,3%
	1:1_1	1,42	1,61	14,5	1,3	3,6	0,15	76	9,7%
	1:1_2	5,24	0	0,35	0	4,2	0,11	71	9,0%
	1:10_1	1,8	3,5	8,39	0,6	3,82	0,26	76	9,7%
	1:10_2	6,48	0,48	0,53	2,16	3,91	0,12	68,59	8,6%
<i>Torulaspota delbrueckii</i> UFMG-CM- Y4753	T58_1	0	0	0	0,9	0	0	44,4	5,6
	T58_2	19,78	0	0,32	2,06	2,56	0	59,1	7,4%
	Y4753_1	1,2	6,15	3,5	1,47	2,46	0,08	31,67	4,0%
	Y4753_2	7,31	41,91	13,7	1,9	2,57	0,07	33,54	4,2%
	1:1_1	3,44	0	0	0,6	2,22	0	45	5,7%
	1:1_2	3,7	0,6	2,2	2,11	3,09	0,15	49,3	6,4%
	1:10_1	1,56	0,24	0,12	1,05	3,6	0	62,9	7,9%
1:10_2	4,4	0,5	1,5	2,3	3,15	0,15	67	8,5%	
<i>Torulaspota delbrueckii</i> UFMG-CM- Y4757	T58_1	9,9	0,2	0	0,89	2,64	0	85	10,8%
	Y4757	2,4	4,62	1,54	2,84	4,65	0	70	8,8%
	1:1	5	0	0,3	1,79	2,4	0,1	56	7,1%
	1:10	2,74	0,23	0,98	1,23	1,76	0,1	41,86	5,2%

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da levedura não *Saccharomyces* em teste são representadas pelo código iniciado em Y; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*:não *Saccharomyces* são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando as leveduras não *Saccharomyces* em teste. ABV: álcool por volume.

5.4.2. Análises sensoriais

As quatro cervejas (produzidas com *S. cerevisiae* comercial T58 em cultivo puro, não *Saccharomyces* em cultivo puro e proporções 1:1 e 1:10 entre células das duas leveduras) obtidas a partir de cada brassagem individual foram, então, submetidas à análise sensorial. Neste ensaio, os provadores deram notas de 1 a 7 para cada atributo sensorial das bebidas e de 1 a 5 para a intenção de compra em relação às mesmas. As médias obtidas estão relacionadas na tabela 8.

Tabela 7. Média por atributo da nota obtida na análise sensorial pelas cervejas produzidas em escala piloto*.

		Cor	Aroma	Sabor	Corpo	Espuma	Global	Compra
<i>Starmarella meliponinorum</i> UFMG-CM- Y5534	T58_1	5,36	5,04	4,89	4,96	5,26	5,11	3,6
	T58_2	5,57	5,4	5,37	5,23	4,91	5,43	3,99
	Y5534_1	5,66	4,5	4,72	4,95	5,17	4,82	3,37
	1:1_1	5,57	4,99	5,19	5,2	5,07	5,21	3,64
	1:1_2	5,56	5,01	4,92	5,08	5,09	5	3,47
	1:10_1	5,57	4,99	4,85	5,1	5,12	5,05	3,57
	1:10_2	5,72	5,12	4,69	5	5,19	4,88	3,48
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM- Y2681	T58_2	5,54	5,26	5,23	5,22	4,86	5,18	3,73
	Y2681_1	5,35	5,13	5,05	5,1	5,29	5,13	3,79
	Y2681_2	5,68	4,61	4,3	4,57	4,8	4,58	3,01
	1:1_1	5,35	4,58	4,68	4,92	5,13	4,9	3,44
	1:1_2	5,54	4,69	4,41	4,57	4,5	4,43	3,01
	1:10_1	5,71	4,98	5,15	5,32	4,76	5,23	3,79
1:10_2	5,77	5,27	5,32	5,35	4,27	5,42	3,88	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM- Y4753	T58_1	5,64	5,21	5,11	4,97	4,74	5,15	3,61
	T58_2	5,46	4,98	4,92	5,03	4,73	5,11	3,62
	Y4753_1	5,67	5,18	4,73	4,97	4,33	4,92	3,23
	Y4753_2	5,56	4,81	4,08	4,65	4,16	4,25	2,68
	1:1_1	5,65	4,89	4,8	4,89	5,27	5,05	3,53
	1:1_2	5,46	5,02	4,65	5,05	4,22	4,83	3,29
	1:10_1	5,67	4,88	4,83	4,89	4,73	5	3,58
1:10_2	5,67	5,56	4,92	5,19	5,08	5,1	3,65	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> UFMG-CM- Y4757	T58	5,5	5,09	4,89	4,99	4,88	5,07	3,57
	Y4757	5,6	4,97	4,95	5,16	5,38	4,97	3,49
	1:1	5,47	4,81	4,89	4,94	4,97	4,95	3,7
	1:10	5,45	4,64	4,72	4,72	4,31	4,78	3,16

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da levedura não *Saccharomyces* em teste são representadas pelo código iniciado em Y; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*: não *Saccharomyces* são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando as leveduras não *Saccharomyces* em teste.

Para verificar a uniformidade da produção em escala piloto, os conjuntos de dados obtidos para todas as cervejas produzidas com a levedura *S. cerevisiae* T58

para os atributos aroma, sabor e impressão global foram submetidos à análise de variância pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn. Nenhum dos atributos mostrou diferença significativa entre as amostras de cervejas produzidas (ANEXO E), atestando a uniformidade das cervejas produzidas em diferentes bateladas. Análises de variância (Kruskal-Wallis) foram realizadas para comparar as cervejas obtidas a partir das duas brassagens realizadas para cada levedura testada, seguida de comparações múltiplas de Dunn (ANEXOS F, G, H e I).

As cervejas produzidas com diferentes tratamentos de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 apresentaram diferença significativa ($p=0,002$) entre as notas de aceitação obtidas no atributo aroma para as cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* T58 (5,22) e cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 (4,5) (Anexo F). Os demais atributos avaliados (sabor e impressão global) não mostraram diferenças significativas entre si ou em relação a cerveja produzida com *S. cerevisiae* T58. Desta forma, a cerveja produzida com cultivo puro da levedura *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 não foi tão bem aceita pelos provadores quanto a primeira.

Para as cervejas produzidas com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681, os resultados mostraram diferenças estatísticas significativas para alguns experimentos (ANEXO G). No aroma, a cerveja produzida com o tratamento 1:10 (nota aroma 5,12) (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) apresentou diferença significativa ($p=0,0231$) em relação a cerveja produzida com o cultivo misto na proporção 1:1 (nota aroma 4,63) (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681). Isto também foi observado para a cerveja produzida na proporção 1:1 (nota aroma 4,63) em relação a cerveja produzida com a levedura controle *S. cerevisiae* T58 (nota aroma 5,26) ($p=0,0059$). Para o atributo sabor, a cerveja produzida com a levedura controle *S. cerevisiae* T58 (nota sabor 5,23) apresentou diferença significativa quando comparada a produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 (nota sabor 4,67) ($p=0,0072$) e com a cerveja produzida com cultivo misto em proporção 1:1 (nota sabor 4,5) ($p=0,0005$). Ainda para sabor, diferenças significativas também foram observadas nas comparações das cervejas produzidas com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 (nota sabor 4,67) e com cultivo misto em proporção 1:10 (nota sabor 5,23) ($p=0,0031$) e entre as duas cervejas produzidas com cultivos mistos ($p=0,0002$). Quanto à impressão global, diferenças significativas foram observadas entre as cervejas obtidas com a levedura controle *S. cerevisiae* T58 (nota global 5,18) e cultivo

misto 1:1 (nota global 4,66) ($p=0,0032$) e entre as duas cervejas obtidas com as leveduras em cultivo mistos (nota global para proporções 1:1 e 1:10 4,66 e 5,32, respectivamente) ($p<0,001$).

Para as cervejas produzidas nas brassagens utilizando a levedura *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro e mistos (1:1 e 1:10 – *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii*), diferenças estatísticas foram encontradas apenas entre as cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* T58 controle e cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 para os atributos sabor e impressão global (ANEXO H). A cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi ligeiramente menos aceita que a produzida pela levedura controle. As cervejas produzidas a partir de fermentações com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 não apresentaram diferenças estatísticas significativas (ANEXO I) nas notas alcançadas na análise sensorial, sendo tão bem aceitas quanto à cerveja produzida com a levedura controle *S. cerevisiae* T58.

As cervejas produzidas com fermentações mistas (*S. cerevisiae*:*T. delbrueckii*) por Canonico e colaboradores (2016) foram submetidas a análises sensoriais descritivas. As cervejas produzidas com proporções 1:1 (*S. cerevisiae*:*T. delbrueckii*) apresentaram características de cereal, de tostado e de corpo alto (sensação de peso da bebida na boca), sem muita referência a notas frutadas/esterificadas. A cerveja produzida com proporção de 1:10 (*S. cerevisiae*: *T. delbrueckii*) foi caracterizadas pelos provadores com notas de álcool/solvente, malte, caramelo e envelhecimento. As cervejas produzidas com culturas puras de *T. delbrueckii* receberam dos provadores atributos como cítrico, fruta e corpo alto. O mosto utilizado no trabalho de Canônico e colaboradores atendia as características do estilo American Amber Ale (19A – BJCP), e a levedura comercial referência escolhida foi *S. cerevisiae* SafAle US-05, da empresa Fermentis.

5.4.3. Análise das cervejas por cromatografia gasosa e espectrometria de massas

A partir dos cromatogramas obtidos para cada uma das amostras de cerveja, foi gerada uma lista com os 50 compostos de maior área sob o pico (anexos J, L, M e N). Vinte compostos voláteis relevantes sensorialmente para a bebida foram determinados (tabelas 8, 9, 10 e 11). Em nenhuma das amostras foi detectado, entre os 50 compostos voláteis de maior área sob o pico, butanol (álcool, frutado), álcool amílico ativo (álcool, tostado, frutado), propanol (álcool, pungente), acetato de etila

(solvente, frutado), acetato de isobutila (maça, banana, floral), diacetil (manteiga) e acetaldeído (maça verde). No entanto, apesar de não detectados na análise realizada, estes compostos ainda podem estar presentes nas cervejas, e devido a um baixo limiar de percepção, serem relevantes sensorialmente. Além disso, alguns compostos podem ser erroneamente eluídos juntos.

O composto acetaldeído, que agrega características de maçã verde à bebida, é formado pelo metabolismo da levedura durante a fermentação da glicose e formação de álcool e está presente todas as cervejas em concentrações variadas (OLANIRAN et al, 2017). Dessa forma, a não detecção deste volátil nas amostras pode evidenciar uma limitação metodológica ou que a concentração do composto nas amostras não gerou uma área entre as 50 maiores áreas sob o pico, ponto de corte adotado neste trabalho.

Os compostos detectados para cada uma das leveduras são discutidos nas sessões 5.4.3.1 a 5.4.3.4. É importante destacar que os dados obtidos não refletem concentração dos compostos nas amostras, apenas quantidades relativas entre cada uma das cervejas analisadas. Isso não permite determinar se os mesmos se encontram em quantidades acima do limiar de percepção sensorial para cada composto. Os ésteres, quando acima do limiar de percepção, têm uma influência sensorial grande, porém a combinação destes, mesmo abaixo do limiar, pode ter efeito sensorial sinérgico (MEILGAARD, 1975; VERSTREPEN et al., 2003).

5.4.3.1. *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534

Na análise de componente principal realizada a partir das quantidades relativas dos compostos voláteis (tabela 8), observou-se a formação de três grupos distintos (figura 27). O primeiro grupo é composto pela cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534, o segundo pela cerveja produzida no primeiro experimento com cultivo misto em proporção 1:10 (*S. cerevisiae* comercial:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) e o terceiro com as demais cervejas. PC1 explicou a variação entre a cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 e demais amostras, enquanto PC2 explicou as diferenças encontradas entre a cerveja produzida no primeiro experimento com cultivo de proporção 1:10 (*S. cerevisiae* comercial:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) e demais amostras.

O gráfico de componentes principais dos *loadings* apontou contribuição dos compostos octanoato de etila (abacaxi) e ácido caprílico na PC1 (figura 28). A cerveja

produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 apresentou os maiores níveis de octanoato de etila e foi a única que não apresentou ácido caprílico. PC2 mostrou forte influência dos compostos decanoato de etila (conhaque, uva, pera), ácido caprílico (azedo, pungente, queijo) e 4-vinilguaicol (cravo, especiarias) entre as amostras. A cerveja produzida no primeiro experimento utilizando a proporção 1:10 (*S. cerevisiae* comercial:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) apresentou os maiores níveis destes 3 compostos. Observou-se também uma proximidade entre as amostras de cerveja produzidas nos dois experimentos com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 e amostras produzidas com cultivo misto na proporção 1:1 (*S. cerevisiae* comercial T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534).

O agrupamento hierárquico das amostras de cerveja produzidas com a levedura *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 e *S. cerevisiae* comercial T58 apontou a amostra produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 como a mais diferente entre elas, agrupando as demais de acordo com o lote de produção (figura 29). Isso pode indicar uma forte influência de variações no processo produtivo nas características sensoriais da bebida.

Tabela 8. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em escala piloto*.

Composto	Descritor sensorial	T58_1	T58_2	Y5534_1	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
<i>Alcoóis superiores</i>								
1-Butanol	Frutado, Álcool	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Feniletanol	Álcool, Frutado, Mel, Rosas, Vinho	0,145	0,167	0,191	0,125	0,112	0,168	0,079
2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, tostado, frutado, solvente	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Metil propanol (álcool isobutilíco)	Vínico, Amargo, maçã, cacau	0,000	0,024	0,022	0,045	0,022	0,015	0,020
3-Metil butanol (Álcool isoamílico)	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	0,253	0,242	0,283	0,251	0,201	0,293	0,193
Propan-1-ol (Propanol)	Álcool, pungente, bala	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ésteres</i>								
Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato de feniletila (2-feniletil acetato)	Flores, mel, rosa	0,111	0,139	0,129	0,112	0,098	0,138	0,034
Acetato de isoamila (acetato de isopentila)	Banana, maçã, solvente, esterificado	0,042	0,168	0,048	0,106	0,093	0,085	0,052
Acetato de isobutila	Maçã, Banana, Floral, Herbal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pêra	0,341	0,103	0,347	0,235	0,104	0,451	0,193
Hexanoato de etila (Etil caproato)	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,092	0,090	0,138	0,136	0,152	0,228	0,133
Ocatanoato de etila (Etil caprilato)	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,576	0,336	0,803	0,632	0,581	0,6252	0,554
<i>Ácidos</i>								
Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,000	0,134	0,000	0,000	0,050	0,000	0,117
Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	0,556	0,711	0,000	0,540	0,624	0,629	0,674
Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,356	0,392	0,315	0,372	0,402	0,582	0,483
<i>Fenol</i>								
4-vinil guaiacol	Cravo, curry, tempeiro	0,306	0,306	0,542	0,445	0,247	0,589	0,226
<i>Compostos carbonílicos</i>								
2,3-Butanediona (diacetil)	Manteiga	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da *S. Meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 são representadas pelo código Y5534; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando os cultivos com *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534.

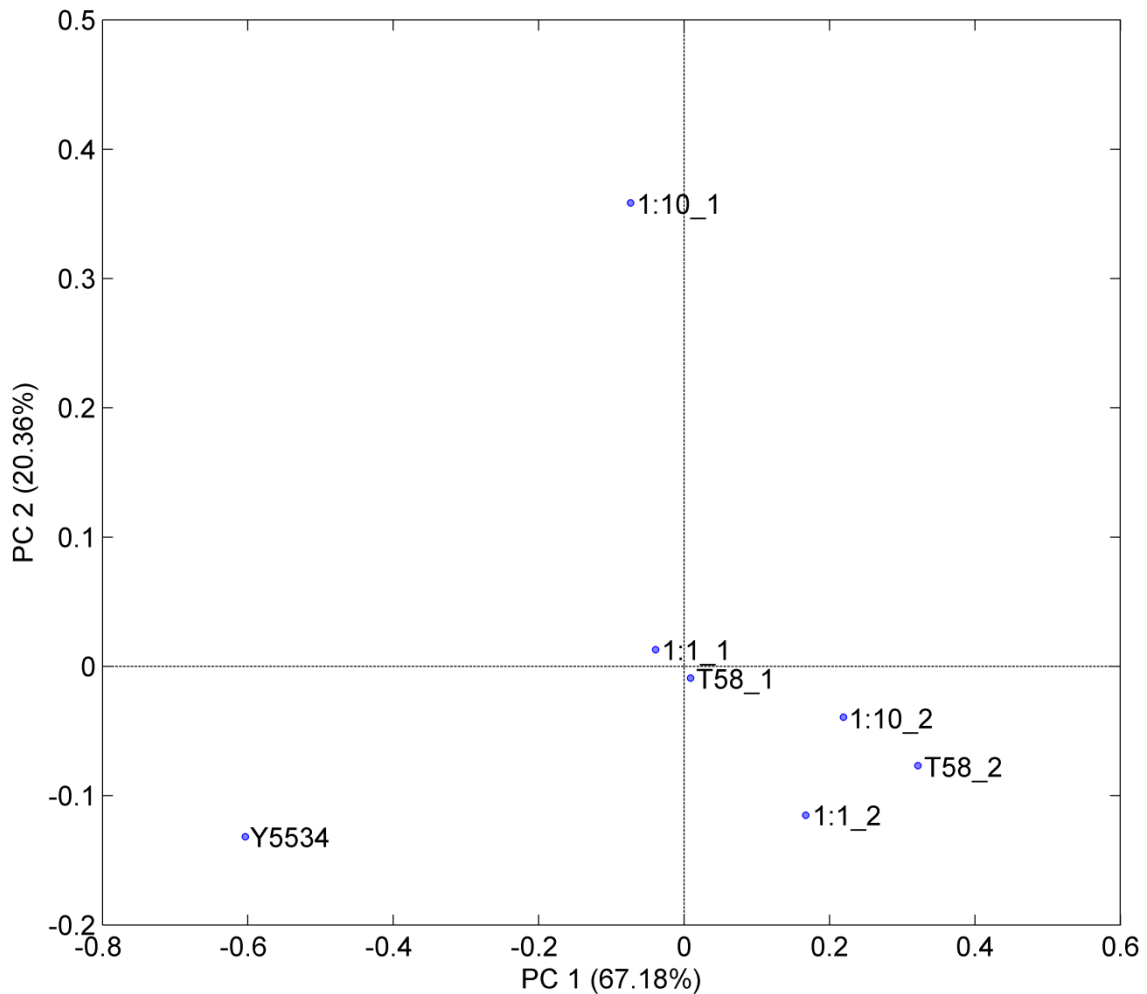


Figura 27. Análise de componentes principais de scores das quantidades relativas de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas em cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi representada com código Y5534; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

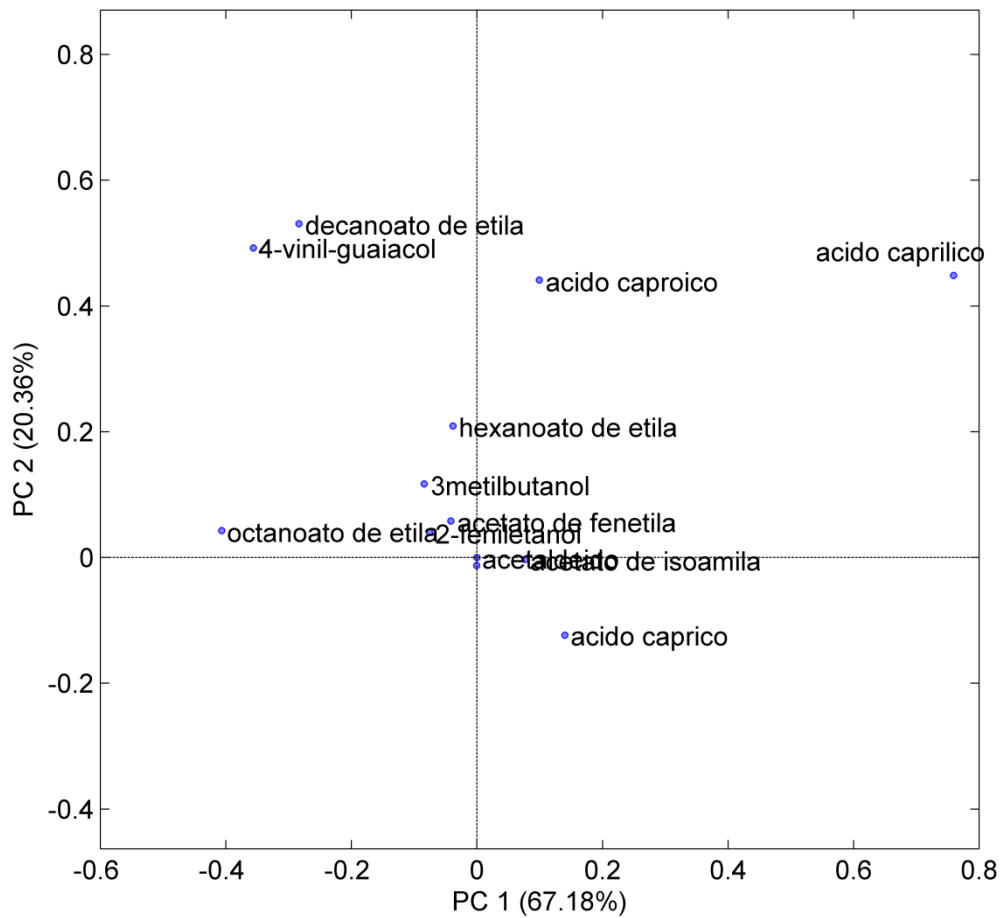


Figura 28. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).

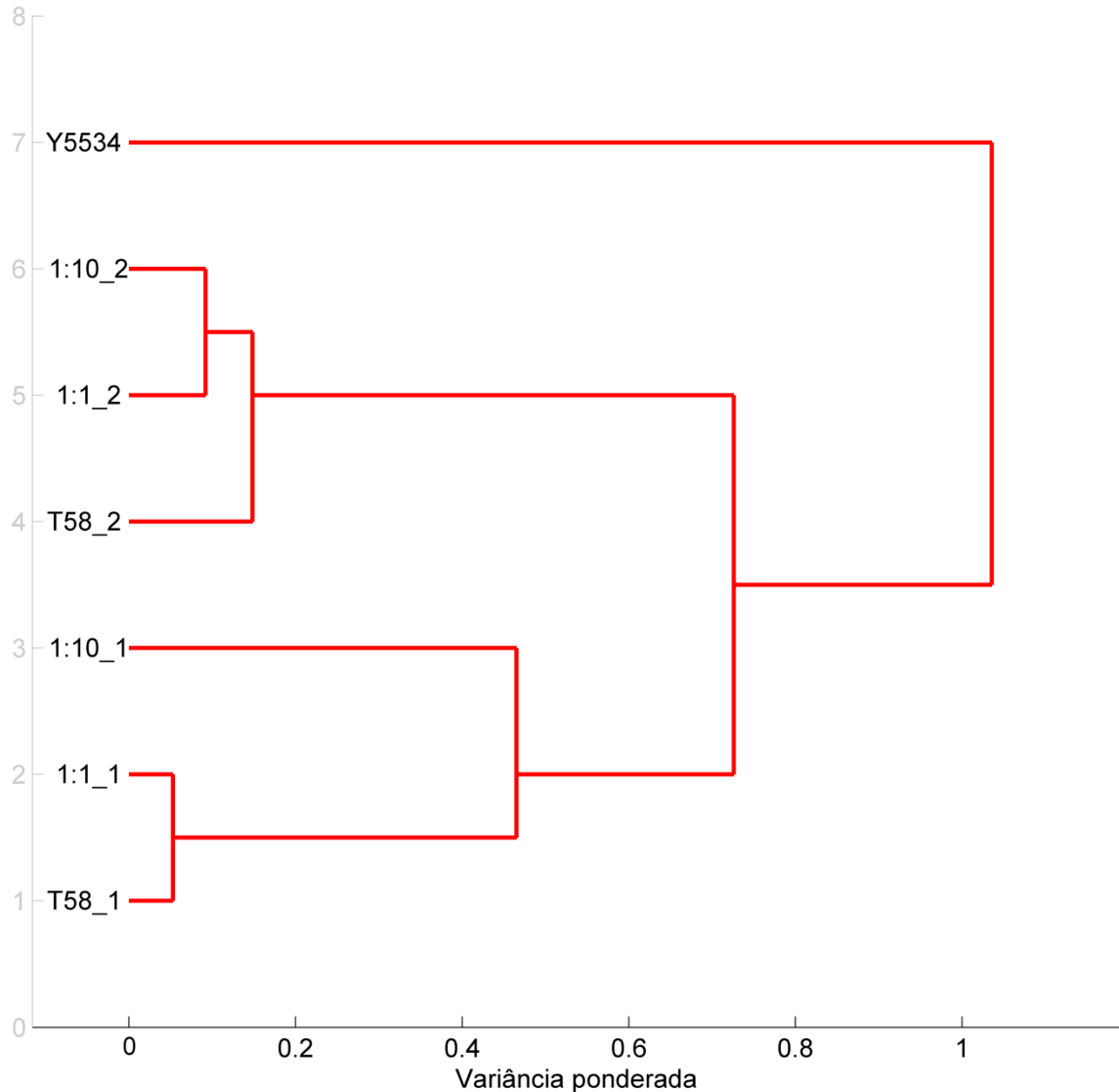


Figura 29. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Starmarella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi representada com código Y5534; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

5.4.3.2. *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y2681

Quantidades relativas de compostos voláteis detectados nas cervejas produzidas utilizando a levedura *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 e controle com *S. cerevisiae* comercial T58 são mostrados na tabela 9. Análise de componente principal realizada a partir das quantidades relativas dos compostos voláteis das cervejas produzidas com leveduras *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 mostrou quatro grupos de amostras distintos (figura 30). O primeiro é formado pela cerveja produzida no primeiro experimento utilizando o cultivo de proporção 1:10 (*S. cerevisiae* comercial:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681), o segundo pelas amostras de cervejas produzidas com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 no primeiro experimento e com cultivo misto em proporção 1:1 (*S. cerevisiae* comercial:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) no segundo experimento. O terceiro agrupamento de amostras é formado pelas cervejas produzidas com cultivo misto na proporção 1:1 (*S. cerevisiae* comercial:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) no primeiro experimento e no segundo experimento com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 e cultivo misto em proporção 1:10. A cerveja produzida durante o segundo experimento com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 se encontra separada, formando o quarto grupo.

A figura 31 mostra uma forte contribuição dos níveis do éster decanoato de etila e dos alcoóis superiores 2-fenil etanol e 3-metilbutanol na formação do primeiro e quarto grupos de amostras. A cerveja produzida no primeiro experimento com a proporção 1:10 apresentou níveis mais elevados do éster e mais baixos dos alcoóis superiores. Já a cerveja produzida no segundo experimento com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 apresentou níveis elevados de alcoóis superiores e baixos de ésteres. A alta produção de decanoato de etila foi responsável pela formação do segundo grupo de amostras. O agrupamento hierárquico das amostras não mostra tendências de agrupamento por lote ou por cultivo utilizado na produção das cervejas (figura 32).

Tabela 9. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em escala piloto*.

Composto	Descritor sensorial	T58_2	Y2681_1	Y2681_2	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
<i>Alcoóis superiores</i>								
1-Butanol	Frutado, Álcool	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Feniletanol	Álcool, Frutado, Mel, Rosas, Vinho	0,134	0,189	0,224	0,105	0,171	0,095	0,137
2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, tostado, frutado, solvente	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Metil propanol (álcool isobutilíco)	Vínico, Amargo, maçã, cacau	0,033	0,030	0,045	0,021	0,038	0,005	0,034
3-Metil butanol (Álcool isoamílico)	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	0,210	0,215	0,377	0,142	0,245	0,143	0,195
Propan-1-ol (Propanol)	Álcool, pungente, bala	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ésteres</i>								
Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato de feniletila (2-feniletil acetato)	Flores, mel, rosa	0,058	0,081	0,023	0,059	0,054	0,070	0,054
Acetato de isoamila (acetato de isopentila)	Banana, maçã, solvente, esterificado	0,089	0,090	0,000	0,081	0,087	0,084	0,081
Acetato de isobutila	Maçã, Banana, Floral, Herbal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pêra	0,159	0,126	0,097	0,176	0,104	0,109	0,155
Hexanoato de etila (Etil caproato)	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,036	0,016	0,008	0,036	0,037	0,043	0,056
Ocatanoato de etila (Etil caprilato)	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,119	0,145	0,026	0,182	0,133	0,283	0,144
<i>Ácidos</i>								
Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,049	0,000	0,051	0,065	0,028	0,052	0,033
Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	0,082	0,085	0,115	0,103	0,075	0,081	0,084
Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,020	0,017	0,027	0,026	0,016	0,033	0,019
<i>Fenol</i>								
4-vinil guaiacol	Cravo, curry, tempeiro	0,010	0,006	0,007	0,005	0,012	0,000	0,009
<i>Compostos carbonílicos</i>								
2,3-Butanediona (diacetil)	Manteiga	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 são representadas pelo código Y2681; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2881 são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando os cultivos com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681.

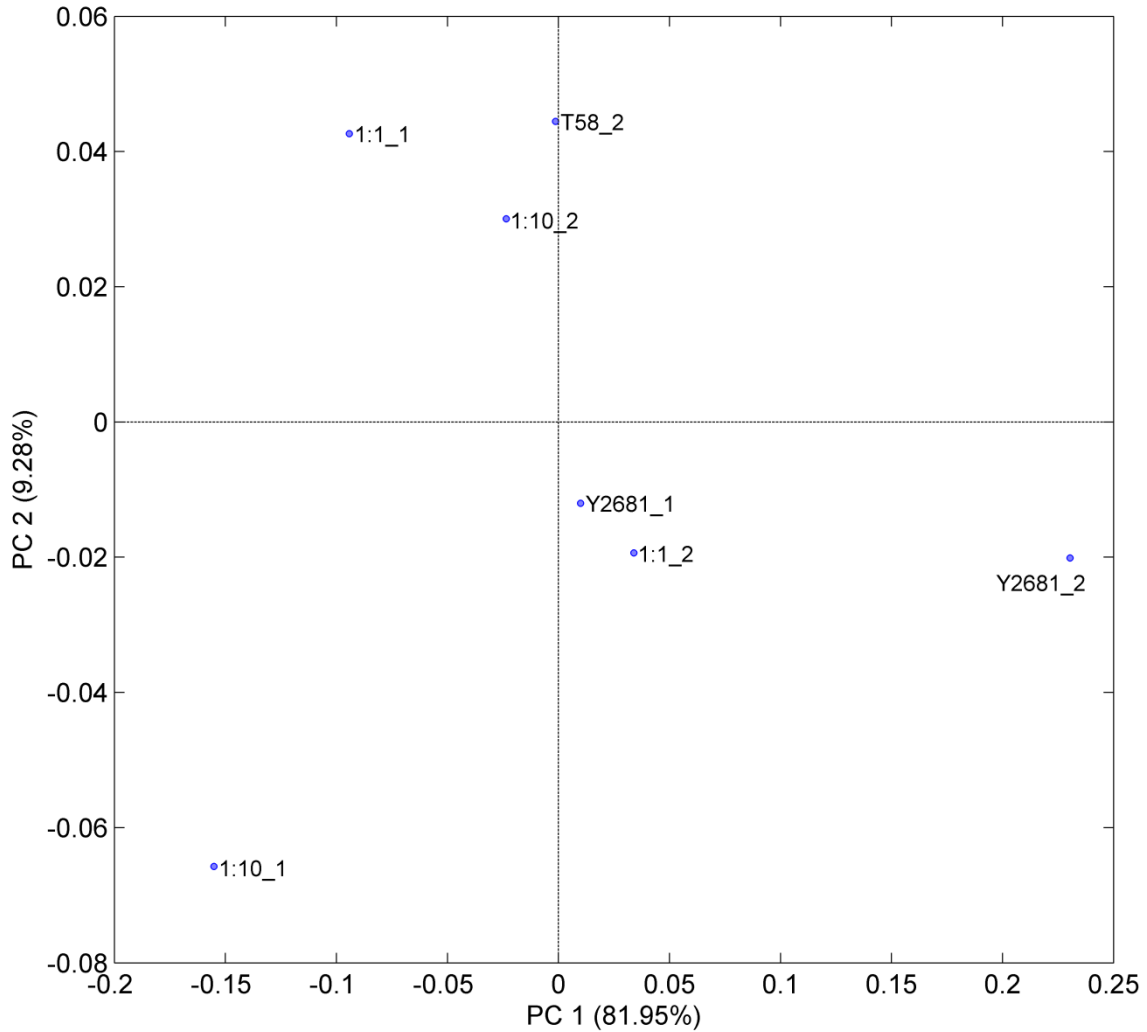


Figura 30. Análise de componentes principais dos *scores* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi representada com código Y2681; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

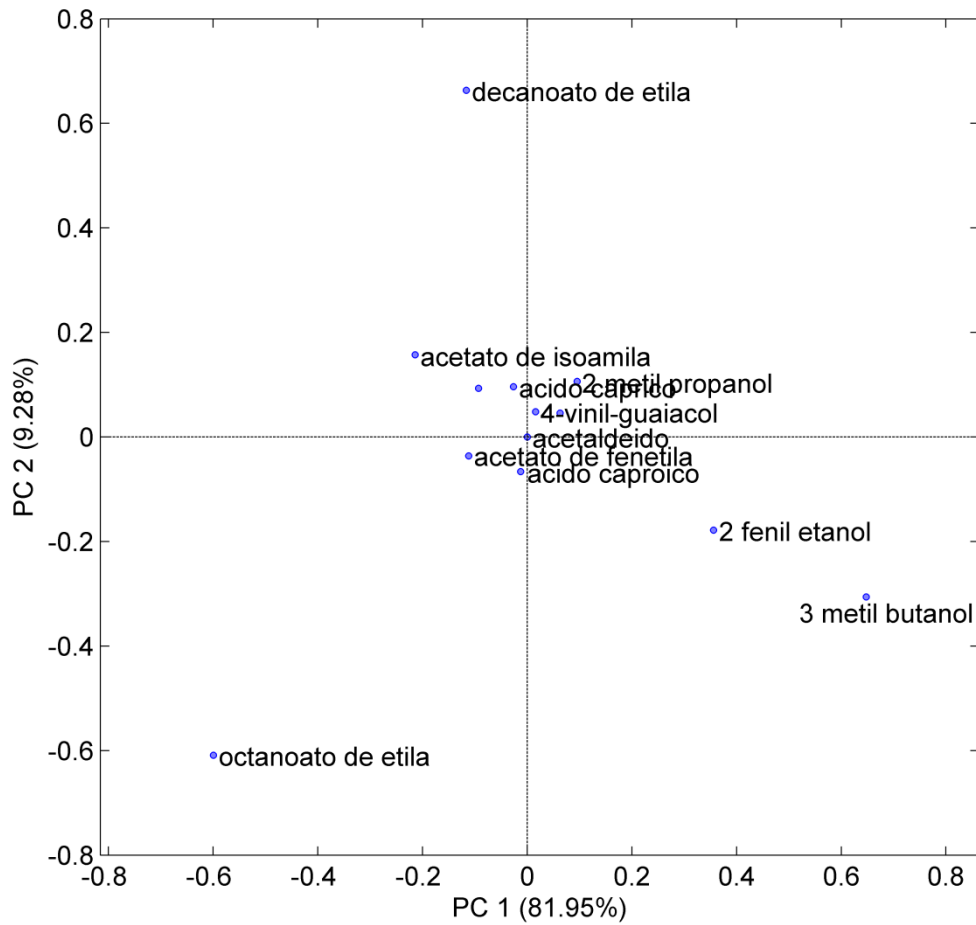


Figura 31. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).

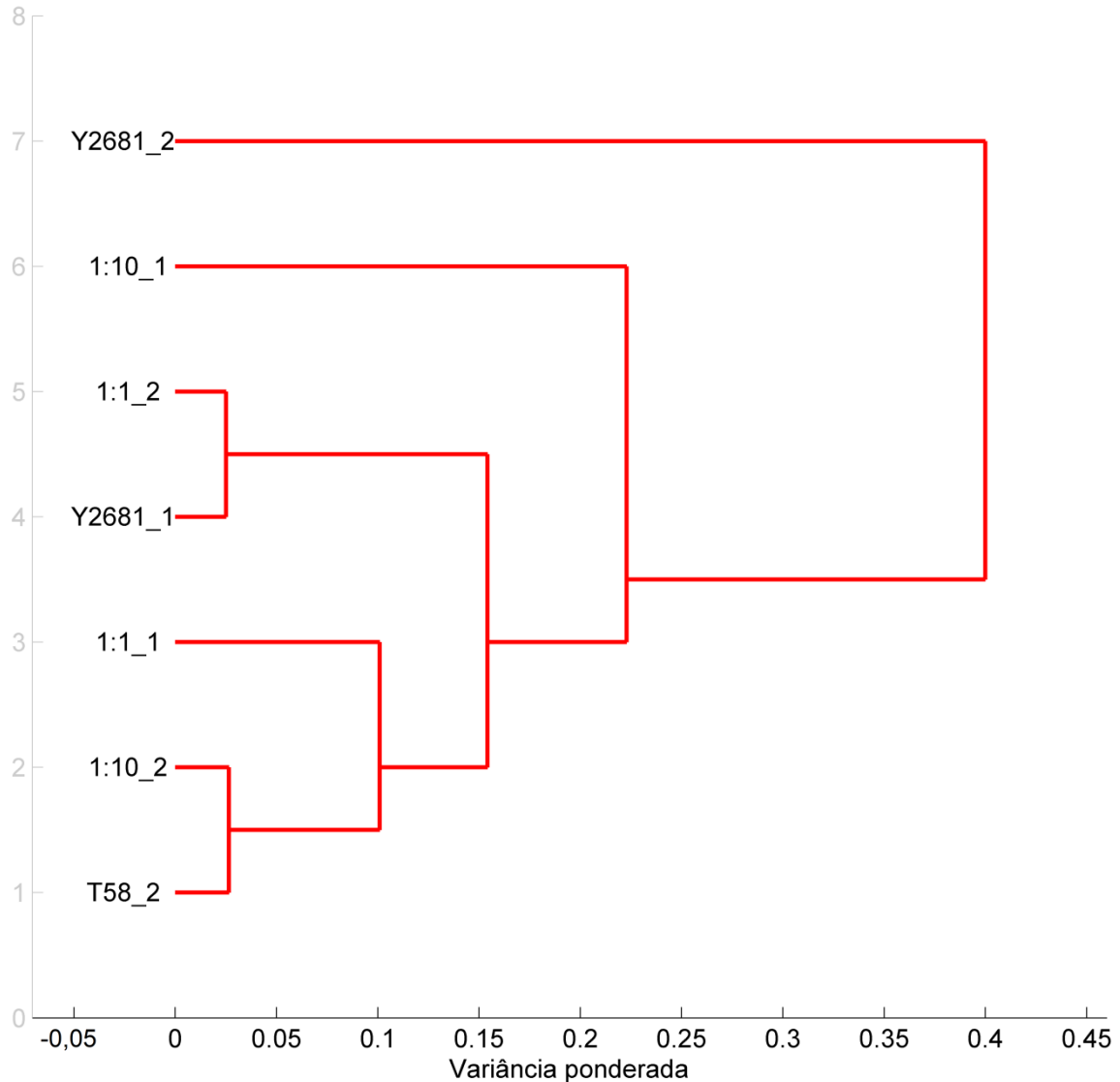


Figura 32. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y2681. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi representada com código Y2681; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

5.4.3.3. *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753

Quantidades relativas de compostos voláteis detectados nas cervejas produzidas utilizando a levedura *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 e controle com *S. cerevisiae* comercial T58 são mostrados na tabela 10. Análise de componente principal realizada a partir das quantidades relativas dos compostos voláteis das cervejas produzidas com leveduras *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 mostra principalmente a separação entre as cervejas produzidas com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 nos dois experimentos das demais cervejas na componente principal 1 (figura 33). Na componente principal 2 há tendência de separação das cervejas produzidas durante o primeiro e o segundo experimento.

O agrupamento e separação das amostras de cerveja produzidas com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 se deve principalmente pelos elevados níveis de 3-metil butanol e a não detecção de acetato de isoamila (figura 34). Por outro lado, a componente principal 2 apontou grande variação entre essas duas cervejas, que é explicada pelos altos níveis de 2-feniletanol e baixos níveis de decanoato de etila na cerveja produzida durante o primeiro experimento, contrário ao encontrado para a cerveja produzida no segundo experimento utilizando este cultivo.

Octanoato de etila, éster que agrega características de abacaxi, conhaque e floral na bebida (FEMA, 2020), foi detectado em todas as amostras e apresentaram níveis inferiores naquelas produzidas com cultivos puros de *S. cerevisiae* comercial T58 e *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 do que os encontrados nas cervejas produzidas com cultivos mistos entre essas duas leveduras. Isso sugere que o cultivo misto favorece a produção deste éster. O agrupamento hierárquico das amostras mostra uma tendência ao agrupamento por lotes, sendo as cervejas produzidas com cultivos puros de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 mais diferentes das demais amostras analisadas (figura 35).

Tabela 10. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em escala piloto*.

Composto	Descritor sensorial	T58_1	T58_2	Y4753_1	Y4753_2	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
<i>Alcoóis superiores</i>									
1-Butanol	Frutado, Álcool	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Feniletanol	Álcool, Frutado, Mel, Rosas, Vinho	0,175	0,105	0,289	0,140	0,153	0,101	0,176	0,084
2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, tostado, frutado, solvente	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Metil propanol (álcool isobutilíco)	Vínico, Amargo, maçã, cacau	0,008	0,014	0,064	0,009	0,010	0,020	0,027	0,003
3-Metil butanol (Álcool isoamílico)	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	0,204	0,133	0,436	0,421	0,211	0,167	0,233	0,155
Propan-1-ol (Propanol)	Álcool, pungente, bala	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ésteres</i>									
Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato de feniletila (2-feniletil acetato)	Flores, mel, rosa	0,09	0,063	0,022	0,021	0,096	0,049	0,053	0,036
Acetato de isoamila (acetato de isopentila)	Banana, maçã, solvente, esterificado	0,089	0,133	0,000	0,000	0,104	0,078	0,041	0,056
Acetato de isobutila	Maçã, Banana, Floral, Herbal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pêra	0,101	0,160	0,000	0,126	0,000	0,090	0,072	0,130
Hexanoato de etila (Etil caproato)	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,036	0,043	0,015	0,008	0,053	0,066	0,044	0,058
Ocatanoato de etila (Etil caprilato)	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,106	0,123	0,037	0,020	0,186	0,209	0,147	0,210
<i>Ácidos</i>									
Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,042	0,086	0,031	0,114	0,035	0,042	0,023	0,045
Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	0,115	0,112	0,085	0,098	0,114	0,130	0,138	0,174
Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,019	0,021	0,022	0,037	0,028	0,041	0,035	0,040
<i>Fenol</i>									
4-vinil guaiacol	Cravo, curry, tempeiro	0,015	0,008	0,000	0,005	0,011	0,009	0,012	0,010
<i>Compostos carbonílicos</i>									
2,3-Butanediona (diacetil)	Manteiga	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 são representadas pelo código Y4753; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada. Números 1 ou 2 após o código do cultivo utilizado se referem ao primeiro ou segundo experimento executado para as brassagens utilizando os cultivos com *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753.

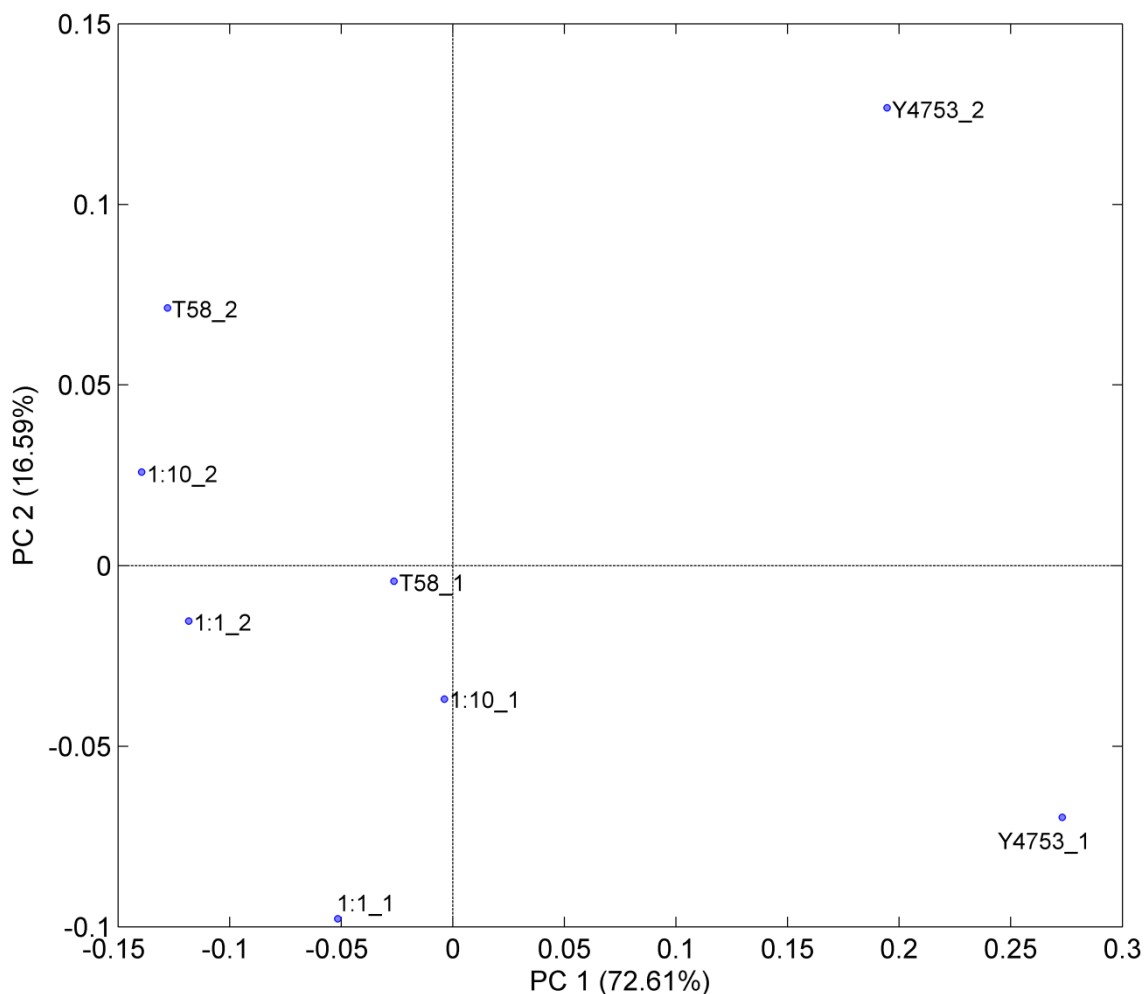


Figura 33. Análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi representada com código Y4753; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

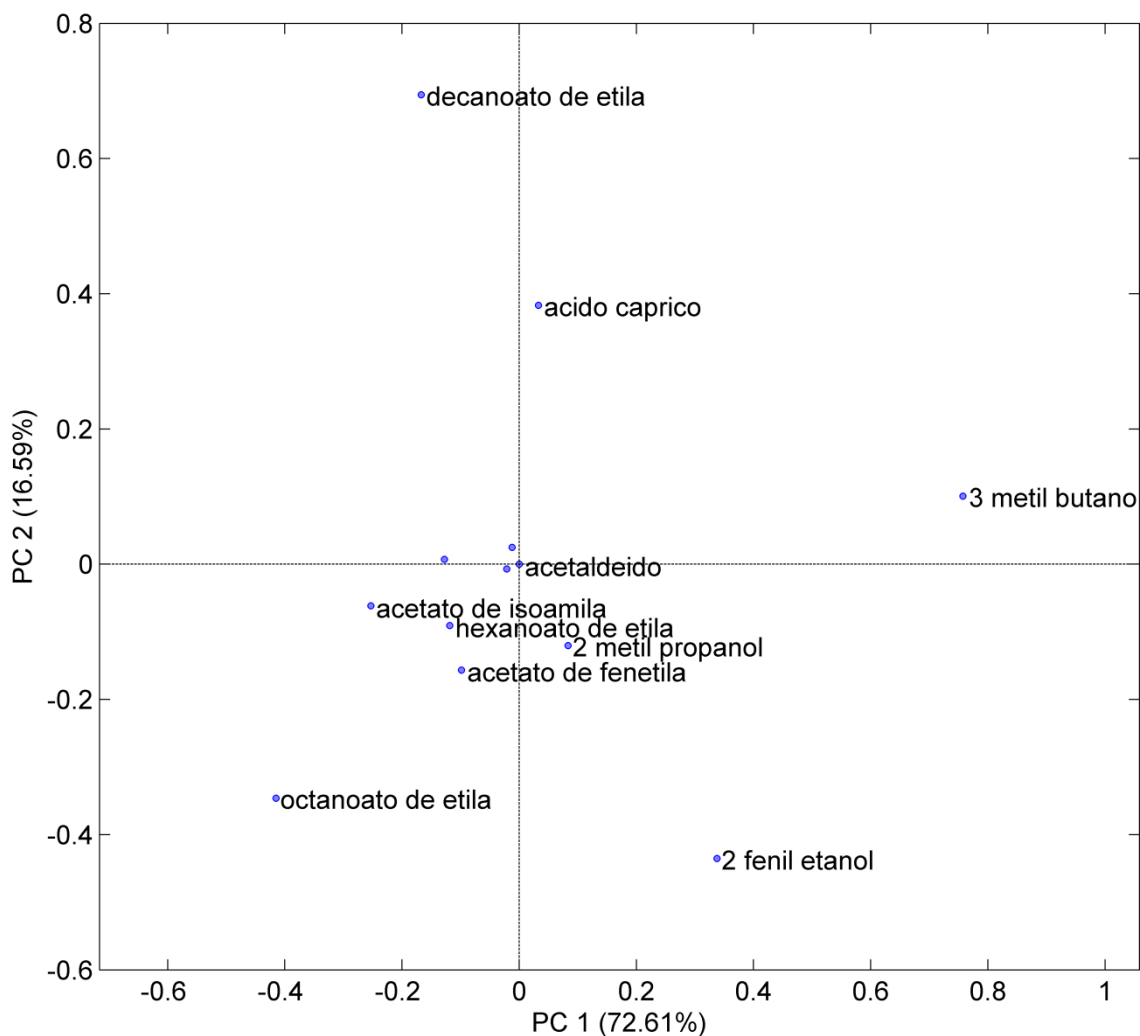


Figura 34. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).

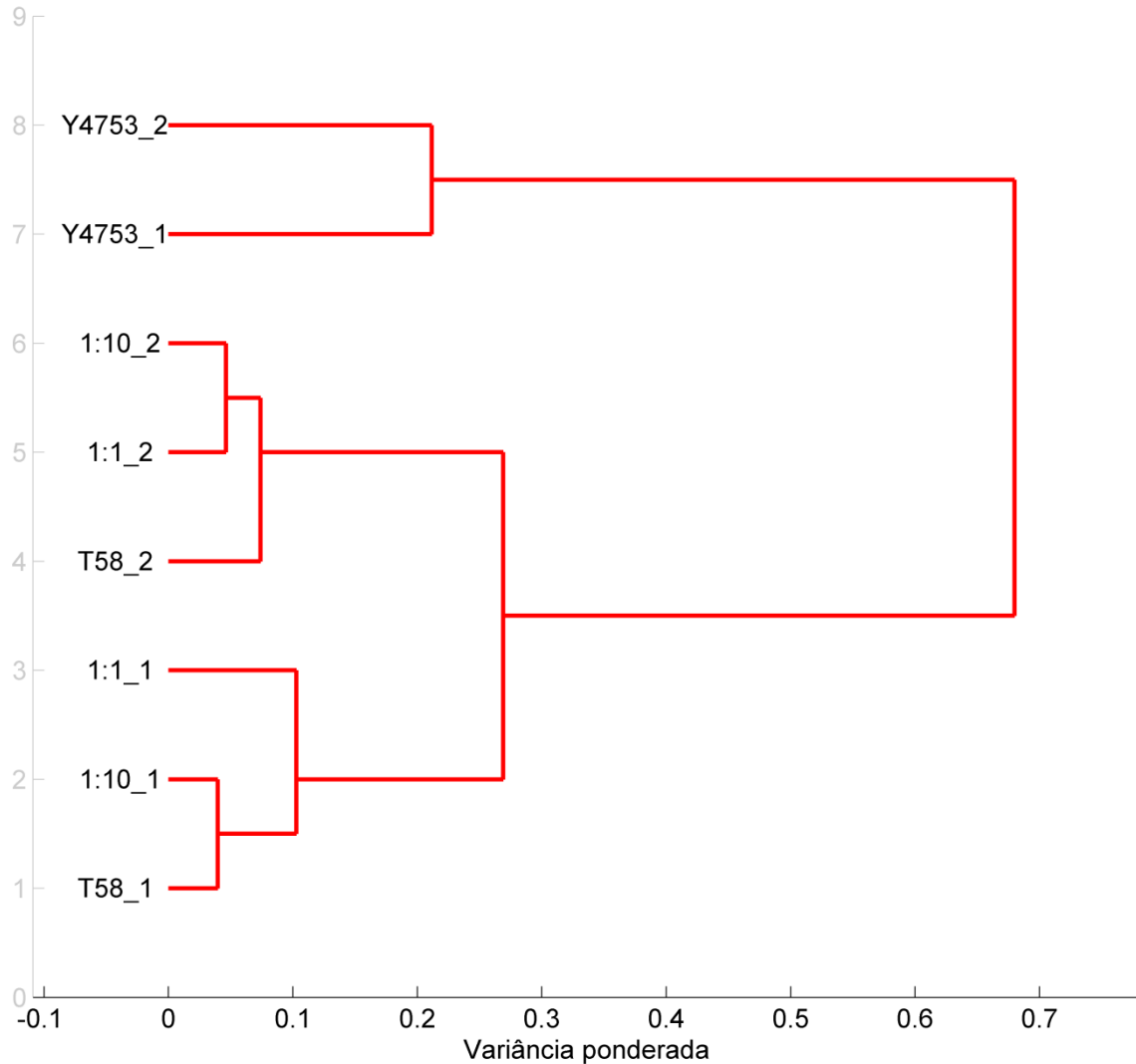


Figura 35. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi representada com código Y4653; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada. Números 1 ou 2 após os códigos das cervejas produzidas representam o primeiro ou o segundo experimento realizado utilizando o cultivo.

5.4.3.4. *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757

Quantidades relativas de compostos voláteis detectados nas cervejas produzidas utilizando a levedura *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 e controle com *S. cerevisiae* comercial T58 são mostrados na tabela 11. Não foi observada uma tendência forte de agrupamento entre as amostras de cerveja, mas aquelas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 e cultivo misto em proporção 1:1 (*S. cerevisiae* comercial:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757) foram mostradas mais próximas entre si na análise de componente principal (figura 36). Ao analisar o gráfico de componentes principais dos *loadings* das amostras, estas duas cervejas apresentaram níveis similares e mais elevados de acetato de fenetila, 2-fenil etanol e acetato de isoamila, em comparação às outras duas cervejas analisadas (figura 37). A cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 apresentou os maiores níveis do composto 3-metil butanol e ácido caprílico. A cerveja produzida com cultivo misto em proporção 1:10 (*S. cerevisiae* comercial:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757) apresentou os níveis mais elevados de octanoato de etila. O agrupamento hierárquico das amostras aponta a cerveja produzida com cultivo misto em proporção 1:10 como a mais diferente entre elas (figura 38).

Tabela 11. Quantidade relativa de compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 e escala piloto*.

Composto	Descritor sensorial	T58	Y4757	1:1	1:10
<i>Alcoóis superiores</i>					
1-Butanol	Frutado, Álcool	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Feniletanol	Álcool, Frutado, Mel, Rosas, Vinho	0,127	0,109	0,136	0,095
2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, tostado, frutado, solvente	0,000	0,000	0,000	0,000
2-Metil propanol (álcool isobutilíco)	Vínico, Amargo, maçã, cacau	0,024	0,032	0,025	0,015
3-Metil butanol (Álcool isoamílico)	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	0,166	0,227	0,169	0,134
Propan-1-ol (Propanol)	Álcool, pungente, bala	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ésteres</i>					
Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato de feniletila (2-feniletil acetato)	Flores, mel, rosa	0,073	0,045	0,083	0,039
Acetato de isoamila (acetato de isopentila)	Banana, maçã, solvente, esterificado	0,095	0,077	0,080	0,054
Acetato de isobutila	Maça, Banana, Floral, Herbal	0,000	0,000	0,000	0,000
Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pêra	0,175	0,094	0,114	0,200
Hexanoato de etila (Etil caproato)	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,044	0,065	0,045	0,037
Ocatanoato de etila (Etil caprilato)	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,156	0,139	0,146	0,210
<i>Ácidos</i>					
Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	0,000	0,000	0,000	0,000
Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,038	0,036	0,046	0,057
Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	0,079	0,140	0,115	0,121
Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,017	0,032	0,029	0,028
<i>Fenol</i>					
4-vinil guaiacol	Cravo, curry, tempeiro	0,007	0,004	0,012	0,009
<i>Compostos carbonílicos</i>					
2,3-Butanediona (diacetil)	Manteiga	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	0,000	0,000	0,000	0,000

*Cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 controle são representadas pelo código T58; cervejas produzidas com cultivo puro da *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 são representadas pelo código Y4757; cervejas produzidas com cultivos mistos *S. cerevisiae*: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 são representados pelos códigos 1:1 e 1:10, correspondente à proporção utilizada.

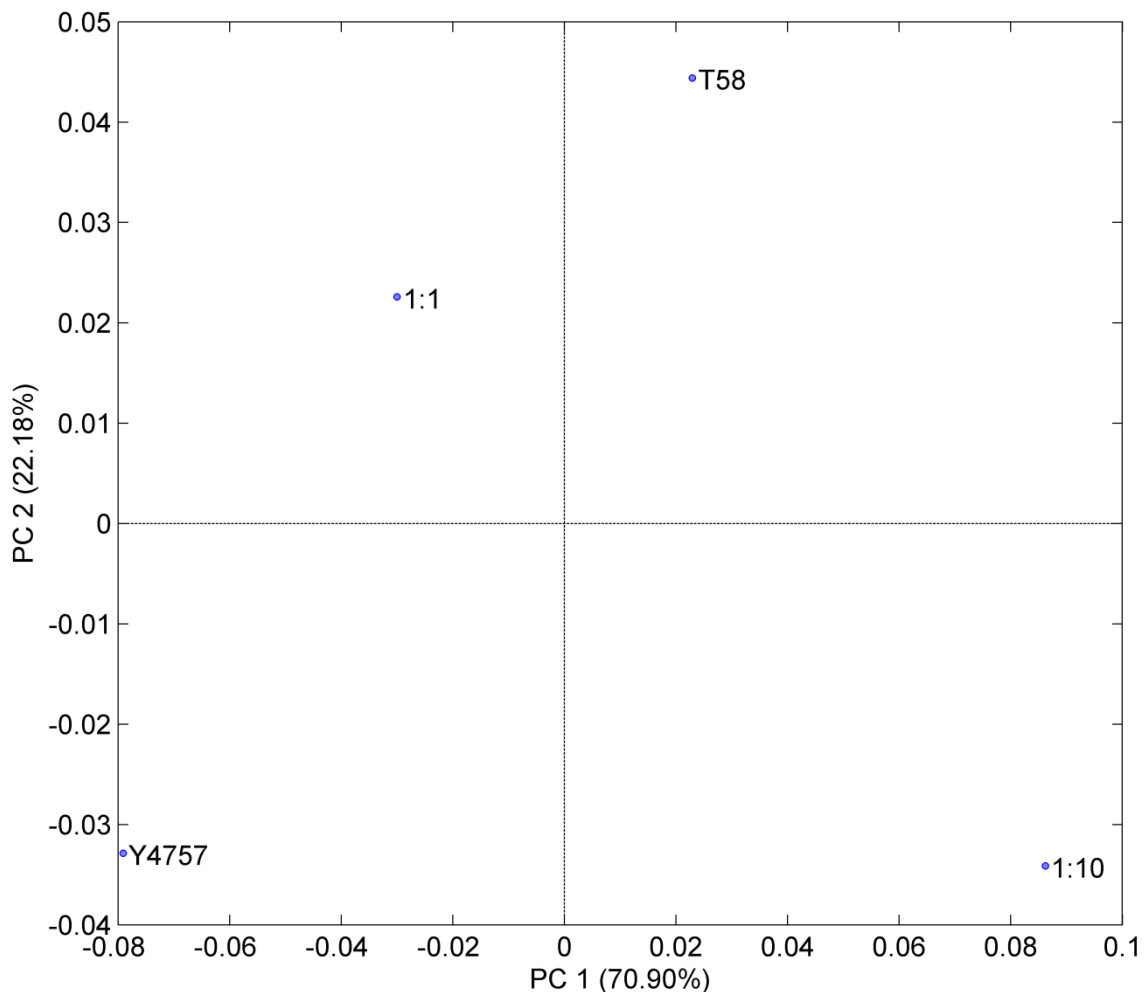


Figura 36. Análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2). Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi representada com código Y4757; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58: *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada.

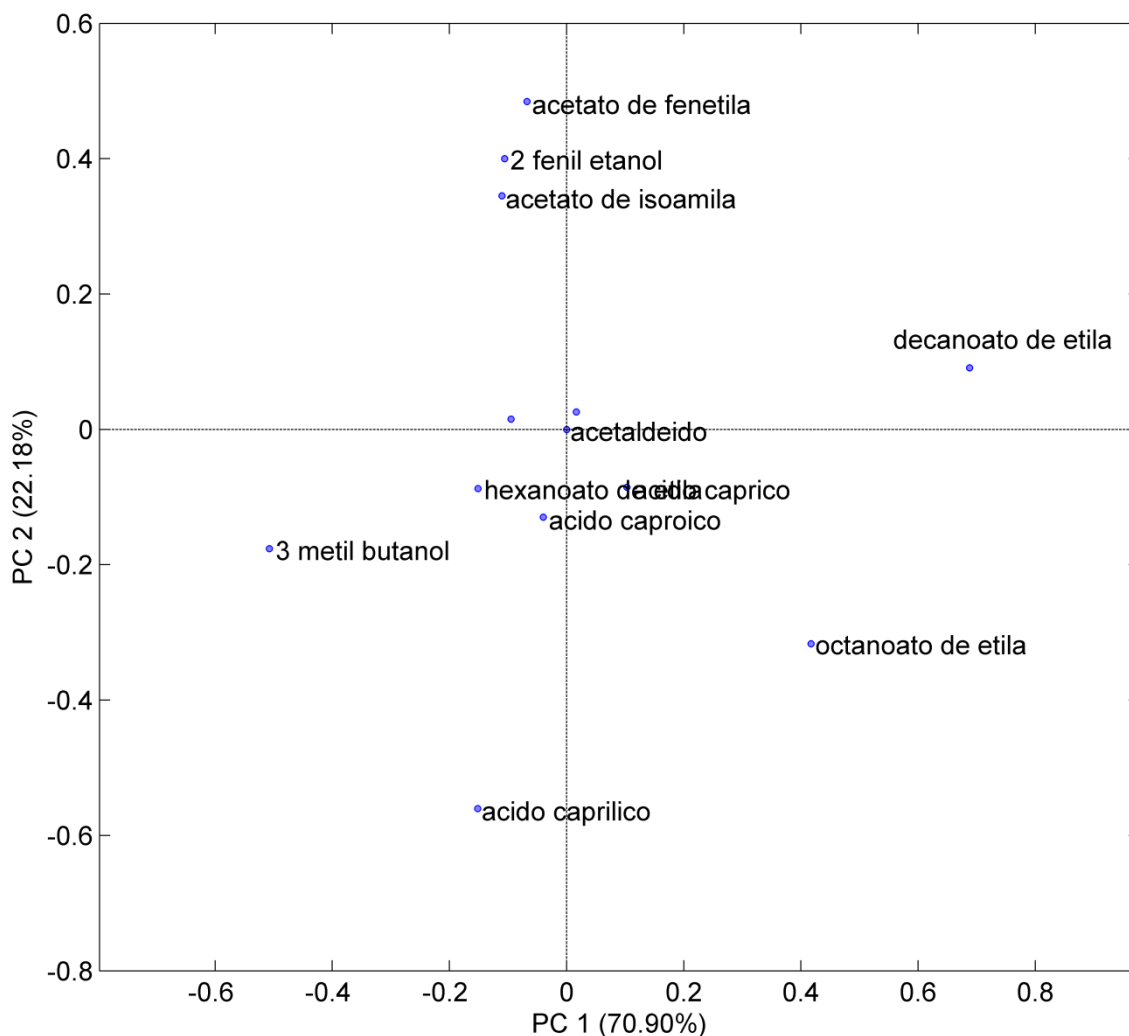


Figura 37. Análise de componentes principais dos *loadings* das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Eixo X representa a componente principal 1 (PC1) e eixo Y representa a componente principal 2 (PC2).

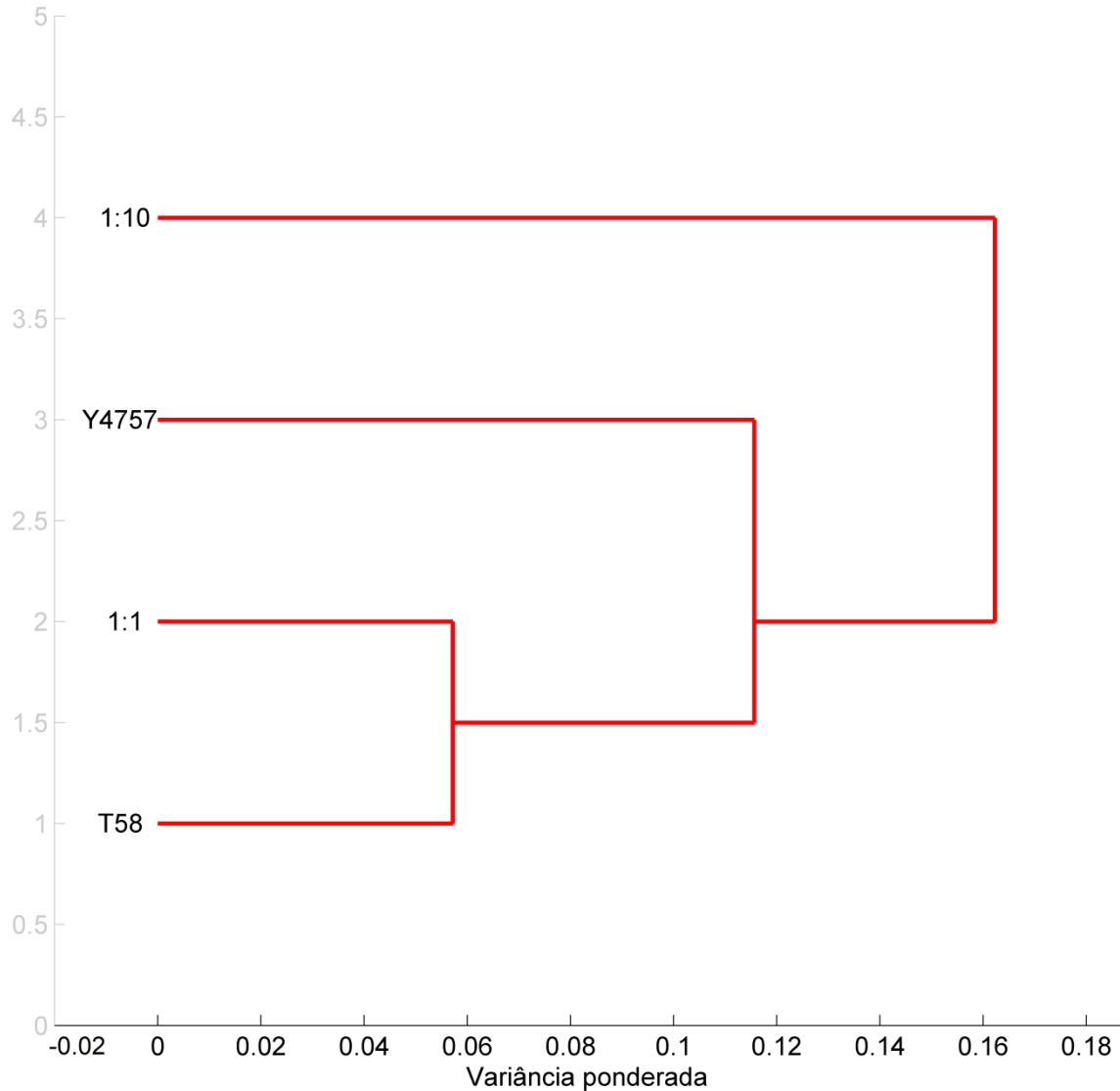


Figura 38. Agrupamento hierárquico utilizando análise de componentes principais dos scores das quantidades relativas dos compostos voláteis associados a aroma e sabor nas cervejas produzidas com *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y4757. Cervejas produzidas cultivo puro da levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspóra delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi representada com código Y4657; cultivos mistos nas proporções 1:1 e 1:10 entre *S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foram representadas pelos códigos 1:1 e 1:10, de acordo com a proporção utilizada.

De um modo geral, as linhagens de *T. delbrueckii* testadas no presente trabalho produziram maiores quantidades de álcoois superiores e produziram menos ésteres em relação à *S. cerevisiae* comercial T58. Canonico e colaboradores (2016) determinaram os níveis de compostos voláteis em cervejas produzidas com culturas pura e mista de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* comercial. Estes autores observaram menores níveis de acetato de etila nos cultivos mistos e menos ainda no cultivo puro de *T. delbrueckii* quando em comparação com *S. cerevisiae*. Os níveis de acetaldeído

foram maiores para as cervejas produzidas a partir de *T. delbrueckii* pura e com a proporção 1:1 entre as duas leveduras. *S. cerevisiae* apresentou maiores concentrações dos alcoóis amílico e isoamílico. Acetato de isoamila apresentou quantidade menor no cultivo puro com *T. delbrueckii*, assim como 2 feniletanol. Hexanoato de etila foi detectado em menores quantidades nos cultivos mistos, ao contrário de octanoato de etila e feniletil acetato, que tiveram suas concentrações aumentadas nas cervejas produzidas com proporções 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* comercial: levedura não *Saccharomyces*). Acetato de fenetila não foi detectado na cerveja produzida com a linhagem de *T. delbrueckii* em cultura pura.

As cervejas produzidas com cultivos puros de *S. cerevisiae* comercial T58 apresentaram, no geral, menos variância entre si nos compostos produzidos do que as demais cervejas, principalmente as produzidas com cultivos puros de levedura não *Saccharomyces*. Isso indica uma maior susceptibilidade das leveduras não *Saccharomyces* frente a variações nas condições físico-químicas do cultivo. As brassagens realizadas no presente trabalho foram conduzidas de acordo com práticas de fabricação caseira de cerveja, método menos controlado, que apresenta variações entre cada lote produzido. Fontes de variação podem ser: malte utilizado, moagem do malte, lúpulo utilizado, temperatura alcançada no resfriamento do mosto, manutenção da temperatura na geladeira adaptada para fermentação, entre outros. Isso mostra uma melhor adaptação da linhagem comercial de *S. cerevisiae* a um ambiente com variações nas condições de cultivo, sendo capaz de fermentar o mosto e produzir cerveja com perfil de compostos voláteis e características sensoriais reprodutíveis. As leveduras não *Saccharomyces* utilizadas no presente trabalho foram isoladas de diversos substratos ambientais ou fermentações espontâneas de bebidas, não sendo previamente adaptadas a fermentações controladas pra produção de bebidas e isso explica a não reprodutibilidade das cervejas produzidas.

6. CONCLUSÕES

- A habilidade de fermentação de maltose, em conjunto com a caracterização fisiológica das leveduras, é um método eficiente para seleção de espécies não *Saccharomyces* que possam ser empregadas na produção cervejeira;
- As linhagens de *Torulaspota delbrueckii* testadas apresentaram uma menor capacidade de atenuação de açúcares, quando em cultivo puro, do que a linhagem comercial de *S. cerevisiae* testada. No entanto, a combinação de linhagens de leveduras não *Saccharomyces* com linhagens comerciais de *S. cerevisiae* pode ser uma estratégia interessante na produção e cervejas, pois estas linhagens podem contribuir com novos aromas na cerveja, enquanto *S. cerevisiae*, poderá atenuar eficientemente os açúcares e produzir álcool;
- As cervejas produzidas a partir de cultivos puros com leveduras não *Saccharomyces* foram, no geral, menos aceitas que as demais;
- Para *Starmerella meliponinorum*, o cultivo misto na proporção 1:1 (*S. cerevisiae*: *S. meliponinorum*) apresenta maior potencial para produção de cerveja, pois foi a mais bem aceita pelos provadores em relação à cerveja produzida com cultivo misto em proporção 1:10 (*S. cerevisiae*: *S. meliponinorum*);
- Para *T. delbrueckii*, o cultivo misto de proporção 1:10 (*T. delbrueckii*:*S. cerevisiae* comercial) apresenta maior potencial para produção de cervejas, pois foi a mais bem aceita pelos provadores em duas das três linhagens testadas desta espécie;
- O presente trabalho foi o primeiro a produzir cerveja utilizando leveduras da espécie *Starmerella meliponinorum*;
- O presente trabalho mostrou que as leveduras ambientais estudadas podem contribuir no processo produtivo de cervejas, mas etapas de adaptação à fermentações industriais podem melhorar a reprodutibilidade do produto final;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPERSTEIN, L., GARDNER, J. M., SUNDSTROM, J. F., SUMBY, K. M., & JIRANEK, V. (2020). Yeast bioprospecting versus synthetic biology—which is better for innovative beverage fermentation?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1939-1953.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., & LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- ALVAREZ, F., DA MATA CORREA, L. F., ARAÚJO, T. M., MOTA, B. E. F., DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R., DE MIRANDA CASTRO, I., & BRANDÃO, R. L. (2014). Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. *International journal of food microbiology*, 190, 97-104.
- APONTE M. & BLAIOTTA G. (2016). Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG. *Front Microbiol* 7:809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00809>
- ARAÚJO, T. M., SOUZA, M. T., DINIZ, R. H. S., YAMAKAWA, C. K., SOARES, L. B., LENCZAK, J. L. & CASTRO, I. M. (2018). Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-18.
- AZZOLINI M, TOSI E, LORENZINI M, FINATO F, ZAPPAROLI G. (2015). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 31:277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>
- BACK, W., Brewery. (2005). In: *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*, W. Back, Ed. Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, pp. 10-112.
- BAMFORTH, C. W. (2003). *Beer: tap into art and science of brewing*. Second ed. New York: Oxford University Press.
- BAMFORTH, C. (2009). *Beer: tap into the art and science of brewing*. Oxford University Press.
- BELDA I, NAVASCUÉS E, MARQUINA D, SANTOS A, CALDERON F, BENITO S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspota delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>
- BELDA I, RUIZ J, BEISERT B, NAVASCUÉS E, MARQUINA D, CALDERÓN F, RAUHUT D, BENITO S, SANTOS A. (2017). Influence of *Torulaspota delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int J Food Microbiol* 257:183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>

- BELLOCH, C., ORLIC, S., BARRIO, E., & QUEROL, A. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International journal of food microbiology*, 122(1), 188-195.
- BIAZON, C. L., BRAMBILLA, R., RIGACCI, A., PIZZOLATO, T. M., & DOS SANTOS, J. H. Z. (2009). Combining silica-based adsorbents and spme fibers in the extraction of the volatiles of beer: an exploratory study. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(2), 549–556.
- Bing, J., Han, P. J., Liu, W. Q., Wang, Q. M., & Bai, F. Y. (2014). Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Current biology*, 24(10), R380-R381.
- BIZAJ E, CORDENTE A, BELLON J. (2012). A breeding strategy to harness flavour diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulphide production. *FEMS Yeast Res.* 12:456–65.
- BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, Charles W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, n. 2, p. 157-172.
- BOULTON, C. (2013). *Encyclopaedia of brewing*. Chichester, UK: Wiley Blackwell.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. (2001). *Brewing yeast and fermentation*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- BOYNTON, P. J., & GREIG, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, 31(12), 449-462.
- BRASIL. (1994). Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994: dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- BRASIL. (2009). Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas (Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- BRASIL. (2019). Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. (DECRETO Nº 9.902, DE 8 DE JULHO DE 2019). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- BREWERS ASSOCIATION. National beer Sales and production data. Disponível em <https://www.brewersassociation.org/statistics/national-beer-sales-production-data/>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BREWERS ASSOCIATION. Numbers of brewries. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/statistics/number-of-breweries/>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C.; BROOKES, P.; STEVENS, R. (2004). *Brewing: science and practice*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.

- BUNKER, H. J. (1955). The survival of pathogenic bacteria in beer. Proc. Eur. Brew. Conv. Congr. Baden-Baden, Elsevier: Amsterdam, pp. 330-341.
- BUZZINI P. & MARTINI A. (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. J Appl Microbiol 93(6):1020–1025
- CANONICO L., COMITINI F. & CIANI M. (2017). *Torulaspota delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int J Food Microbiol 259:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017>
- CANONICO, L., AGARBATI, A., COMITINI, F., & CIANI, M. (2016). *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. Food microbiology, 56, 45-51.
- CAPOZZI V., GAROFALO C., CHIRIATTI M.A., GRIECO F. & SPANO G. (2015) Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. Microbiol Res 181:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- CARLQUIST M, GIBSON B & KARAGUL Y. (2015). Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeast – a minireview. Yeast 32:123–43.
- CASEY G.P. (1990). Yeast selection in brewing, p 65–112. In Panchal CJ (ed), Yeast strain selection. Marcel Dekker, New York, NY.
- CASEY G.P. (1996). Practical applications of pulsed field electrophoresis and yeast chromosome fingerprinting in brewing. QA and R&D. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 33:1–10.
- CODON AC, BENITEZ T, KORHOLA M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:154 –163.
- CONGRESSO NACIONAL, Projeto de Lei 5191/13: dispõe sobre a produção de cerveja artesanal. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1067570&filename=PL+5191/2013http://www.alesc.sc.gov.br/expediente/2008/PLC_0031_3_2008.rtf> . Acesso em: 12 jul. 2018.
- CONTRERAS A., HIDALGO C., HENSCHKE P.A., CHAMBERS P.J., CURTIN C. & VARELA C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. Appl Environ Microbiol 80:1670–1678. <https://doi.org/10.1128/aem.03780-13>
- CORRAN, H.S. (1975). A history of brewing. David & Charles, London, UK.
- DAY, R. E., HIGGINS, V. J., ROGERS, P. J. & DAWES, I. W. (2002). Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. Yeast, v. 19, n. 1999, p. 1015– 1027.
- DE PONZZES-GOMES C.M., DE MÉLO D.L.F.M., SANTANA C.A., PEREIRA G.E., MENDONÇA M.O.C., GOMES F.C.O., OLIVEIRA E.S., BARBOSA A.M.,

- TRINDADE R.C., ROSA C.A. (2014) *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the São Francisco Valley. *Braz J Microbiol* 45(2):411–416
- DOS SANTOS NETO, Á. J. (2010). Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*, 55.
- DUARTE, W. F., AMORIM, J. C., SCHWAN, R. F. (2013). The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, n. 1, p. 175-194.
- DUFOUR, J., K. VERSTREPEN, G. DERDELINCKX, G. (2003). *Yeast in Foods*. Cambridge, U.K.: Woodhead.
- EDER, R., MARÍA, L., CONTI, F., & ROSA, A. L. (2018). Differences between indigenous yeast populations in spontaneously fermenting musts from *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. grapes harvested in the same geographic location. *Frontiers in microbiology*, 9, 1320.
- EIZAGUIRRE, J. I., PERIS, D., RODRÍGUEZ, M. E., LOPES, C. A., DE LOS RÍOS, P., HITTINGER, C. T., & LIBKIND, D. (2018). Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environmental microbiology*, 20(10), 3732-3743.
- ENGLEZOS, V., RANTSIOU, K., CRAVERO, F., TORCHIO, F., GIACOSA, S., ORTIZ-JULIEN, A. & COCOLIN, L. (2018a). Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food research international*, 109, 298-309.
- ENGLEZOS, V., RANTSIOU, K., CRAVERO, F., TORCHIO, F., POLLON, M., FRACASSETTI, D. & COCOLIN, L. (2018b). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food chemistry*, 257, 350-360.
- FIGUEIREDO, B. I. C., SARAIVA, M. A. F., DE SOUZA PIMENTA, P. P., DE SOUZA TESTASICCA, M. C., SAMPAIO, G. M. S., DA CUNHA, A. C. & BRANDÃO, R. L. (2017). New lager brewery strains obtained by crossing techniques using cachaça (Brazilian spirit) yeasts. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01582.
- FIGUEREDO, B. I. C. (2016). Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas. Dissertação (Dissertação em Biotecnologia) – UFOP. Ouro Preto.
- FIX, G. (1999). *Principles of brewing science: A study of serious brewing issues*. Brewers Publications.
- FLEET G. (2006). The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. In: Querol A, Fleet GH (eds) *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–12.
- FORGET, C. (1988). *Dictionary of beer and brewing*. Brewers Publication, Boulder, Colorado, USA.

- GAMERO, A.; QUINTILLA, R.; GROENEWALD, M.; ALKEMA, W.; BOEKHOUT, T.; HAZELWOOD, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.*
- GIBSON, B., GEERTMAN, J., HITTINGER, C. T., KROGERUS, K., LIBKIND, D., LOUIS, E. J. & SAMPAIO, J. P. (2017). New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS yeast research*, 17(4).
- HAMMOND J. (1996). Yeast genetics, p 45– 82. In Priest FG, Campbell I (ed), *Brewing microbiology*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- HARAYAMA, K., HAYASE, F., & KATO, H. (1994). Evaluation by a multivariate analysis of the stale flavor formed while storing beer. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(9), 1595–1598.
- JESPERSEN, L.; CESAR, L. B.; MEADEN, P. G.; JAKOBSEN, M. (1999). Multiple alpha-glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 2, p. 450–456.
- JOLLY N.P., VARELA C. & PRETORIUS I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14(2):215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- JUNIOR, W. J. F. L., NADAI, C., CREPALDE, L. T., DE OLIVEIRA, V. S., DE MATOS, A. D., GIACOMINI, A., & CORICH, V. (2019). Potential use of *Starmerella bacillaris* as fermentation starter for the production of low-alcohol beverages obtained from unripe grapes. *International journal of food microbiology*, 303, 1-8.
- KANG Y.M., CHOI J.E., KOMAKECH R., PARK J.H., KIM D.W., CHO K.M., KANG S.M., CHOI S.H., SONG K.C., RYU C.M., LEE K.C., LEE J.S. (2017) Characterization of a novel yeast species *Metschnikowia persimmonesis* KCTC 12991BP (KIOM G15050 type strain) isolated from a medicinal plant, Korean persimmon calyx. *AMB Expr* 7(1):199. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0503-1>
- LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P.; KODAMAE Y.; YAMADA, T. SUZUKI, M.; MIKATA. Emend. ROSA, LACHANCE, STARMER, BARKER BOWLES & SCHALAG-EDLER. (1999). *The yeasts, a Taxonomic Study*. 5th edition, Elsevier, Amsterdam.
- LI, F., LIU H., KUN-FARKAS, G., & KISS, Z. (2015). Quantitative Analysis of Flavor Volatiles in Beer Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Flame Ionization Detection (HS-SPME-GC-FID). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(3), 261-265.
- LIBKIND D, HITTINGER CT, VALERIO E, GONCALVES C, DOVER J, JOHNSTON M, GONCALVES P, SAMPAIO JP. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:14539 –14544.

- LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BONER, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.*, v.33, p.413-426.
- LOIRA I, VEJARANO R, BAÑUELOS MA, MORATA A, TESFAYE W, UTHURRY C, VILLA A, CINTORA I, SUÁREZ-LEPE JA. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT Food Sci Technol* 59:915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- LOPES, M. R. (2015). Leveduras fermentadoras de celobiose isoladas de ecossistemas Brasileiros. Tese (doutorado em microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- MENEZES, C.H.P.S. (2019). Microbiologia da cerveja: do básico ao avançado. 1ªed. Brasil: Livraria da física.
- MICHEL M, KOPECKA J, MEIER-DORNBERG T. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. *Yeast* 33:129–44.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Anuário da cerveja no Brasil 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018>. Acesso em 04 dez. 2019.
- MONTANDON, G. G. (2016). Seleção de linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cervejas de alta fermentação. Tese (Tese em Microbiologia) – UFMG. Belo Horizonte.
- MORADO, R. (2017). Larousse da cerveja. São Paulo: Alaúde editorial.
- MUKHERJEE, V., RADECKA, D., AERTS, G., VERSTREPEN, K. J., LIEVENS, B., & THEVELEIN, J. M. (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 216.
- MURTEY, M. RAMASAMY, P. (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy–Life Sciences. In: *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. InTech.
- NELSON, M. (2005). The barbarian’s beverage: a history of beer in ancient europe. New York, USA: Routledge.
- NISIOTOU, A., SGOUROS, G., MALLOUCHOS, A., NISIOTIS, C. S., MICHAELIDIS, C., TASSOU, C., & BANILAS, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International*, 111, 498-508.
- OCVIRK, M., MLINARIČ, N. K., & KOŠIR, I. J. (2018). Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3627–3635.

- OLANIRAN, A. O., HIRALAL, L., MOKOENA, M. P., & PILLAY, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13-23.
- PIRES, E. J., TEIXEIRA, J. A., BRANYIK, T., & VICENTE, A. A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma—A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949
- PRETORIUS I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16(8):675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615))
- PRIEST F.G, Campbell I. (2003). *Brewing microbiology*. Plenum Publishers, New York, NY.
- RAVASIO, D., CARLIN, S., BOEKHOUT, T., GROENEWALD, M., VRHOVSEK, U., WALTHER, A., & WENDLAND, J. (2018). Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. *Fermentation*, 4(1), 15.
- REID, A.; INGERSON-MAHAR, M. (2012). *If the Yeast ain't happy, ain't nobody happy: The Microbiology of Beer*. Washington, USA American Society for Microbiology.
- RENAULT P, COULON J, DE REVEL G, BARBE J-C, BELY M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii/S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int J Food Microbiol.*, 207:40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- RENAULT P, COULON J, MOINE V, THIBON C, BELY M. (2016). Enhanced 3-sulfanylnhexan-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. *Front Microbiol* 7:293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>
- ROSSI, S., SILEONI, V., PERRETTI, G., & MARCONI, O. (2014). Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 919–928.
- SAERENS S, SWIEGERS JH. (2014). Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties. Patent US20140234480 A1.
- Salazar, A. N., de Vries, A. G., van den Broek, M., Brouwers, N., de la Torre Cortes, P., Kuijpers, N., ... & Abeel, T. (2019). Nanopore sequencing and comparative genome analysis confirm lager-brewing yeasts originated from a single hybridization. *bioRxiv*, 603480.
- SILVA, M. S., ARRUDA, L. M., XAVIER, P. L., RAMÍREZ, M. X. D., DA SILVEIRA, F. A., SANTANA, W. C. & ELLER, M. R. (2019). Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-12.

- STEENSELS, J., DAENEN, L., MALCORPS, P., DERDELINCKX, G., VERACHTERT, H., & VERSTREPEN, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24-38.
- STEENSELS, J., SNOEK, T., MEERSMAN, E., NICOLINO, M. P., VOORDECKERS, K., & VERSTREPEN, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 947-995.
- STERNES P.R., LEE D., KUTYNA D.R. & BORNEMAN A.R. (2017). A combined metabarcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience* 6(7):1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>
- SULAIMAN J., GAN H.M., YIN W.F. & CHAN K.G. (2014). Microbial succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine. *Front Microbiol* 5:556. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00556>
- SUZUKI, K. (2011). 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 117, n. 2, p. 131-155.
- SWANGKEAW, J., VICHITPHAN, S., BUTZKE, C. E., & VICHITPHAN, K. (2009). The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. *Annals of microbiology*, 59(2), 335.
- TAMANG J.P., WATANABE K. & HOLZAPFEL W.H. (2016) Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol* 7:377–377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- TAMANG, J. P. & KAILASAPATHY, K. (2010). *Fermented Foods and Beverages of the World*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- TATARIDIS P., KANELIS A., LOGOTHETIS S. (2013). Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zb Mat Srp Prir Nauk* 124:415–26.
- TEIXEIRA, A. C., MARINI, M. M., NICOLI, J. R., ANTONINI, Y., MARTINS, R. P., LACHANCE, M. A., & ROSA, C. A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 339-343.
- THOMPSON-WITRICK, K. A., ROUSEFF, R. L., CADAWALLADER, K. R., DUNCAN, S. E., EIGEL, W. N., TANKO, J. M. (2015). Comparison of two extraction techniques, solid-phase microextraction versus continuous liquid-liquid extraction/solvent-assisted flavour evaporation, for the analysis of flavor compounds in Gueuze Lambic beer. *Journal of Food Science*, 80(3), C571–C576.
- TURAKAINEN H., KRISTO P. & KORHOLA M. (1998). Consideration of the evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* Mel gene family on the basis of the nucleotide-sequences of the genes and their flanking regions. *Yeast* 10: 1559–1568.
- VAN DER AA KUHLE A. & JESPERSEN L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43:205–213.

- VARELA, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- VAUGHAN-MARTINI A. & KURTZMAN C. P. (1985). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:508 –511.
- VIEJO, C. G., FUENTES, S., TORRICO, D. D., GODBOLE, A., & DUNSHEA, F. R. (2019). Chemical characterization of aromas in beer and their effect on consumers liking. *Food chemistry*, 293, 479-485.
- VRIESEKOOP, F., KRAHL, M., HUCKER, B., & MENZ, G. (2012). 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 335-345.
- ZAMBONELLI, C.; SOLLI, M.; GUERRA, D. (1984). Study of H₂S non-producing strains of wine yeasts. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, v. 34, p. 7–15.

Anexo A – Termo de Consentimento livre e esclarecido dos provadores

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Provadores

Provador: _____

Orientador: Carlos Augusto Rosa (DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA/INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG)

Coordenadora do LASEC/ALM/FAFAR/UFMG e Colaboradora: Profa. Dra. Camila Argenta Fante

Aluna de Pós-Graduação: Marina Perbone León

Você está convidado a participar de um teste sensorial de cerveja. Este teste é parte integrante do projeto de pesquisa de Mestrado de Marina Perbone León do Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Podem participar pessoas que apreciem este produto e que não apresentem nenhuma restrição à ingestão de ingredientes de sua composição, a saber: malte e lúpulo. O objetivo deste trabalho é conhecer a opinião do consumidor sobre amostras de cerveja.

Você irá receber amostras de cerveja e avaliará as mesmas em fichas próprias para esta análise entregues pelo avaliador expressando sua opinião em relação aos produtos; além desta, será necessário o preenchimento de uma ficha com dados pessoais de forma anônima para caracterizar os grupos de provadores. Tais atividades serão realizadas em momento único em laboratório de análise sensorial, à medida que for provando os produtos oferecidos.

Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa. Apesar de o produto ser submetido à avaliação microbiológica prévia e somente ser oferecido à população em caso de comprovada a segurança alimentar, você pode não gostar (sabor, textura, aroma) e/ou sentir algum desconforto ao provar o produto, sendo assim, você em nenhum momento será obrigado (a) a engoli-lo sendo totalmente permitido o descarte do produto em local apropriado para tal atividade. As análises serão realizadas de forma anônima, garantindo o sigilo ao avaliador, sendo assim, não se sinta constrangido (a) ao responder o questionário de avaliação do produto.

Esta pesquisa não apresenta nenhum benefício individual direto aos provadores. Os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantidos o sigilo das informações e sua privacidade.

A SUA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO TEM CARÁTER VOLUNTÁRIO E NÃO LHE TRARÁ NENHUM TIPO DE ÔNUS OU REMUNERAÇÃO.

Desde já agradecemos sua colaboração.

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa e Marina Perbone León – Fone: (31) 3409-2739

Profa. Dra. Camila Argenta Fante – Fone: (31) 3409-6922

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Avenida Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II 2º andar sala 2005 Campus Pampulha 31270-901 Belo Horizonte MG Brasil
Telefax: (31) 3499-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Compreendi e concordo com as informações que me foram transmitidas e, portanto, aceito participar como voluntário neste projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Nome: _____

Telefones de contato: _____

E-mail: _____

Anexo B – Questionário de Coleta de Dados para Análise Sensorial de Cerveja

Questionário de Coleta de Dados para Análise Sensorial de Cerveja

Número do Proveedor: _____

Caso tenha concordado em participar deste projeto, por favor, complete o questionário com todas as informações solicitadas, as quais serão mantidas confidenciais. Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome:	
Telefone:	E-mail:

Gênero: Masculino Feminino

Idade: < 18 18-25 26-35 36-45 46-55 56-65

Escolaridade:

- Ensino fundamental incompleto
 Ensino fundamental completo
 Ensino médio incompleto
 Ensino médio completo
 Superior incompleto
 Superior completo
 Pós-graduação: Especialização
 Pós-graduação: Mestrado/Doutorado

Profissão:

Renda familiar mensal:

- 1 a 5 salários mínimos
 > 5 a 10 salários mínimos
 > 10 a 20 salários mínimos
 > 20 a 30 salários mínimos
 > 30 salários mínimos

Você está fazendo uso de algum medicamento?

- Sim Não

Qual(is)?

Você está seguindo alguma dieta especial?

- Sim Não

Qual(is)?

- Você tem alguma restrição de saúde que impossibilite ou torne não recomendado o consumo de cerveja?**

- Sim Não

Qual(is)?

- Você tem alguma restrição de saúde que impossibilite ou torne não recomendado o consumo de malte e lúpulo?**

- Sim Não

Qual(is)?

Você gosta de cerveja?

- Sim Não

Com que frequência você consome cerveja?

- Nunca
 Raramente
 Esporadicamente
 Frequentemente
 Diariamente

Você já consumiu cerveja artesanal?

- Sim Não

Qual(is)?

Qual(is) o(s) tipo(s) de cerveja(s) você costuma consumir? (Pode ser marcada mais de uma opção)

- Comercial nacional (ex: Brahma, Skol, Kaiser, Antártica, Itaipava, Bohemia)
 Comercial nacional puro malte (ex: Eisenbahn, Terezópolis, Serramalte, Brahma Extra Lager, Wals)
 Comercial internacional (ex: Heineken, Stella Artois, Budweiser, Corona, Quilmes)
 Artesanal nacional
 Importadas
 Trigo
 Outros:

Em qual temperatura você costuma consumir a cerveja? (Pode ser marcada mais de uma opção)

- Quente
 Temperatura ambiente
 Gelada (10°C)
 Gelada (5°C)
 Temperatura inferior

Assinale abaixo os momentos que você prefere consumir cerveja. (Pode ser marcada mais de uma opção).

- Café da manhã
 Lanche da manhã
 Aperitivo
 Almoço
 Lanche da tarde
 Jantar
 Lanche da noite
 Outros:

Anexo C – Ficha de avaliação de teste de aceitação e intenção de compra de Cerveja

Ficha de Avaliação do Teste de Aceitação e Intenção de Compra da Cerveja

Nome:	Data:
-------	-------

Você está recebendo uma amostra de cerveja. Por favor, avalie para todos os atributos o quanto você gostou ou desgostou do produto utilizando a escala abaixo:

- 1 - Desgostei extremamente
- 2 - Desgostei muito
- 3 - Desgostei
- 4 - Não gostei nem desgostei
- 5 - Gostei
- 6 - Gostei muito
- 7 - Gostei extremamente

Código da amostra (3 dígitos)	Espuma	Cor (aparência)	Aroma	Sabor	Corpo (sensação na boca)	Impressão global

Com base em sua opinião sobre as amostras, indique, utilizando a escala abaixo, sua intenção de compra.

- 1 – Certamente não compraria
- 2 – Possivelmente não compraria
- 3 – Talvez comprasse, talvez não comprasse
- 4 – Possivelmente compraria
- 5 – Certamente compraria

Código da amostra (3 dígitos)	Intenção de compra

Comentários:

Anexo D – Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn entre os resultados obtidos no teste de tolerância a condições de estresse para levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial T58 e leveduras não *Saccharomyces*

Teste de Kruskal-Wallis		
Valor de P	0,6978	
Significativo (p<0,05)?	Não	
Teste de multiplas comparações de Dunn	Significativo?	Valor de P
T58 vs. UFMG-CM-Y4753	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y5575	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4757	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y2681	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4743	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4908	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y5554	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4796	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4910	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4790	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4922	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4789	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y5582	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y4727	Não	>0,9999
T58 vs. UFMG-CM-Y5534	Não	>0,9999

Levedura comercial *S. cerevisiae* T58 foi representada pelo código T58, demais leveduras não *Saccharomyces* foram representadas por código iniciado em UFMG-CM.

Anexo E – Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn das notas obtidas por todas as cervejas controle produzidas com *S. cerevisiae* T58 comercial em escala piloto para os atributos aroma, sabor e impressão global

	Significativo?	Valor de P		
		Aroma	Sabor	Impressão global
Teste de Kruskal-Wallis test	Não	0,1913	0,1147	0,5461
<i>Múltiplas comparações de Dunn</i>				
T58_1 vs. T58_2	Não	0,6252	0,6694	>0,9999
T58_1 vs. T58_4	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_1 vs. T58_5	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_1 vs. T58_6	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_1 vs. T58_7	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_2 vs. T58_4	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_2 vs. T58_5	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_2 vs. T58_6	Não	0,4119	0,4988	>0,9999
T58_2 vs. T58_7	Não	>0,9999	0,2071	>0,9999
T58_4 vs. T58_5	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_4 vs. T58_6	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_4 vs. T58_7	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_5 vs. T58_6	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_5 vs. T58_7	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T58_6 vs. T58_7	Não	>0,9999	>0,9999	>0,9999

As cervejas produzidas com *S. cerevisiae* T58 comercial estão listadas com o código T58, seguido de um numeral de 1 a 7, que representa diferentes brassagens durante as quais estas cervejas foram produzidas.

Anexo F - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura *S. cerevisiae* comercial T58 em cultivo puro, *Starmerella meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) em escala piloto

	AROMA		SABOR		IMPRESSÃO GLOBAL	
	Significativo	Valor de P	Significativo	Valor de P	Significativo?	Valor de P
Teste de Kruskal-Wallis	Sim	0,0042	Não	0,1122	Não	0,088
T58 vs. Y5534	Sim	0,002	Não	0,1635	Não	0,0717
T58 vs. 1:1	Não	0,8908	Não	>0,9999	Não	>0,9999
T58 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
Y5534 vs. 1:1	Não	0,1904	Não	0,3405	Não	0,614
Y5534 vs. 1:10	Não	0,1536	Não	>0,9999	Não	>0,9999
1:1 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999

Cerveja produzida com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foi identificada com o código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi identificada com o código Y5534; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as duas leveduras na proporção 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534) foram identificadas como 1:1 e 1:10, respectivamente.

Anexo G - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura *S. cerevisiae* comercial T58 em cultivo puro, *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) em escala piloto

	AROMA		SABOR		IMPRESSÃO GLOBAL	
	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P
Teste de Kruskal-Wallis	Sim	0,018	Sim	<0,0001	Sim	<0,0001
T58 vs. Y2681	Não	0,094	Sim	0,0072	Não	0,1799
T58 vs. 1:1	Sim	0,0059	Sim	0,0005	Sim	0,0032
T58 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
Y2681 vs. 1:1	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
Y2681 vs. 1:10	Não	0,2642	Sim	0,0031	Não	0,0064
1:1 vs. 1:10	Sim	0,0231	Sim	0,0002	Sim	<0,0001

Cerveja produzida com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foi identificada com o código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi identificada com o código Y2681; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as duas leveduras na proporção 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y2681) foram identificadas como 1:1 e 1:10, respectivamente.

Anexo H - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura *S. cerevisiae* comercial T58 em cultivo puro, *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753) em escala piloto

	AROMA		SABOR		IMPRESSÃO GLOBAL	
	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P
Teste de Kruskal-Wallis	Não	0,574	Sim	0,0067	Sim	0,0044
T58 vs Y4753	Não	>0,9999	Sim	0,0053	Sim	0,0027
T58 vs. 1:1	Não	>0,9999	Não	0,7248	Não	0,6462
T58 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
Y4753 vs. 1:1	Não	>0,9999	Não	0,4582	Não	0,3481
Y4753 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	0,0599	Não	0,069
1:1 vs. 1:10	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999

Cerveja produzida com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foi identificada com o código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi identificada com o código Y4753; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as duas leveduras na proporção 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4753) foram identificadas como 1:1 e 1:10, respectivamente.

Anexo I - Análise de variância Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações de Dunn para média das notas obtidas nos atributos aroma, sabor e impressão global durante análise sensorial de cervejas produzidas com levedura *S. cerevisiae* comercial T58 em cultivo puro, *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 em cultivo puro e cultivo misto entre as duas nas proporções 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757) em escala piloto

Teste de Kruskal-Wallis	AROMA		SABOR		IMPRESSÃO GLOBAL	
	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P	Significativo?	Valor de P
	Não	0,0989	Não	0,6697	Não	0,4141
T58 vs. Y4757	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
T58 vs. 1:1	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
T58 vs. 1:10	Não	0,0965	Não	>0,9999	Não	0,5682
Y4757 vs. 1:1	Não	>0,9999	Não	>0,9999	Não	>0,9999
Y4757 vs. 1:10	Não	0,4274	Não	>0,9999	Não	>0,9999
1:1 vs. 1:10	Não	0,9333	Não	>0,9999	Não	>0,9999

Cerveja produzida com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foi identificada com o código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi identificada com o código Y4757; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as duas leveduras na proporção 1:1 e 1:10 (*S. cerevisiae* T58:*T. delbrueckii* UFMG-CM-Y4757) foram identificadas como 1:1 e 1:10, respectivamente.

Anexo J – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura *Starmerella meliponinorum* Y5534
(continua)

Composto	T58_1	T58_2	Y5534_1	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
(3S,4R,5R,6R)-4,5-Bis(hydroxymethyl)-3,6-dimethylcyclohexene	0	0	0	0	0	1	0
.alpha.-Caryophyllene	0	0	1	0	0	0	0
.beta.-Phenylethyl butyrate	0	1	0	0	0	0	0
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	0	0	0	0	1	0	0
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	0	0	1	0	0	1	0
1,3,5-Trioxane, 2,4,6-tripropyl-	0	0	1	1	0	1	0
1,3-Pentanediol, 2-methyl-	0	0	1	1	0	1	0
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	0	1	0	0	1	0	1
1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-	0	0	1	0	0	0	0
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	0	1	0	1	1	0	1
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminobenzoate	0	0	0	1	0	0	0
10-Undecen-1-ol	0	0	0	0	1	0	0
1-Butanol, 3-methyl-	1	1	1	1	1	1	1
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1	1	1	1	1	1	1
1-Butanol, 4-butoxy-	0	0	0	0	0	1	0
1-Decanol	1	1	1	1	1	1	1
1-Dodecanol	0	0	0	0	1	1	1
1-Heptanol	0	0	0	0	1	0	0
1-Hexanol, 2-ethyl-	0	1	1	1	1	0	1
1-Nonadecanamine, N,N-dimethyl-	1	0	0	0	0	0	0
1-Octanol	1	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 2-methyl-	0	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0	1	0	1	0	1	0
1-Undecanol	0	1	0	0	0	0	0
2,3-Butanediol	1	0	1	1	0	1	0
2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	1	0	0	0	0	0	1

(continuação)

2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	0	1	0	0	0	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	0	1	0	0	1	0	1
2-Bromo dodecane	1	0	0	0	0	0	0
2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-(2-pentenyl)-, (Z)-	1	1	0	1	1	1	1
2-Methoxy-4-vinylphenol	1	1	1	1	1	1	1
2-Tridecanol	0	1	1	1	1	1	1
3,4-Difluorobenzoic acid, tridecyl ester	0	1	0	0	0	0	0
3a,6-Methano-3aH-inden-5(4H)-one, hexahydro-	0	0	1	0	0	0	0
3-Hexanol, 2-methyl-	1	0	0	1	0	0	0
4-Decenoic acid, ethyl ester, (Z)-	0	1	0	1	0	0	1
5-Nonanol	1	1	1	1	1	1	1
6,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-(+/-)-	0	0	0	0	1	0	1
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-	0	0	0	0	0	0	1
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)-	1	0	1	1	0	1	0
9-Decenoic acid	1	1	0	0	1	0	1
Acetic acid	1	1	1	1	1	1	1
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Benzene, 1,3-diethenyl-	1	0	0	0	0	0	0
Benzoic acid, 2-ethylhexyl ester	1	0	0	0	0	0	0
Bicyclo[10.1.0]tridec-1-ene	0	0	0	0	1	0	0
Butanoic acid, 3-methyl-	1	1	1	1	1	1	1
Butanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	1	0	0
Butyl caprylate	0	0	1	0	0	0	0
Carbon dioxide	0	1	0	0	1	1	0
Caryophyllene	0	0	1	0	0	0	0
Caryophyllene oxide	0	0	0	0	0	1	0
cis-.alpha.-Bisabolene	0	0	0	1	0	0	0
Decanoic acid, decyl ester	0	0	1	0	0	0	0
Decanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Diethyl Phthalate	0	1	1	1	1	0	1

(continuação)

Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1	1	1	1
--------------------	---	---	---	---	---	---	---

Dodecanoic acid	0	1	1	0	0	1	0
Dodecanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1	0	1	0
Eicosanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	0	0	1
Ethanol	1	1	1	1	1	1	1
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	1	1	1	1	1	1	1
Ethyl 9-decenoate	1	0	1	0	1	0	0
Ethyl 9-hexadecenoate	0	1	0	0	1	0	1
Ethyl Oleate	0	0	0	1	0	0	0
Ethyl trans-4-decenoate	0	1	1	1	1	1	1
Gamolenic Acid	0	0	0	0	1	0	0
Glycerin	1	0	1	0	0	0	0
Heptadecanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	1	0	1
Heptanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1	1	1	1
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0	1	0	0	0	0	1
Hexanoic acid	1	1	1	1	1	1	1
Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	0	0	0	0	1	0	0
Hexanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Homosalate	0	0	0	1	0	0	0
Isopentyl hexanoate	1	0	0	1	0	1	0
Isopropyl Palmitate	0	1	1	0	0	0	0
Methoxyacetic acid, 3-tridecyl ester	1	0	0	0	0	0	0
Morpholine, 4-octadecyl-	1	0	1	0	0	0	0
n-Caprylic acid isobutyl ester	0	0	0	0	1	1	0
n-Decanoic acid	0	1	0	0	1	0	1
n-Hexadecanoic acid	0	0	1	0	0	0	0
Nonanoic acid	1	0	0	0	0	0	0
Nonanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1	1	1	1
n-Pentadecanol	0	0	0	0	0	1	0
n-Tridecan-1-ol	0	0	0	1	0	0	1

(continuação)

o-Acetyl-L-serine	0	0	0	0	0	1	0
Octane, 1,1'-oxybis-	0	1	0	0	0	0	1

Octanoic Acid	1	1	0	1	1	1	1
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Octanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Oleic Acid	0	1	0	0	1	0	0
Oxirane, 2,2'-[1,4-butanediylbis(oxymethylene)]bis-	1	0	0	0	0	0	0
Pentadecanoic acid	0	0	0	1	0	0	0
Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	1	1	0	1	1
Pentadecanoic acid, ethyl ester	0	1	1	1	1	1	0
Pentanoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester	1	0	0	0	0	0	0
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	0	1	0	0	0	0	0
Phenylethyl Alcohol	1	1	1	1	1	1	1
Phthalic acid, di(2-methylbutyl) ester	0	0	1	0	0	0	0
Propan-2-ol, 1-(2-isopropyl-5-methylcyclohexyloxy)-3-(4-morpholyl)-	1	0	0	0	0	0	0
Propanoic acid, 2-methyl-	1	0	1	1	1	1	1
Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	1	0	0	0	0	0	0
trans-4-t-Pentylcyclohexanol	0	1	0	0	1	0	1
Triacetin	1	0	0	0	0	0	0
Tridecanoic acid	0	0	0	0	0	0	1
Undecanoic acid, ethyl ester	1	0	0	0	0	0	1
Z-5,17-Octadecadien-1-ol acetate	0	0	0	0	0	0	0

Cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 foi representada pelo código Y5534; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as leveduras *S. cerevisiae* comercial T58 e *S. meliponinorum* UFMG-CM-Y5534 nas proporções 1:1 e 1:10 foram representadas 1:1 e 1:10, respectivamente. Números 1 ou 2 que seguem os códigos dos cultivos utilizados representam o primeiro ou o segundo experimento utilizando o cultivo. Números 1 e 0 presentes nas linhas de cada composto volátil indicam presença ou ausência do mesmo na amostra.

Anexo L – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 (continua)

Composto	T58_2	Y2681_1	Y2681_2	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
(1R,2R,3R,5S)-(-)-Isopinocampheol	0	0	1	0	0	0	0
(1S-(1Alpha,2alpha,4beta))-1-isopropenyl-4-methyl-1,2-cyclohexanediol	0	0	1	0	0	0	0
(Z)6,(Z)9-Pentadecadien-1-ol	0	0	1	0	0	0	0
.alpha.-Caryophyllene	1	0	1	0	1	0	1
.tau.-Cadinol	0	0	1	0	0	0	0
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	1	1	1	0	0	1	0
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	1	0	0	1	0	0	1
1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-	0	0	0	0	1	0	0
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1	1	1	1	1	1	1
10-Undecenoic acid, ethyl ester	0	0	0	1	0	0	0
13-Methylpentadec-14-ene-1,13-diol	0	0	0	0	0	1	0
1-Butanol, 3-methyl-	1	1	1	1	1	1	1
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1	1	0	1	1	1	1
1-Decanol	1	1	0	0	1	0	1
1-Dodecanol	1	1	0	1	0	0	0
1-Dodecanol, methyl ether	0	0	1	0	0	0	0
1-Heptatriacotanol	0	1	0	0	0	1	0
1-Hexanol, 2-ethyl-	0	0	0	1	0	0	0
1-Octanol	1	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 2-methyl-	1	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0	0	1	0	0	0	0
1-Undecanol	0	0	1	1	1	1	0
2,3-Butanediol	0	0	1	0	0	0	0

(continuação)

2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	1	1	0	0	1	1	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	0	0	1	0	0	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	0	0	0	1	0	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, acetate, (E,E)-	1	0	0	0	1	0	1
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	0	1	0	0	0	0	0
2-Fluoropropene	0	0	0	0	0	0	1
2-Hexadecanol	0	0	0	0	0	0	1
2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-(2-pentenyl)-, (Z)-	1	1	0	1	1	1	1
2-Methoxy-4-vinylphenol	1	1	1	1	1	0	1
2-Nonanol	0	0	1	0	0	0	1
2-Propyl-1-pentanol	0	1	0	0	0	0	0
2-Tridecanol	1	1	1	1	1	0	1
4-Decenoic acid, ethyl ester, (Z)-	0	0	0	1	0	1	0
4-Hexadecen-6-yne, (E)-	0	1	0	0	0	0	0
5-Nonanol	1	1	1	1	1	1	1
6,10,14-Hexadecatrien-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-(E,E)]-	0	1	0	1	0	0	0
6,10,14-Hexadecatrien-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-(E,E)]-	0	1	0	1	0	0	0
6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester	1	0	0	0	0	0	1
6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester	1	0	0	0	0	0	1
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	1	0	0	0	0	0	1
7-Propylidene-bicyclo[4.1.0]heptane	0	0	0	0	0	1	0
9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	0	0	0	1	0	0	0
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	0	0	0	0	0	1	0
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	0	0	0	1	0	1	0
9-Decen-1-ol, methyl ether	1	0	1	0	1	0	1
9-Decenoic acid	0	1	1	1	0	1	0

(continuação)

Acetic acid	1	1	1	1	1	1	1
-------------	---	---	---	---	---	---	---

Acetic acid, 2-ethylhexyl ester	0	0	0	1	0	0	0
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Acetic acid, decyl ester	1	0	0	0	0	0	1
Allyl fluoride	0	0	0	0	1	0	0
Bi-2,4-cyclopentadien-1-yl, 1,1',2,2',3,3',4,4',5,5'-decamethyl-	0	0	0	0	1	1	0
Butanoic acid, 3-methyl-	1	0	1	0	1	1	1
Butanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	0	1	0
Carbon dioxide	0	1	1	1	1	1	1
Caryophyllene oxide	1	0	0	0	0	0	0
Cyclohexane, (3,3-dimethylpentyl)-	0	0	0	1	0	0	0
Cyclopropane, 1-bromo-1-(3-methyl-1-pentenylidene)-2,2,3,3-tetramethyl-	0	0	0	0	0	0	1
Decanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Diethyl Phthalate	0	1	1	1	1	1	1
Dimethyl phthalate	0	1	1	0	0	0	0
Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1	1	0	1
Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1	1	0	1
Dodecan-1-yl acetate	0	0	0	0	1	0	0
Dodecanoic acid	1	0	1	1	1	1	0
Dodecanoic acid, ethyl ester	1	0	0	1	1	1	1
Ethanol	1	0	1	0	1	1	1
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	1	1	1	1	1	1	1
Ethyl 9-decenoate	1	0	1	1	1	1	0
Ethyl 9-hexadecenoate	1	1	1	1	1	1	1
Ethyl trans-4-decenoate	1	1	0	0	1	0	1
Heptadecanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1	1	1	0

(conclusão)

Heptanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	0	1	1
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0	0	1	0	0	1	0

Hexanoic acid	1	1	1	1	1	1	1
Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	0	0	0	1	0	1
Hexanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
n-Caprylic acid isobutyl ester	0	0	0	1	0	1	0
n-Decanoic acid	1	1	1	1	1	1	1
Nonanoic acid	0	1	0	0	0	1	0
Nonanoic acid, ethyl ester	0	1	0	1	1	1	1
Octane, 1,1'-oxybis-	0	1	0	0	0	1	0
Octanoic Acid	1	1	1	1	1	1	1
Octanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	0	0	0	1	0	1
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	0	1	1	1	1
Octanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1
Oleic Acid	1	0	1	0	0	0	0
Pentadecanoic acid	1	0	0	0	0	0	0
Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	0	0	1	1	1	1
Pentadecanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	0	1
Phenol, 3-ethyl-	0	0	0	0	0	1	0
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	0	0	0	0	0	1	0
Phenylethyl Alcohol	1	1	1	1	1	1	1
Propanoic acid, 2-methyl-	1	0	1	0	1	0	0
Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	0	0	1	0	0	0	0
Propanoic acid, ethyl ester	0	0	1	0	0	0	0
Styrene	0	1	0	0	0	0	1
Tetradecanoic acid	0	0	1	0	0	1	0

Cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 foi representada pelo código Y2681; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as leveduras *S. cerevisiae* comercial T58 e *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681 nas proporções 1:1 e 1:10 foram representadas 1:1 e 1:10, respectivamente. Números 1 ou 2 que seguem os códigos dos cultivos utilizados representam o primeiro ou o segundo experimento utilizando o cultivo. Números 1 e 0 presentes nas linhas de cada composto volátil indicam presença ou ausência do mesmo na amostra.

Anexo M – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 (continua)

Composto	T58_1	T58_2	Y4753_1	Y4753_2	1:1_1	1:1_2	1:10_1	1:10_2
(-)-Isolongifolol, acetate	0	0	1	0	0	0	0	0

(7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroinden-4-yl)methanol	0	1	1	0	0	0	1	1
.alpha.-Caryophyllene	0	0	1	1	0	0	0	0
.tau.-Cadinol	0	0	1	0	0	0	0	0
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	1	1	0	1	0	0	1	0
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	1	1	1	0	1	1	0	1
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1	1	1	1	1	1	1	1
1-Butanol, 3-methyl-	1	1	1	1	1	1	1	1
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1	1	0	0	1	1	1	1
1-Decanol	0	0	0	0	0	1	1	0
1-Dodecanol	0	0	1	0	0	0	0	1
1-Heptatriacotanol	1	0	0	0	0	0	1	0
1-Octanol	1	1	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 2-methyl-	1	1	1	1	1	1	1	1
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0	0	0	1	1	0	0	0
1-Undecanol	1	1	0	1	1	1	0	1
2,3-Butanediol	0	0	0	0	0	1	0	0
2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	0	0	0	1	0	0	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	0	0	0	1	0	1	0	1
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	0	0	1	0	0	0	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, acetate, (E,E)-	1	1	0	0	1	0	1	1
2,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl-, methyl ester	0	0	1	0	0	0	0	0
2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	1	0	0	0	0	0	0	0
2-Decanol	0	0	1	0	0	0	0	0

(continuação)

2-Dodecanol	0	0	0	1	0	0	0	0
2-Ethylhexyl salicylate	0	0	0	0	1	0	1	0
2-Furanmethanol	0	0	0	0	0	0	1	0
2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-(2-pentenyl)-, (Z)-	1	1	1	0	1	1	1	1
2-Methoxy-4-vinylphenol	1	1	0	1	1	1	1	1

Dodecanoic acid, ethyl ester	1	1	0	0	1	1	0	1
E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol	1	1	0	1	0	0	0	0
Ergost-25-ene-3,5,6,12-tetrol, (3.beta.,5.alpha.,6.beta.,12.beta.)-	0	0	0	0	1	0	0	1
Ethanol	1	1	1	1	1	1	1	1
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	1	1	1	1	1	1	1	1
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	0	0	0	1	0	0	0	0
Ethyl 9-decenoate	0	0	1	1	1	0	0	1
Ethyl 9-hexadecenoate	1	1	0	0	1	1	1	1
Ethyl trans-4-decenoate	1	1	0	0	1	1	1	1
Geranylgeraniol	0	0	0	0	0	1	0	0
Glycerin	0	0	1	0	0	0	0	0
Heptadecanoic acid, ethyl ester	1	1	0	0	0	1	2	0
Heptanoic acid	0	0	1	0	0	0	0	0
Heptanoic acid, ethyl ester	0	0	0	0	0	1	0	0
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0	1	1	1	0	0	1	0
Hexanoic acid	1	1	1	1	1	1	1	1
Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	0	0	1	0	1	1
Hexanoic acid, 4-methylene-, methyl ester	0	0	0	0	0	1	0	0
Hexanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1	1
Homosalate	1	1	0	0	1	0	1	0

(conclusão)

Lauric acid, 2-methylbutyl ester	0	0	0	1	0	0	0	0
Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-	0	0	0	1	0	0	0	0
n-Decanoic acid	1	1	1	1	1	1	1	1
Nonanoic acid	1	1	1	1	0	0	1	0
Nonanoic acid, ethyl ester	0	1	0	0	1	1	0	1
n-Tridecan-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	1

Octane, 1,1'-oxybis-	0	0	0	0	0	0	1	1
Octanoic Acid	1	1	1	1	1	1	1	1
Octanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	0	0	0	0	0	1
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	0	0	1	1	1	1
Octanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1	1	1	1	1
Oleic Acid	0	0	0	0	0	1	0	0
Pentadecanoic acid	0	0	0	1	0	0	0	0
Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	0	0	1	1	1	1
Pentadecanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1	1	1	0	1
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	0	0	0	0	0	0	1	0
Phenylethyl Alcohol	1	1	1	1	1	1	1	1
Propanoic acid, 2-methyl-	0	0	1	0	0	0	0	0
Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	0	0	1	1	0	0	0	0
Spiro[4.5]decane	0	0	1	0	0	0	0	0
Styrene	0	0	0	0	0	1	0	0
Tetradecanoic acid	0	1	1	0	0	0	1	0
trans-4-t-Pentylcyclohexanol	0	0	0	0	0	0	1	0
Undecanoic acid, ethyl ester	0	0	1	1	0	0	1	0

Cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 foi representada pelo código Y4753; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as leveduras *S. cerevisiae* comercial T58 e *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4753 nas proporções 1:1 e 1:10 foram representadas 1:1 e 1:10, respectivamente. Números 1 ou 2 que seguem os códigos dos cultivos utilizados representam o primeiro ou o segundo experimento utilizando o cultivo. Números 1 e 0 presentes nas linhas de cada composto volátil indicam presença ou ausência do mesmo na amostra.

Anexo N – Matriz de presença e ausência dos compostos voláteis identificados para cervejas produzidas com a levedura *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 (continua)

Composto	T58	Y4757	1.1	1.10
(7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroinden-4-yl)methanol	1	0	0	1
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	1	0	1	1
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	1	1	1	1
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1	1	1	1
13-Methylpentadec-14-ene-1,13-diol	0	0	0	1
1-Butanol, 3-methyl-	1	1	1	1
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1	1	1	1
1-Decanol	0	0	0	1
1-Dodecanol	0	0	1	1
1-Heptatriacotanol	0	1	0	0
1-Hexadecanol	0	1	0	1
1-Octanol	1	0	1	1
1-Propanol, 2-methyl-	1	1	1	1
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0	1	1	1
1-Undecanol	1	0	1	0
2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	0	1	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	0	1	0	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	0	0	1	0
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, acetate, (E,E)-	1	1	1	0
2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-(2-pentenyl)-, (Z)-	1	1	1	1
2-Methoxy-4-vinylphenol	1	1	1	1
2-Tridecanol	1	1	1	1
3,4-Difluorobenzoic acid, dodecyl ester	0	0	0	1
4-Decenoic acid, ethyl ester, (Z)-	0	1	1	1
5-Nonanol	1	1	1	1
6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester	1	0	0	0
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	1	0	0	0
7-Propylidene-bicyclo[4.1.0]heptane	0	0	0	1
9-Decen-1-ol, methyl ether	0	1	0	0
9-Decenoic acid	1	1	1	1
Acetic acid	1	1	1	1
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	1	1
Acetic acid, decyl ester	1	0	0	0
Benzenepropanoic acid, ethyl ester	0	1	0	0
Butanoic acid, 3-methyl-	1	1	1	0
Butanoic acid, ethyl ester	0	1	0	1
Carbon dioxide	1	1	1	1
Cyclohexane, (3,3-dimethylpentyl)-	0	0	1	0
Cyclopentane, pentyl-	0	1	0	0

	(conclusão)			
Decanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1
Diethyl Phthalate	1	1	1	1
Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1
Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1
Dimethyl Sulfoxide	1	1	1	1
Dodecan-1-yl acetate	0	1	1	0
Dodecanoic acid	1	1	1	1
Dodecanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1
Ethanol	1	1	1	1
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	1	1	1	1
Ethyl 9-decenoate	0	0	1	0
Ethyl 9-hexadecenoate	1	1	1	1
Ethyl trans-4-decenoate	1	1	0	1
Heptadecanoic acid, ethyl ester	0	0	0	1
Heptanoic acid, ethyl ester	1	0	0	0
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0	0	0	1
Hexanoic acid	1	1	1	1
Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	1	1
Hexanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1
n-Decanoic acid	1	1	1	1
Nonanoic acid, ethyl ester	1	0	1	1
Octane, 1,1'-oxybis-	1	0	0	1
Octanoic Acid	1	1	1	1
Octanoic acid, 2-phenylethyl ester	1	1	1	0
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	1	1
Octanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1
Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	1	1	1	1
Pentadecanoic acid, ethyl ester	1	1	1	1
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	0	0	1	0
Phenylethyl Alcohol	1	1	1	1
trans-4-t-Pentylcyclohexanol	1	1	0	0

Cervejas produzidas com cultivo puro de *S. cerevisiae* comercial T58 foram representadas pelo código T58; cerveja produzida com cultivo puro de *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 foi representada pelo código Y4757; cervejas produzidas com cultivos mistos entre as leveduras *S. cerevisiae* comercial T58 e *Torulaspota delbrueckii* UFMG-CM-Y4757 nas proporções 1:1 e 1:10 foram representadas 1:1 e 1:10, respectivamente. Números 1 e 0 presentes nas linhas de cada composto volátil indicam presença ou ausência do mesmo na amostra.