

PAULO CESAR DA SILVA PEREIRA JUNIOR

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO EM CO-CULTURA DE LEVEDURAS
Saccharomyces E NÃO-*Saccharomyces* PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña

Coorientadores: Monique Renon Eller

Nélio José de Andrade

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436e
2019
Pereira Junior, Paulo Cesar da Silva, 1986-
Estudo da fermentação em co-cultura de leveduras
Saccharomyces e não-*Saccharomyces* para produção de cervejas
/ Paulo Cesar da Silva Pereira Junior. – Viçosa, MG, 2019.
70 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Pena.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-69.

1. Cerveja. 2. Compostos aromáticos. 3. *Torulaspóra delbrueckii*. 4. *Pichia anomala*. 5. *Candida apicola*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 663.42

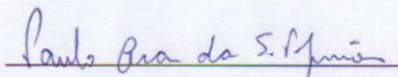
PAULO CESAR DA SILVA PEREIRA JUNIOR

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO EM CO-CULTURA DE LEVEDURAS
Saccharomyces E NÃO-*Saccharomyces* PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

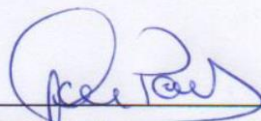
APROVADA: 10 de outubro de 2019.

Assentimento:



Paulo Cesar da Silva Pereira Junior

Autor



Wilner Edgard Luera Peña

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido forças para seguir com este trabalho. Aos meus companheiros e amigos Eduardo Almeida (Pinguim) e Igor Vassalli que de forma muito ativa estavam presentes em todo desenrolar desta pesquisa, sem a contribuição deles seria praticamente inviável a conclusão das tarefas laboratoriais. À minha namorada Kássia Zanetti que sempre acreditou e me deu apoio psicológico desde o início desta jornada. Meus Pais, Paulo Cesar Pereira e Luciene Pinheiro que sempre estão dispostos a ouvirem minhas indagações da vida, agradeço do fundo do coração. A meu orientador Prof. Wilmer Edgard, coorientadora Prof^a. Monique Eller, Prof. Leandro Licursi e ao Técnico Luiz Manoel Noronha, pelo apoio técnico-científico deste trabalho. Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pela oportunidade de realizar as análises no citometro de fluxo e ao Prof. Claudio Lusias Mafra de Siqueira, João (técnico) e Walquiria pelo acompanhamento das análises no HPLC no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Agradeço também ao Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos, bem como o Laboratório de Higiene, ambos da UFV. Ao Sr. Lucindo Copat e a empresa Lallemand pelo fornecimento da levedura *Torulaspóra delbrueckii* e a empresa ArteBrew pelo fornecimento do extrato de malte. Aos *beer sommeliers* que fizeram a avaliação sensorial das cervejas. Agradeço também profundamente a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a conclusão deste curso. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Gratidão!

RESUMO

PEREIRA JUNIOR, Paulo Cesar da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2019. **Estudo da fermentação em co-cultura de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* para produção de cervejas**. Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Monique Renon Eller e Nélio José de Andrade.

As cervejas especiais que apresentam diversificação de sabores e aromas estão ganhando espaço no mercado. Nesse sentido, o uso de técnicas inovadoras de produção tornou-se essencial para o atendimento ao mercado. O uso de leveduras não-*Saccharomyces* tem sido aplicado de forma isolada ou em co-cultura com a tradicional *Saccharomyces cerevisiae* de modo a obter cervejas de características únicas. Dessa forma, este trabalho teve objetivo de avaliar o uso de diferentes proporções entre leveduras não-*Saccharomyces* (*Pichia anomala*, *Candida apicola* e *Torulaspota delbrueckii*) em co-cultura com *S. cerevisiae* em diferentes concentrações iniciais do mosto na elaboração de cervejas. Para isto, foi realizado um delineamento composto central rotacional. Foi utilizado a técnica de citometria de fluxo na avaliação das proporções entre as leveduras, cromatografia líquida de alta eficiência na quantificação de açúcares, glicerol e etanol, cromatografia a gás na avaliação dos compostos voláteis e por fim, foi realizada uma avaliação sensorial com *beer sommeliers* das cervejas oriundas dos ensaios com teor de etanol otimizado. Na co-cultura com *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, esta última dominou a fermentação quando inoculada em proporções acima de 1:100. A produção de etanol máxima desta co-cultura foi de 6,07% (v/v). Na co-cultura entre *S. cerevisiae* e *P. anomala*, foi observado competição entre elas na maior parte dos ensaios com predomínio da *S. cerevisiae* após 5 dias de fermentação, sendo a concentração máxima de etanol atingida de 3,92% (v/v). A co-cultura entre *S. cerevisiae* e *C. apicola*, bem como da cultura pura de *S. cerevisiae*, tiveram produção máxima de etanol de 5,09 e 3,31% (v/v), respectivamente. O perfil de voláteis ficou caracterizado por uma alta produção de acetato de etila nas co-culturas envolvendo *P. anomala*. As fermentações conduzidas com *T. delbrueckii* não apresentaram teores de voláteis superiores ao ensaio controle, não trazendo a característica frutada esperada. Os compostos álcool 2-feniletil, 1-propanol e álcool isobutílico ficaram com concentrações abaixo do limiar de percepção em todas as condições testadas, ao contrário do álcool isoamílico e

octanoato de etila. As cervejas foram avaliadas sensorialmente e caracterizadas com sabor e aroma doce alto, devido ao resíduo de extrato não consumido na fermentação. No atributo frutado/ésteres, a nota mais alta foi para a cerveja produzida na co-cultura com *C. apicola*, e a menor nota para a cerveja elaborada em co-cultura com *T. delbrueckii*. No geral as cervejas tiveram notas baixas para os atributos referentes a defeitos, indicando que as condições impostas de fermentação e todo processo de produção foram conduzidas de forma adequada. Assim, o uso de leveduras não-*Saccharomyces* em co-cultura com *S. cerevisiae* pode ser uma alternativa para a produção de cervejas especiais.

Palavras-chave: Cervejas especiais. Compostos aromáticos. *Torulaspóra delbrueckii*. *Pichia anomala*. *Candida apicola*.

ABSTRACT

PEREIRA JUNIOR, Paulo Cesar da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2019. **Study of fermentation in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast co-culture for beer production**. Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Monique Renon Eller and Nélio José de Andrade.

The special beers present diversified flavors and are taking market space. That way, innovative technics are essential to reach the market desires. The use of non-*Saccharomyces* yeasts had been applied lonely or in co-cultures with the traditional *Saccharomyces cerevisiae* to obtain unique beers. To achieve that, this work has the objective of evaluate use of different proportions between non-*Saccharomyces* yeasts (*Pichia anomala*, *Candida apicola* e *Torulaspota delbrueckii*) in co-culture with *S. cerevisiae* in different initial concentrations of must to elaborate beers through a central rotational composite design. Flux cytometric was utilized to evaluate the proportion between yeast during fermentation, high performance liquid chromatography for sugar, glycerol and ethanol measurement, gas chromatography for volatile compounds and finally, a sensory evaluation was performed with beer sommeliers of the beers from the ethanol optimized tests. When *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* were utilized together, the last dominated fermentation when inoculated in proportions above 1:100. Maximum ethanol production for this co-culture was 6,07% (v/v). In the co-culture with *P. anomala* and *S. cerevisiae*, was observed competition between then in most part of assays, but *S. cerevisiae* predominate after 5 days, being maximum ethanol concentration of 3,92% (v/v). Co-cultures with *C. apicola* and *S. cerevisiae*, and *S. cerevisiae* alone had the maximum ethanol of 5,09 and 3,31% (v/v), respectively. The profile of volatiles was characterized by a high concentration of ethyl acetate in *P. anomala* co-cultures. Fermentations with *T. delbrueckii* didn't presented different concentrations when compared to control and didn't presented the fruity flavor expected. 2-fenilethyl ethanol, 1-propanol, isobutyl alcohol presented concentrations below the threshold of perception in all applied conditions, unlike isoamyl alcohol and ethyl octanoate. Beers were sensorial evaluated and characterized with high notes of sweet smell and taste, due to excess of residual extract from fermentation. Beer produced with *C. apicola* showed the higher note for fruity/esters attribute, and with *T. delbrueckii* the minor ones. Overall, the beers scored poorly on defect attributes, indicating that fermentation conditions and the whole production process were properly

conducted. Thus, the use of non-*Saccharomyces* yeast in co-culture with *S. cerevisiae* may be an alternative for the production of specialty beers.

Keywords: Special beers. Aromatic compounds. *Torulaspota delbrueckii*. *Pichia anomala*. *Candida apicola*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A cerveja	12
2.2 Leveduras	14
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.2.2 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	17
2.2.3 <i>Pichia anomala</i>	18
2.2.4 <i>Candida apicola</i>	19
2.3 Fermentações mistas	19
2.4 Compostos voláteis e sua importância no aroma e sabor das bebidas	21
3 OBJETIVOS	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Microrganismos, substrato e meios de cultura	27
4.2 Planejamento experimental	27
4.3 Métodos	29
4.3.1 Preparo do mosto cervejeiro e inóculos	29
4.3.2 Análises	30
4.3.2.1 Citometria de fluxo	30
4.3.2.2 Perfil de açúcares, glicerol e etanol	30
4.3.2.3 Quantificação de nitrogênio amino livre	31
4.3.2.4 Quantificação de compostos voláteis.....	31
4.3.2.5 Análise sensorial.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Proporção entre <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i> na fermentação.....	34
5.1.1 <i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
5.1.2 <i>Pichia anomala</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
5.2 Acompanhamento do processo fermentativo	39
5.2.1 Análise estatística e otimização das condições de produção de etanol.....	46
5.2.2 Análise estatística e otimização das condições de produção de glicerol ...	48
5.2.3 Produção de compostos voláteis pelas leveduras	50

5.3 Análise sensorial	56
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS	60
ANEXO 1 – Ficha de avaliação sensorial.....	70

a.C. Entretanto, a cultura europeia foi a responsável pelo desenvolvimento da bebida, bem como da ciência e inovação que a envolvem (MORADO, 2009).

O consumidor atual de cervejas tem buscado por produtos que lhes ofereçam uma experiência única de sabores e aromas, e a cerveja artesanal, por ser elaborada com insumos nobres e técnicas de produção diversificadas, tem atendido a esta demanda. Com isso, o mercado de cervejas artesanais tem crescido de forma expressiva no Brasil (SEBRAE, 2017).

Na produção de cerveja, várias são as possibilidades de combinação entre os insumos que irão gerar bebidas com características distintas. Além disso, as leveduras utilizadas no processo fermentativo exercem papel fundamental nesta diferenciação, pois são as responsáveis por converter e aplicar a demais componentes do mosto em álcool, dióxido de carbono e uma série de compostos aromáticos, como álcoois superiores, ésteres e compostos carbonílicos (PIRES et al., 2014).

Dessa forma, a indústria cervejeira passou a desenvolver novas técnicas de fermentação, bem como utilizar diferentes cepas das tradicionais *Saccharomyces cerevisiae* e outras do gênero não-*Saccharomyces* (GONZALEZ, QUIRÓS e MORALES, 2013; JOHNSON, 2013; BASSO, ALCARDE e PORTUGAL, 2016) que, se introduzidas de forma controlada, podem contribuir com a diversidade de sabores e aromas dessas bebidas (PIRES et al., 2014).

Outra estratégia utilizada na produção de cervejas tem sido o uso de mostos com alta densidade. Essa prática permite aumentar a capacidade de planta industrial sem a necessidade de grandes investimentos, diminuindo os custos e tempo de produção (STEWART, 2010). Além disso, essa prática favorece a produção de ésteres de acetato e álcoois superiores que são responsáveis pela adequação favorável o aroma da bebida (SAERENS et al., 2008b). Entretanto, essa estratégia pode ocasionar mudanças no metabolismo das leveduras devido ao estresse pela alta pressão osmótica no momento inicial da fermentação (FULIGUNDA et al., 2011), bem como o alto teor alcoólico no final da fermentação, que pode ser tóxico e um fator limitante para muitas células (BLUECK et al., 2007; HU et al., 2007).

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas no mundo, com registros de que sua origem tenha sido no Oriente Médio ou no Egito, por volta de 6000 anos a.C. Entretanto, a cultura europeia foi a responsável pelo desenvolvimento da bebida, bem como da ciência e inovação que a envolvem (MORADO, 2009).

O consumidor atual de cervejas tem buscado por produtos que lhes ofereçam uma experiência única de sabores e aromas, e a cerveja artesanal, por ser elaborada com insumos nobres e técnicas de produção diversificadas, tem atendido a esta demanda. Com isso, o mercado de cervejas artesanais tem crescido de forma expressiva no Brasil (SEBRAE, 2017).

Na produção de cerveja, várias são as possibilidades de combinação entre os insumos que irão gerar bebidas com características distintas. Além disso, as leveduras utilizadas no processo fermentativo exercem papel fundamental nesta diferenciação, pois são as responsáveis por converter o açúcar e demais componentes do mosto em álcool, dióxido de carbono e uma série de compostos aromáticos, como álcoois superiores, ésteres e compostos carbonílicos (PIRES et al., 2014).

Dessa forma, a indústria cervejeira passou a desenvolver novas técnicas de fermentação, bem como utilizar diferentes cepas das tradicionais *Saccharomyces cerevisiae* e outras de gênero não-*Saccharomyces* (GONZALEZ; QUIRÓS e MORALES, 2013; JOHNSON, 2013; BASSO; ALCARDE e PORTUGAL, 2016) que, se introduzidas de forma controlada, podem contribuir com a diversidade de sabores e aromas dessas bebidas (PIRES et al., 2014)

Outra estratégia utilizada na produção de cervejas tem sido o uso de mostos com alta densidade. Essa prática permite aumentar a capacidade da planta industrial sem a necessidade de grandes investimentos, diminuindo os custos e tempo de produção (STEWART, 2010). Além disso, essa prática favorece a produção de ésteres de acetato e álcoois superiores que em níveis adequados favorece o aroma da bebida (SAERENS et al., 2008b). Entretanto, essa estratégia pode ocasionar mudanças no metabolismo das leveduras devido ao estresse pela alta pressão osmótica no momento inicial da fermentação (PULIGUNDLA et al., 2011), bem como o alto teor alcoólico no final da fermentação, que pode ser tóxico e um fator limitante para muitas células (BLIECK et al., 2007; HU et al., 2007).

Assim, a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* em conjunto com a *S. cerevisiae* em diferentes concentrações iniciais do mosto cervejeiro pode resultar em bebidas com atributos sensoriais distintos, sendo interessante a avaliação do comportamento e real contribuição dessas leveduras durante o processo de fermentação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cerveja

A legislação brasileira define cerveja como sendo 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 (BRASIL, 2019). Entretanto, mesmo a legislação mais recente não aborda nenhuma diferenciação entre os termos cerveja e cerveja artesanal. A associação de cervejeiros artesanais dos Estados Unidos define cerveja artesanal como aquela produzida em pequena escala, com processo de fermentação e maturação relativamente lento e com matérias-primas de boa qualidade que vão dar origem a produtos diferenciados das cervejas comerciais mais populares (BREWERS ASSOCIATION, 2019a).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cervejas com 14 bilhões de litros por ano e ocupa a 27ª posição no ranking em consumo (CERVBRASIL, 2016). Deste volume total produzido, estima-se que aproximadamente 380 milhões de litros, ou seja, 2,7%, sejam produzidos por cervejarias artesanais independentes (LAPOLLI, 2018).

No Brasil, a produção e o consumo de cerveja artesanal ainda são pequenos se comparados a outros países da Europa e Estados Unidos. Só neste último, 4.522 microcervejarias movimentaram US\$ 27,6 bilhões em 2018, enquanto que no Brasil neste mesmo período constavam 889 microcervejarias registradas no Ministério da Agricultura (MARCUSO e MÜLLER, 2018; BREWERS ASSOCIATION, 2019). Apesar da quantidade de microcervejarias registradas no Brasil ser pequena em relação aos EUA, o aumento dos registros entre 2017 e 2018 foi de 23%, sendo um salto bastante expressivo no cenário nacional (GOVERNO DO BRASIL, 2019). Este aumento está relacionado à mudança de hábito dos consumidores, que estão mais exigentes em qualidade e à procura de produtos que lhes ofereçam melhores experiências sensoriais.

A cerveja é fonte de vitaminas, minerais e antioxidantes (ASTRUP et al., 2016). Dessa forma, o consumo moderado dessa bebida (1 dose de cerveja de 330 mL com

4% m/v de álcool por dia para mulheres e 2 doses para homens) poderia contribuir com a redução de uma série de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e demência (RONKSLEY et al., 2011; DE GAETANO et al., 2016).

2.1.1 Processo de produção

O processo de produção de cervejas, de forma simplificada, consiste em malteação, brassagem, fermentação, maturação e envase (Figura 1).

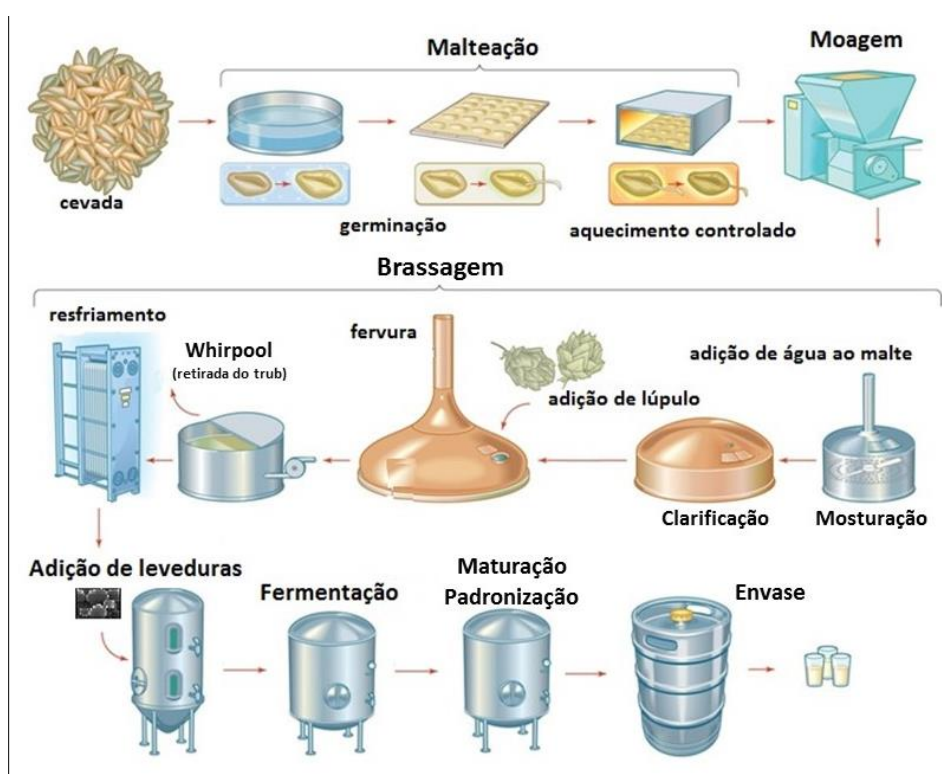


Figura 1 – Etapas do processo de produção de cervejas (Adaptado de ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2012).

A etapa de malteação, na maioria dos casos, ocorre ainda fora da cervejaria, em uma unidade industrial chamada de maltearia. Na maltearia os grãos (principalmente de cevada) passam por um processo controlado de maceração, germinação e secagem com objetivo de ativar a produção de enzimas pelos grãos (MORADO, 2009).

O passo seguinte à malteação é a brassagem, que compreende as etapas de moagem dos grãos, mosturação, filtração ou clarificação do mosto, lupulagem, fervura e resfriamento. Na moagem, o endosperma do grão é exposto. Na mosturação os

grãos serão suspensos em água com temperatura controlada para a conversão do conteúdo amiláceo em açúcares fermentescíveis (maltotriose, maltose, glicose) e dextrinas por meio da ação das enzimas ativadas no processo de malteação. Após a hidrólise do amido, o mosto é filtrado através da cama oriunda do próprio bagaço dos grãos e torna-se clarificado. A próxima etapa é a lupulagem e fervura, que têm como objetivo a eliminação de possíveis contaminações no mosto, bem como a isomerização dos α -ácidos do lúpulo, originando os *iso*- α -ácidos que irão conferir o amargor da cerveja. Após a fervura, faz-se o *whirlpool* (redemoinho) para facilitar a decantação do *trub* (proteínas desnaturadas e resinas do lúpulo). Em seguida, é feito o resfriamento rápido do mosto, o qual será oxigenado e assim estará pronto para receber a levedura responsável pela fermentação (VENTURINI FILHO, 2010).

A fermentação principal inicia no momento em que são adicionadas as leveduras e termina quando a maior parte dos açúcares fermentescíveis tenha sido consumida, gerando produtos como o álcool, dióxido de carbono (CO₂) e os compostos secundários, que juntamente com compostos oriundos dos maltes e lúpulos, irão conferir o *flavor* da cerveja (KROGERUS et al., 2017; PIRES et al., 2014; STEENSELS e VERSTREPEN, 2014). Após este período, inicia-se a fermentação secundária, na qual a temperatura do tanque é aumentada com objetivo de estimular que as leveduras metabolizem compostos indesejáveis como o diacetil (2,3-butanodiona), que se não transformado pode conferir sabor de manteiga rançosa à cerveja (KROGERUS e GIBSON, 2013).

Na maturação, a cerveja é resfriada para em torno de 0 °C com intuito de favorecer a decantação das leveduras e reações físico-químicas que irão refinar o sabor e aroma da bebida. Concluída a etapa de maturação, a cerveja pode ser filtrada ou não, padronizada e então seguir para o envase (MORADO, 2009).

2.2 Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares, pertencentes ao reino *Fungi*, com formato esferoidal a ovoide (MADIGAN et al., 2016). As espécies de leveduras predominantes na elaboração de bebidas alcoólicas pertencem ao gênero *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae* (VARELA, 2016). As diferentes cepas

pelas leveduras não-*Saccharomyces*, passam a contribuir positivamente no aroma por terem a fração de açúcar removida (DAENEN et al., 2008; STEENSELS e VERSTREPEN, 2014; VANDERHAEGEN et al., 2003).

O uso de leveduras não-*Saccharomyces* de maneira controlada nos processos de produção de bebidas promove o desenvolvimento de aromas frutados. Essas leveduras podem ser usadas na produção de cervejas principalmente do tipo *Ale*, atuando como bioflavorizantes, ou na produção de cervejas de baixo teor alcoólico. (PIRES et al., 2014; BASSO; ALCARDE e PORTUGAL, 2016; MICHEL et al., 2016b).

Embora a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* em processos de produção de cervejas seja recente, há evidências crescentes do potencial para sua utilização na indústria (BASSO; ALCARDE e PORTUGAL, 2016; MICHEL et al., 2016b; VARELA, 2016). Muitas das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* como *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Debaryomyces* spp., *Pichia* spp., *Candida krusei*, *Torulaspota delbrueckii* entre outras participam dos processos de fermentação espontânea de certos tipos de cervejas (ex: Lambics, Gueuze e Rodenbach). Entretanto, estudos avaliando o comportamento destas leveduras em cultura pura ou em co-cultura ainda são escassos (SPITAEELS et al., 2014; VARELA, 2016).

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie de levedura que possui grande importância industrial em vários segmentos (panificação, cervejarias, destilarias e usinas) devido à sua capacidade de converter de forma eficiente açúcares (ex: glicose, maltose, frutose entre outros) em etanol, dióxido de carbono e compostos de baixo peso molecular (WALKER e STEWART, 2016).

Com cerca de 5 a 10 µm de tamanho e formato esférico, oval ou cilíndrico, a *S. cerevisiae* se multiplica por brotamento e pode ser encontrada em vários ambientes como solo, insetos, animais e em plantas (MADIGAN et al., 2016). Um mínimo de atividade de água em torno de 0,65 é requerido para desenvolvimento da *S. cerevisiae* e sua temperatura ótima de crescimento varia de 20 a 30 °C em pH entre 4,5 e 6,5 (WALKER e STEWART, 2016).

O uso de *S. cerevisiae* na produção de bebidas é bem consolidado. Ainda assim, muitas pesquisas são realizadas a fim de identificar e selecionar novas cepas (STEENSELS et al., 2014), verificar características de desempenho fermentativo com foco no perfil aromático (MEIER-DÖRNBERG et al., 2017), condições específicas de fermentação que podem gerar mudanças no metabolismo da levedura (ARELLANO-PLAZA et al., 2017), entre outras.

2.2.2 *Torulaspora delbrueckii*

Torulaspora delbrueckii (*Candida colliculosa*) é uma espécie cujo uso é datado a mais de 4.000 anos e para a qual atualmente têm sido realizados estudos de sua utilização na fermentação de vinhos (ALBERTIN et al., 2014) e também na produção de cervejas de trigo do estilo alemão, uma vez que os produtos derivados de seu metabolismo conferem aromas que remetem ao de cravo e banana (TATARIDIS et al., 2013; MICHEL et al., 2016a). Leveduras dessa espécie produzem alta concentração de álcoois superiores, ésteres, terpenos e aldeídos fenólicos como o 2-feniletanol, que são importantes no aroma floral e frutado das bebidas, adicionando complexidade a elas. Quando comparadas com o gênero *Saccharomyces*, as espécies do gênero *Torulaspora* produzem baixas concentrações de compostos desagradáveis como ácidos voláteis, acetaldeído, acetoína (especialmente em fermentações com alta gravidade) e ácido acético (BELY et al., 2008; RAYNAL et al., 2011; AZZOLINI et al., 2015). Algumas cepas de *T. delbrueckii* apresentaram resistência ao etanol em até 11% (v/v) em condições de produção de vinho, entretanto em produção de cervejas a resistência foi de até 5% (v/v) com capacidade de suportar até 50 mg/L de iso- α -ácido oriundo do lúpulo (TATARIDIS et al., 2013; MICHEL et al., 2016a).

Alguns trabalhos estudaram o comportamento de *T. delbrueckii* em cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* como em Canonico et al. (2016), os quais verificaram que as bebidas produzidas com cultura pura de *T. delbrueckii* Disva 254 se apresentaram com baixo teor alcoólico (2,66% v/v), porém com boas características aromáticas, cor mais clara e espuma compacta e persistente. Em co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* Disva 254 verificou-se completa conversão dos açúcares fermentescíveis, resultando em um efeito pequeno ou

inexistente no teor alcoólico em relação ao controle (cultura pura de *S. cerevisiae* US-05), porém com perfis aromáticos distintos. Entretanto, em estudo no qual foram avaliadas 10 cepas de *T. delbrueckii*, apenas 1 foi capaz de metabolizar maltose, principal açúcar no mosto cervejeiro (MICHEL et al., 2016a). Assim, o uso de *T. delbrueckii* em co-cultura com *S. cerevisiae* é interessante pois mesmo que a *T. delbrueckii* apresente baixo consumo de maltose, a *S. cerevisiae* pode metabolizar esse açúcar, possibilitando ter na bebida final a contribuição dos aromas provenientes da *T. delbrueckii* sem perder em rendimento alcoólico.

2.2.3 *Pichia anomala*

Pichia anomala (*Wickerhamomyces anomalus*) é uma espécie de levedura não-*Saccharomyces* que apresenta boa plasticidade fisiológica, com capacidade de se multiplicar em situações de estresse como ausência de oxigênio, ampla faixa de temperatura (entre 3 °C e 37 °C), condições extremas de pH (2,0 – 12,4) e condições osmóticas como atividade de água 0,92 (NaCl) e 0,85 (glicerol), além de algumas cepas tolerarem concentrações de etanol até 12,5% (v/v) (FREDLUND et al., 2002; PASSOTH et al., 2006; WALKER, 2011; PADILLA et al., 2018). Possuem capacidade de metabolizar uma vasta gama de açúcares como hexoses (glicose, galactose, frutose), pentoses (arabinose, xilose), dissacarídeos (sacarose, lactose), polissacarídeos, bem como alguns álcoois, ácidos orgânicos, ácidos graxos e hidrocarbonetos aromáticos (WALKER, 2011).

O metabolismo central de carbono em *P. anomala* é regulado pela disponibilidade de oxigênio e não pela concentração de glicose (*Crabtree* negativo), aumentando assim a velocidade da oxidação de açúcares pela via glicolítica sob restrição de oxigênio (efeito Pasteur) (FREDLUND, 2004; PASSOTH et al., 2006; WALKER, 2011).

Leveduras dessa espécie são descritas como capazes de produzir vários compostos aromáticos como o acetato de 2-feniletil, acetado de isoamila (MINGORANCE-CAZORLA et al., 2003), propionato de etila, fenil etanol e especialmente acetato de etila (PASSOTH et al., 2006). Em cervejas, o acetato de etila influencia diretamente no sabor e aroma da bebida, possibilitando interessante

caráter frutado ou característica indesejável que remete a solvente, dependendo da concentração (WHITE e ZAINASHEFF, 2010).

Swangkeaw et al. (2009) investigaram a produção e atividade de exo-glicosidase por *P. anomala* na elaboração de vinho. Foi observado que em meios contendo celobiose, *P. anomala* foi capaz de produzir β -glicosidase, enzima que promove a quebra de glicosídeos não voláteis e inodoros em compostos aromáticos. Os pesquisadores concluíram ainda que a produção da enzima pode ser estimulada em concentrações de etanol entre 4 e 20% (v/v) e inibida por glicose.

2.2.4 *Candida apicola*

Candida apicola, também conhecida como *Torulopsis apicola*, é uma levedura não-*Saccharomyces* osmotolerante, capaz de produzir sorolipídeos que são biosurfactantes, ácidos graxos de membrana e enzimas como redutases e proteases (REID et al., 2012; GIRHARD et al., 2013). São naturalmente encontradas em processos fermentativos envolvendo vinho e cachaça, nos quais são relatadas com a capacidade de produzirem compostos voláteis que promovem aromas diversificados à bebida (OLIVEIRA et al., 2005; TOFALO et al., 2009). Além disso, *C. apicola* foi isolada do processo de fermentação de Mezcal, uma bebida alcoólica destilada, produzida a partir do sumo fermentado do agave. Neste processo foi verificado a capacidade da *C. apicola* em secretar β -frutofuranosidases com atividade frutossiltransferase úteis na síntese prebiótica (ARRIZON et al., 2012).

2.3 Fermentações mistas

As fermentações comumente utilizadas na indústria de cervejas são conduzidas a partir de monoculturas, ou seja, uma única cepa de levedura, geralmente do gênero *Saccharomyces*, é responsável por realizar o processo. Entretanto, alguns tipos de cervejas como *Berliner Weisse* e *Lambics* são elaboradas em um sistema de fermentação mista envolvendo microrganismos distintos, sendo eles bactérias como *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. e também leveduras como *Saccharomyces* spp. e *Brettanomyces* spp., gerando características particulares a estas bebidas. Recentemente tem-se estudado o uso de leveduras não-*Saccharomyces* em

fermentações mistas com *Saccharomyces* no intuito de melhorar a capacidade fermentativa, bem como aprimoramento do perfil sensorial da cerveja (BASSO; ALCARDE e PORTUGAL, 2016; BUDRONI et al., 2017; HOLT et al., 2018; CANONICO et al., 2019).

Em fermentações mistas ocorrem interações entre os organismos presentes no processo, podendo elas serem positivas ou negativas. As principais formas de interação entre leveduras são: a competição em que um organismo compete por substrato ou mesmo por espaço em relação ao outro; e amensalismo no qual um organismo secreta compostos tóxicos que prejudica o crescimento ou até mesmo mata o outro. Essas interações são influenciadas por fatores abióticos (pH, temperatura, etanol, pressão osmótica, nitrogênio disponível, entre outros) e bióticos (tipos de microrganismos, presença de substâncias tóxicas, contato célula-célula, entre outros), determinando a capacidade de um microrganismo se sobressair ou não em relação a outros (CIANI et al., 2016).

Exemplos de interação entre leveduras foram investigados por Albergaria et al. (2010), que descobriram que uma fração proteica extracelular de 2-10 kDa produzida por *S. cerevisiae* CCMI 885 apresenta efeito fungistático sobre *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii* e *Hanseniaspora guilliermondii* e um efeito fungicida sobre *K. marxianus*. Leveduras não-*Saccharomyces* também podem agir contra a sobrevivência de outras leveduras, como verificado por Comitini et al. (2004) . Esses autores descobriram que *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* podem secretar duas toxinas (micocinas) - KwKt e PIKT - que são ativas contra leveduras do gênero *Brettanomyces*.

Por outro lado, apesar da possibilidade de ocorrência de interações entre essas leveduras, vários experimentos conduzidos com fermentações mistas utilizando proporções entre *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* obtiveram resultados positivos no aprimoramento sensorial das bebidas (CANONICO et al., 2017; PUERTAS et al., 2017; HOLT et al., 2018; TOH et al., 2018).

Nesse sentido, fermentação mista entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* Disva 254 foi avaliada por Canonico et al. (2017) na produção de cerveja partindo de um mosto com 12,3 °Brix de concentração e proporção de 1:20. Foi observado que *T. delbrueckii* dominou a fermentação e as cervejas apresentaram maiores teores de

álcool superior e ésteres em relação às produzidas por cultura pura de *S. cerevisiae* US-05.

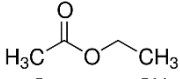
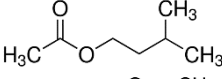
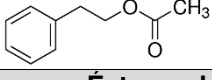
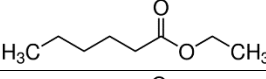
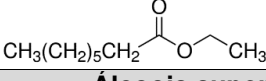
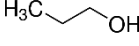
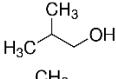
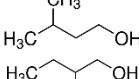
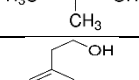


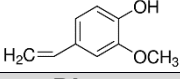
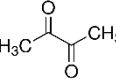
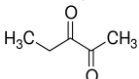
Outra pesquisa desenvolvida por Toh et al. (2018) também investigou a fermentação mista entre *S. cerevisiae* US-04 e *T. delbrueckii* Td 291 e foi observado um retardo acentuado da cepa US-04 na proporção 1:20, enquanto uma morte celular precoce da cepa Td 291 foi observada na proporção 1:2. As culturas mistas produziram quantidades significativamente maiores de decanoato de etila e dodecanoato de etila (frutado/floral). Na proporção 1:2 a produção de octanoato de etila (maçã/anis) foi significativamente maior, enquanto as cervejas na proporção 1:20 foram caracterizadas por uma boa produção de álcool superior, mas com quantidades mais altas de acetaldeído (maçã verde).

2.4 Compostos voláteis e sua importância no aroma e sabor das bebidas

Os compostos voláteis são impreterivelmente produzidos durante a fermentação e são de extrema importância no caráter sensorial das bebidas. Na Tabela 1 estão resumidos os principais grupos de compostos voláteis presentes em cervejas.

Durante a fermentação do mosto, as leveduras produzem uma série de compostos oriundos do seu metabolismo secundário, os quais são os principais responsáveis pelo aroma das bebidas. Os principais grupos de compostos aromáticos ativos são álcoois superiores, ésteres, compostos de enxofre, fenóis voláteis, dicetonas vicinais e aldeídos (KROGERUS et al., 2017; KROGERUS e GIBSON, 2013; PIRES et al., 2014). O perfil sensorial de bebidas não é construído levando-se em consideração apenas um composto volátil, mas sim devido ao sinergismo entre tais compostos (SAERENS et al., 2008a). Vários parâmetros durante o processo produtivo das bebidas influenciam na produção dos compostos voláteis. Um exemplo é o aumento da produção de ésteres que ocorre quando se tem aumento da concentração de sólidos solúveis no mosto, independentemente se a levedura utilizada é Ale ou Lager (SAERENS et al., 2008b).

Tabela 1 – Principais compostos voláteis presentes em cervejas, suas respectivas fórmulas químicas, limiar de percepção e impressão de aroma (MEILGAARD, 1975; WHITE e ZAINASHEFF, 2010; PIRES et al., 2014).

Composto	Estrutura química	Limiar de percepção (mg/L)	Impressão de aroma
Ésteres de acetato			
Acetato de etila		25-30	Frutado/solvente
Acetato de isoamila		1,2-2	Banana
Acetato de feniletíl		0,1-3,8	Rosas/Mel
Ésteres de etila			
Hexanoato de etila		0,2-0,23	Maça/frutado
Octanoato de etila		0,9-1,0	Maça/anis
Álcoois superiores			
1-propanol		600	Álcool/doce
Álcool Isobutílico		100	Solvente
Álcool Isoamílico		50-65	Alcoólico/banana
Álcool Amílico		50-70	Alcoólico/solvente
Álcool 2-feniletíl		40	Rosas
Aldeído			
Acetaldeído		5-15	Maça verde
Fenóis			
4 vinil-guaiacol		0,3	Cravo
Dicetonas vicinais			
Diacetil (2,3-butanodiona)		0,1-0,2	Manteiga
2,3-pentanodiona		0,9-1,0	Manteiga/caramelo

Os álcoois superiores são compostos extremamente importantes na composição do *flavor* das bebidas, conferindo aromas florais, frutados ou herbais, dependendo do sinergismo entre outros compostos presentes (MICHEL et al., 2016b). São produzidos através da via de Ehrlich (Figura 3), onde aminoácidos podem sofrer transaminação para os α -cetoácidos correspondentes, com perda de grupo amino. O α -cetoácido sofre uma descarboxilação irreversível para seu respectivo aldeído. A

etapa final desse processo é uma reação de redução catalisada pelas enzimas álcool desidrogenase ou formaldeído desidrogenase, convertendo o aldeído em seus respectivos álcoois superiores (EHRlich, 1907).

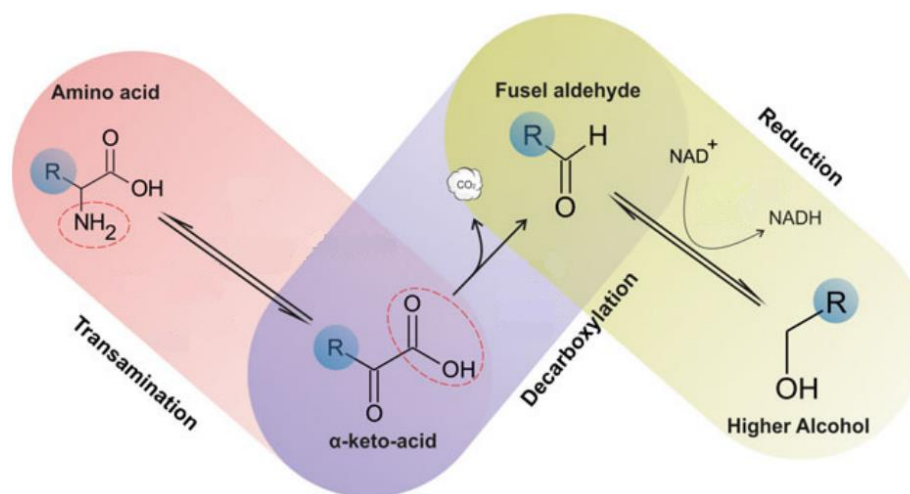


Figura 3 – Produção de álcoois superiores pela via de Ehrlich (PIRES et al., 2014).

Os ésteres são compostos que exercem grande papel no aroma e sabor das bebidas. Apesar de apresentarem-se em concentrações menores que outros compostos ativos de sabor, possuem limite de percepção muito baixos (VERSTREPEN et al., 2003; SAISON et al., 2009; PIRES et al., 2014). São sintetizados no citoplasma celular durante a fase vigorosa da fermentação primária e por terem natureza lipofílica são facilmente difundidos para o meio externo (PIRES et al., 2014).

Os ésteres são descritos em duas classes: os ésteres de acetato e os ésteres de ácidos graxos de cadeia média (AGCM). Os ésteres de acetato são sintetizados a partir de uma molécula de álcool superior ou etanol e uma de acetil-CoA, enquanto os AGCM, como o nome indica, são provenientes de um ácido graxo de cadeia média e um radical de etanol (Figura 4) (VERSTREPEN et al., 2003; PIRES et al., 2014; MICHEL et al., 2016b).

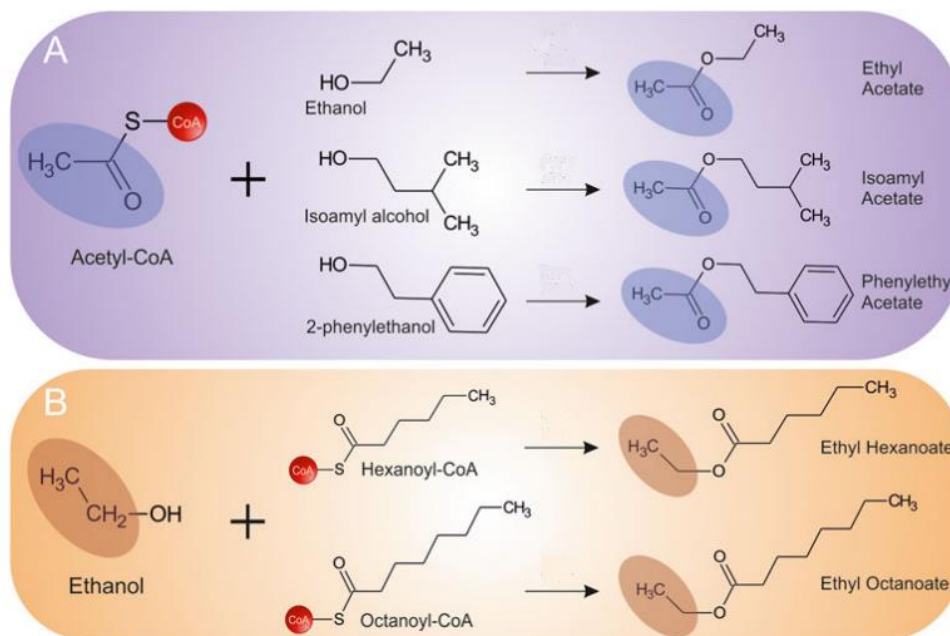


Figura 4 – Biossíntese de ésteres de acetado (a) e ésteres de ácidos graxos de cadeia média (b) (PIRES et al., 2014).

Compostos fenólicos são produzidos tanto por leveduras *Saccharomyces* quando por não-*Saccharomyces* e podem ser desejados para alguns tipos de cerveja e considerados *off-flavor* em outros (SCHOLTES; NIZET e COLLIN, 2014). Estes compostos são originados a partir da descarboxilação de ácidos como o ferúlico, cumárico e cinâmico presentes no mosto (VANBENEDEN et al., 2008). Desta forma, o ácido ferúlico pode ser descarboxilado em 4-vinil-guaiacol, que remete ao aroma de cravo, interessante em cervejas de trigo do estilo alemão, porém indesejável para os outros tipos de cerveja (COGHE et al., 2004). Outro fenólico, este indesejável em qualquer tipo de cerveja por apresentar aroma de solvente, pode surgir da descarboxilação do ácido cumárico em 4-vinil-fenol. Da mesma forma o ácido cinâmico pode ser descarboxilado em 4-vinil-benzol, gerando outro *off-flavor* com aroma semelhante a isopor (SCHOLTES; NIZET e COLLIN, 2014).

Outros compostos voláteis de interesse que devem, para a maioria das cervejas, estarem em concentrações baixas, são o acetaldeído e diacetil (WHITE e ZAINASHEFF, 2010). O acetaldeído é produzido durante a fase primária do crescimento das leveduras como decorrência do metabolismo do açúcar pela via glicolítica, sendo um dos principais representantes dos compostos carbonila voláteis, representando aproximadamente 60% do total de aldeídos da cerveja (WANG et al., 2006; PAN et al., 2011). Presente em pequenas concentrações atribui aroma frutado,

entretanto à medida que sua concentração aumenta, pode conferir aroma que remete ao de maçã verde ou grama cortada. Em níveis elevados ainda pode provocar *off-flavor* que remete a solvente (JIN-JING et al., 2010; ROSCA et al., 2016; WALKER e STEWART, 2016). Durante a etapa de maturação da cerveja, parte do acetaldeído pode ser metabolizado (SHEN et al., 2014). O diacetil é uma dicetona vicinal formada durante a fermentação primária, sendo um subproduto na síntese do aminoácido valina (KROGERUS e GIBSON, 2013) ou pode aparecer em cervejas por meio de contaminantes como bactérias do ácido láctico (WALKER e STEWART, 2016). A presença de diacetil acima do limiar de percepção (0,1 mg/L), principalmente em cervejas do estilo Lager, é indesejável por apresentar *off-flavor* que remete a manteiga rançosa (DASARI e KÖLLING, 2011). Entretanto, durante a maturação ou fermentação secundária da cerveja, o diacetil é convertido em acetoína e posteriormente em 2,3-butanodiol, que são compostos menos perceptíveis sensorialmente (MORADO, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar uso de co-cultura de leveduras do gênero *Saccharomyces* com não-*Saccharomyces* para produção de cervejas.

3.2 Específicos

- Estudar a proporção de leveduras não-*Saccharomyces* (*P. anomala*, *T. delbrueckii* e *C. apicola*) em co-cultura com *S. cerevisiae* US-05 em extrato de malte *pale ale* lupulado em concentrações de 10 a 22 °Brix durante 14 dias de fermentação.
- Verificar a influência das diferentes co-culturas, a proporção do inóculo, bem como a concentração do mosto na produção de etanol, compostos voláteis e parâmetros físico-químicos.
- Avaliar sensorialmente a cerveja produzida na condição que gerou maior concentração de etanol nas co-culturas (*P. anomala*, *T. delbrueckii* e *C. apicola*) e na cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* US-05.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos, substrato e meios de cultura

As leveduras utilizadas neste trabalho foram *Torulaspota delbrueckii* TD 291 Level 2[®] Biodiva (Lallemand) cedida pela empresa, *Pichia anomala* ATCC 8168 cedido pelo banco de culturas da FIOCRUZ, *Candida apicola* IP5 do banco de culturas do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos (LAPROBQI) da Universidade Federal de Viçosa – MG. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi a cepa comercial US-05 da Fermentis[®].

Extrato de malte líquido concentrado e lupulado para cervejas do tipo *pale ale* foi gentilmente doado pela Artebrew[®].

Caldo YPD (1% (m/v) extrato de levedura (OXOID), 1% (m/v) peptona (HIMEDIA), 2% (m/v) dextrose (HIMEDIA)) foi utilizado para ativação das culturas e caldo YPD suplementado com 15% (v/v) de glicerol (SYNTH[®]) como crioconservante foi usado para estoques de culturas que foram colocadas em freezer a -80 °C para armazenamento a longo prazo e a -20 °C para uso imediato.

Os reagentes para a análise de nitrogênio amino livre foram ninidrina (MERCK), glicina (SYNTH[®]) e acetato de sódio (SYNTH[®]).

4.2 Planejamento experimental

O planejamento adotado foi o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes: concentração do mosto e proporção entre as leveduras na co-cultura (Tabela 2).

O delineamento foi aplicado em 4 (quatro) blocos, no qual um dos blocos foi o tratamento controle com presença apenas da levedura *S. cerevisiae* US-05 e os demais blocos foram tratamentos contendo *S. cerevisiae* em co-cultura com *P. anomala*, *C. apicola* e *T. delbrueckii*.

Tabela 2 - Planejamento fatorial com os valores codificados e originais das variáveis em estudo.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Concentração do mosto	Proporção entre leveduras	Concentração do mosto (°Brix)	Proporção entre leveduras ¹ (Cel/mL)
1	-1,41	0	10	1:100 ($10^4/10^6$)
2	-1	-1	12	1:10 ($10^5/10^6$)
3	-1	1	12	1:1000 ($10^3/10^6$)
4	0	-1,41	16	1:1 ($10^6/10^6$)
5	0	0	16	1:100 ($10^4/10^6$)
6	0	0	16	1:100 ($10^4/10^6$)
7	0	0	16	1:100 ($10^4/10^6$)
8	0	1,41	16	1:10000 ($10^2/10^6$)
9	1	-1	20	1:10 ($10^5/10^6$)
10	1	1	20	1:1000 ($10^3/10^6$)
11	1,41	0	22	1:100 ($10^4/10^6$)

¹ A proporção entre as leveduras segue a sequência: *S. cerevisiae*/não-*Saccharomyces*.

O delineamento constituiu de um planejamento fatorial 2² com quatro pontos axiais e três repetições no ponto central, gerando 11 (onze) ensaios em cada bloco, totalizando 44 ensaios (Figura 5).

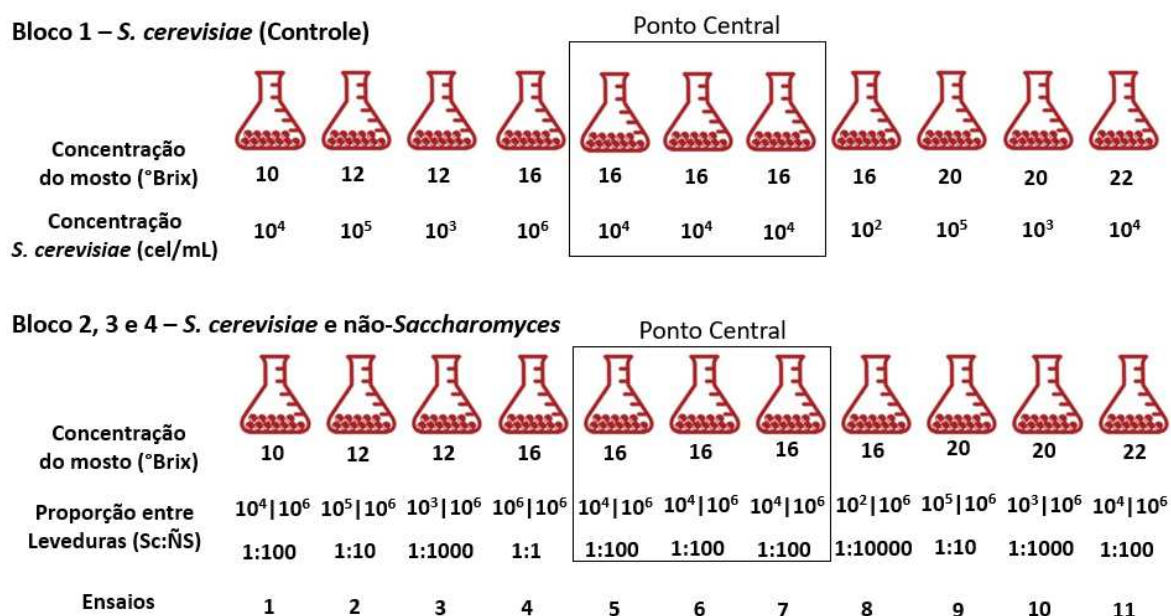


Figura 5 – Delineamento experimental em blocos. Sc = *S. cerevisiae*; ÑS = Não-*Saccharomyces*.

As variáveis independentes foram: concentração do mosto (CM) e proporção entre as leveduras (PL) e as variáveis respostas foram produção de etanol e glicerol. Os resultados da tabela 2 foram ajustados a um polinômio quadrático (ao nível de 90% de confiança) que representa o efeito das variáveis independentes no nível linear e quadrático e sua interação (Equação 1). Após o ajuste do modelo aos dados foi calculado a melhor combinação que otimize as variáveis respostas. Para tanto, foi utilizado o software STATISTICA 7.0.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot CM + \beta_2 \cdot PL + \beta_3 \cdot CM^2 + \beta_4 \cdot PL^2 + \beta_5 \cdot CM \cdot PL \quad \text{Eq.1}$$

onde: β_0 , β_1 , β_2 , β_3 , β_4 e β_5 são coeficientes da equação; CM é a concentração do mosto, PL é a proporção entre as leveduras e Y é a variável resposta.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparo do mosto cervejeiro e inóculos

O mosto para a fermentação foi elaborado com extrato de malte *pale ale* lupulado ArteBrew® diluído em água mineral (HÉLIOS) nas concentrações propostas pelo delineamento obtendo volumes de 330 mL para cada reator. Foram pasteurizados em banho maria a 65 °C por 30 min e posteriormente resfriados a temperatura de 20 °C. Os inóculos foram pré-cultivados em caldo YPD 2% por 24 h a 28 °C sem agitação, transferido para caldo YPD 8% e mantido sob agitação por 24 h a 28 °C. Após este procedimento, o pré-inóculo foi centrifugado a 2.500 g por 10 min e ressuspendido em extrato de malte *pale ale* lupulado a 8 °Brix para adaptação e crescimento sob agitação por 24 h a 28 °C. O número de células foi monitorado em câmara de Neubauer até atingir concentração de 10⁷ células/mL e então feitas as diluições para atingir a concentração proposta no delineamento (Figura 6). O volume de inóculo a ser adicionado foi centrifugado a 2.500 g por 10 min e o sobrenadante descartado.

As fermentações foram conduzidas em ambiente com temperatura controlada de 20 °C.

4.3.2 Análises

A proporção entre as leveduras na co-cultura foi acompanhada por meio de citometria de fluxo em intervalos de 24 h até o final da fermentação, no 14º dia. O perfil de açúcares (maltose, glicose, produção de glicerol e etanol) foi avaliado a cada 24 h por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação do nitrogênio amino livre (FAN) também foi realizada em intervalos de 24 h. As amostras foram coletadas na região central do reator sem que este fosse homogeneizado, evitando assim coletar células e partículas sedimentadas. Ao final do processo de fermentação foi realizada a avaliação do perfil de compostos voláteis nas bebidas por meio de cromatografia a gás (CG).

4.3.2.1 Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas junto ao Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia no Departamento de Biologia Geral e no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para a avaliação da proporção entre as leveduras na co-cultura, foi utilizado anticorpos anti-*S. cerevisiae* (AcSC-FITC) específicos (banco de anticorpos do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia - UFV), os quais possibilitam a marcação da *S. cerevisiae* diferenciando esta das não-*Saccharomyces*.

Assim, as amostras obtidas a partir dos diferentes tratamentos dos ensaios de fermentação foram centrifugadas a 2.500 g por 5 min e as células incubadas com os AcSC-FITC (10 µg/mL) por 30 min à temperatura ambiente. Após nova centrifugação, as células foram lavadas com solução de PBS (*Phosphate-buffered saline*). Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Immunocytometry System) para determinar a porcentagem de células marcadas. As análises foram feitas usando o programa FlowJo X.

4.3.2.2 Perfil de açúcares, glicerol e etanol

Para as análises de glicose, maltose, glicerol e etanol, alíquotas de 1 mL de cada tratamento, em cada tempo, foram coletadas e centrifugadas a 2.500 g por 10 min e o sobrenadante congelado a -20 °C até as análises. Após descongelamento, as amostras foram diluídas 20 vezes com água MiliQ e filtradas em filtro Gelman com poro de 0,22 µm (ACRODISC®). Posteriormente, as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC – 20AT equipado com uma coluna Aminex® HPX-87H, utilizando ácido sulfúrico (VETEC®) a 5 mM como fase móvel e a identificação se deu por detector de índice de refração. Padrões dos compostos de interesse (glicose - SYNTH®, maltose - SYNTH®, etanol - VETEC®, glicerol - SYNTH®) foram submetidos ao mesmo processo para correlação do tempo de retenção e concentrações dos mesmos nas amostras (SCHMIDELL et al., 2001).

Os padrões foram preparados em uma solução estoque de concentração 500 mM/L e a partir desta foram feitas diluições para construção da curva de calibração com no mínimo 5 concentrações distintas. Com os valores da concentração usada e área do pico gerada foi plotado um gráfico contendo a correlação entre os dados, assim com a área do pico dada pelo cromatograma pode-se determinar a concentração do composto na amostra.

4.3.2.3 Quantificação de nitrogênio amino livre

Nitrogênio amino livre foi determinado por método espectrofotométrico, usando-se como reagente de coloração a ninidrina 2% (m/v) em solução tampão de etileno glicol/acetato de sódio (pH 5,5). A glicina foi usada como padrão e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (KASUAKI) em 575 nm, sendo água destilada usada como branco (ABERNATHY; SPEDDING e STARCHER, 2009).

4.3.2.4 Quantificação de compostos voláteis

Os compostos voláteis produzidos a partir de cada tratamento foram quantificados nas bebidas segundo a metodologia descrita para vinhos pelo “Office International de la Vigne et du Vin” em cromatógrafo a gás Shimadzu® GC-17A, modelo QP5050 com detector de ionização de chama (FID), equipado com uma coluna capilar Supelco PAG de dimensões 30 m x 0,25 mm de espessura do filme x

0,25 µm de diâmetro interno. Hélio foi utilizado como gás de arraste, ar sintético como gás de ignição e manutenção da chama e gás hidrogênio como fonte de combustível para chama do detector FID.

As condições utilizadas na corrida foram: Split de 1,0; Temperatura do injetor de 180 °C; Temperatura do detector de 200 °C; Vazão do gás de arraste (He) de 1 mL/min; Vazão do ar sintético de 175 mL/min; Vazão da chama (H₂) de 20 mL/min. A rampa de temperatura foi 35 °C por 5 min, subida em taxa de 10 °C/min para 120 °C com parada de 10 min, subida em taxa de 10 °C/min até 180 °C e parada de 3 min, somando 32,5 min de corrida. A pressão na coluna foi de 66 kPa e fluxo total de 21 mL/min.

As concentrações dos compostos de interesse foram quantificadas por meio de uma curva padrão gerada utilizando um mix de padrões (acetato de etila, acetato de isoamila, acetato feniletil, hexanoato de etila, octanoato de etila, álcool 1-propílico, álcool isobutílico, álcool isoamílico, álcool amílico, 2-fenietanol e acetaldeído) e padrão interno (4-metil-2-pentanol).

4.3.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada para os tratamentos que levaram a cervejas com maior teor de etanol.

Dessa forma, uma nova produção da cerveja foi elaborada nas condições do ponto central para os quatro blocos: controle - *S. cerevisiae* US-05 (16 °Brix e 10⁴ cel/mL); co-cultura entre *P. anomala* ATCC 8168 e *S. cerevisiae* (16 °Brix e proporção 10⁶|10⁴ cel/mL); co-cultura entre *T. delbrueckii* TD 291 e *S. cerevisiae* (16 °Brix e proporção 10⁶|10⁴ cel/mL) e co-cultura entre *C. apicola* IP5 e *S. cerevisiae* (16 °Brix e proporção 10⁶|10⁴ cel/mL) com duração de fermentação de 14 dias a 20 °C e posterior maturação por 14 dias a 2 °C. Após este período, as cervejas foram envasadas em garrafas de 355 mL com adição de *priming* (solução de sacarose) na concentração final de 0,5% (v/v) para ser realizada a refermentação e carbonatação da cerveja. A refermentação foi conduzida a 20 °C durante 14 dias e então a temperatura foi reduzida para 2 °C até a realização da análise sensorial, o que se deu após 60 dias.

Um grupo de cinco provadores treinados (*beer sommelier*) foram recrutados e instruídos a preencher uma ficha de avaliação para classificar cada atributo sensorial,

usando escala de 1 a 10 (Anexo 1). Os atributos de aroma avaliados foram: frutado/ésteres, álcool, cítrico, lúpulo, dimetil sulfeto (DMS), cereais/grãos, maltado, caramelo, torrado, sulfúrico, oxidado/envelhecido e doce. Os atributos de sabor avaliados foram os mesmos citados para aroma, acrescidos de amargo, ácido, adstringente e corpo. As análises foram realizadas em ambiente com boa iluminação e temperatura confortável. Uma garrafa de 355 mL de cada cerveja foi servida na temperatura de 5 °C em copos plásticos lisos e transparentes. O volume ingerido da amostra foi definido a critério de cada julgador, até que o mesmo tivesse definido sua nota, sendo permitido a eles retornar em amostras anteriores para confirmação. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância por meio do software STATISTICA 7.0 (STATSOFT INC). Os dados processados foram utilizados para construir gráficos do tipo aranha que fornecem informações sobre a contribuição de cada atributo para a qualidade organoléptica (aroma e sabor) geral das cervejas (ANALYTICA EBC, 1997; CANONICO et al., 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Proporção entre *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na fermentação

5.1.1 *Torulaspota delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*

Nos ensaios de co-cultura nos quais *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* foram inoculados em concentrações próximas (1:10 no ensaio 2 e 1:1 no ensaio 4) houve uma coexistência das duas leveduras, não apresentando efeito competitivo (Figura 6). Uma condição semelhante foi avaliada por Canonico et al. (2017), onde foi estabelecida proporção de 1:20 entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254, respectivamente, em mosto lupulado com 12,3 °Brix e a 19 ± 1 °C. Naquele estudo, *T. delbrueckii* DiSVA 254 dominou a fermentação durante todo o período avaliado (18 dias). O mesmo efeito foi observado no trabalho de Toh et al. (2018), em que *T. delbrueckii* TD 291 dominou a fermentação quando em proporção de 1:20. Entretanto, quando a proporção foi menor (1:2), a levedura *S. cerevisiae* US-04 exerceu grande competição, sendo observado declínio precoce da população de *T. delbrueckii* TD 291. Os autores relacionaram este fato às múltiplas pressões seletivas que *S. cerevisiae* pode exercer contra outras leveduras, como os mecanismos de contato célula-célula (NISSEN et al., 2003; RENAULT et al., 2013) e produção de peptídeos antimicrobianos (BRANCO et al., 2015; KEMSAWASD et al., 2015).

A condição proposta no ensaio 9 (proporção de 1:10) permitiu que *S. cerevisiae* US-05 dominasse toda etapa de fermentação, mesmo iniciando em uma concentração 10 vezes menor que *T. delbrueckii* (Figura 6). Esse efeito pode ter sido devido à alta concentração inicial de extrato (20 °Brix), que desfavorece o crescimento de *T. delbrueckii* em favor da *S. cerevisiae* US-05, que é uma cepa dimensionada para condições usuais em cervejarias, sendo altamente adaptada às condições de alta densidade, principalmente em se tratando de mosto cervejeiro lupulado (STEWART, 2016; FERMENTIS, 2019).



Figura 6— Porcentagem de *T. delbrueckii* (—) e *S. cerevisiae* (—) em co-cultura durante a fermentação na produção de cervejas. Ensaio 1 (10 °Brix e 1:100); Ensaio 2 (12 °Brix e 1:10); Ensaio 3 (12 °Brix e 1:1000); Ensaio 4 (16 °Brix e 1:1); Ensaio 5, 6 e 7 (16 °Brix e 1:100); Ensaio 8 (16 °Brix e 1:10000); Ensaio 9 (20 °Brix e 1:10); Ensaio 10 (20 °Brix e 1:1000) e Ensaio 11 (22 °Brix e 1:100).

Por outro lado, quando *T. delbrueckii* foi inoculado em concentrações pelo menos 100 vezes superiores, ela dominou o processo de fermentação. A única exceção foi observada no ensaio 8 (16 °Brix, 1:10000) em que ao 7º dia de

fermentação *S. cerevisiae* se igualou em proporção com *T. delbrueckii*, permanecendo assim até o final do processo. Neste sentido, um experimento realizado por Canonico et al. (2016) propôs uma fermentação em co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254 em proporções de 1:1; 1:10 e 1:20, respectivamente, e também das culturas puras na produção de cerveja tipo *American Amber Ale* com concentração inicial do mosto de 12,7 °Brix e temperatura 20 °C. Foi verificado que a cinética de fermentação (g CO₂/dia) no ensaio de proporção 1:1 foi semelhante ao do ensaio em cultura pura de *S. cerevisiae*, ou seja, quando *T. delbrueckii* foi inoculada na mesma concentração da *S. cerevisiae*, a velocidade com que a fermentação ocorreu não foi afetada. Entretanto, o crescimento em biomassa (UFC/mL) no ensaio 1:1 em relação às culturas puras foi menor para ambas culturas, indicando a ocorrência de competição. Quando a proporção de *T. delbrueckii* foi aumentada (ensaio de proporção 1:10 e 1:20) a cinética de fermentação foi mais lenta em relação à da cultura pura de *S. cerevisiae*, porém foi verificado que *T. delbrueckii* não sofreu influência competitiva da *S. cerevisiae*, dominando a fermentação durante todo o período.

Além da inoculação, *T. delbrueckii* pode também dominar o processo fermentativo por apresentar maior rendimento em biomassa em relação a *S. cerevisiae*. Alves-Araujo et al. (2007) e Merico et al. (2007) verificaram que apesar de *T. delbrueckii* ser classificada como *Crabtree* positiva, ela é menos sensível à glicose que *S. cerevisiae* e assim o rendimento em produção de biomassa de *T. delbrueckii* permanece maior que o de *S. cerevisiae* mesmo sob condições limitadas de oxigênio devido à maior proporção de carbono que pode fluir pelo metabolismo respiratório.

5.1.2 *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*

Quando *S. cerevisiae* foi inoculada em co-cultura com *P. anomala*, um comportamento competitivo foi observado nos ensaios 2, 4, ponto central, 9 e 10 (Figura 7). Nestes casos, a inoculação de *S. cerevisiae* a partir de 10³ cel/mL foi suficiente para que em poucos dias de fermentação essa levedura dominasse o processo em decorrência da queda na população de *P. anomala*. Efeito contrário foi observado por Canonico et al. (2019), em que, em ensaios de co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *P. anomala* DiSVA 2, esta última prevaleceu em todo o processo

de fermentação quando inoculada em maior proporção (1:10 e 1:20), exercendo efeito competitivo contra *S. cerevisiae*, cuja população reduziu ao longo do tempo. Entretanto, quando a fermentação foi conduzida em proporção de 1:1, as leveduras mantiveram suas proporções, sem apresentar competição.



Figura 7 – Porcentagem de *P. anomala* (—) e *S. cerevisiae* (—) em co-cultura durante a fermentação na produção de cervejas. Ensaio 1 (10 °Brix e 1:100); Ensaio 2 (12 °Brix e 1:10); Ensaio 3 (12 °Brix e 1:1000); Ensaio 4 (16 °Brix e 1:1); Ensaio 5, 6 e 7 (16 °Brix e 1:100); Ensaio 8 (16 °Brix e 1:10000); Ensaio 9 (20 °Brix e 1:10); Ensaio 10 (20 °Brix e 1:1000) e Ensaio 11 (22 °Brix e 1:100).

Nos demais ensaios, tanto *P. anomala* quanto *S. cerevisiae* alternaram suas proporções ao longo do tempo, chegando ao final da fermentação de forma equiparada (Figura 7). Domizio et al. (2011) verificaram que *P. anomala* Pi9 afetou o desenvolvimento de *S. cerevisiae* EC1118 nos primeiros 7 dias de fermentação em co-cultura quando em proporções de 1:100 e 1:10000 (*Saccharomyces*/Não-*Saccharomyces*) na produção de vinho branco. Entretanto, após 15 dias de fermentação foi observado um grande declínio na população de *P. anomala*, sendo que a população de *S. cerevisiae* se manteve estável, prevalecendo no meio. Já em proporção de 1:1 foi verificado pelo mesmo autor que *S. cerevisiae* não foi afetada pela *P. anomala*.

Uma observação relevante é que nos ensaios 8, nos quais *S. cerevisiae* iniciou em pequenas proporções em relação às não-*Saccharomyces* (10^2 | 10^6 cel/mL), quando em co-cultura com *T. delbrueckii*, a *S. cerevisiae* foi capaz de se desenvolver e chegar em proporção próxima a 50% (Figura 6). Entretanto, quando nas mesmas condições, porém em co-cultura com *P. anomala*, o número de células da *S. cerevisiae* permaneceu praticamente constante, com proporção em torno de 35% até o final da fermentação (Figura 7). Esta diferença no comportamento pode ser atribuído as formas de atuação das leveduras na presença de outras, onde neste caso a *P. anomala* inibiu o crescimento de *S. cerevisiae*, podendo esta inibição estar relacionada à hidrólise da parede celular pela enzima *b*-glucanase e/ou à produção de metabólitos voláteis (por exemplo, acetato de etila) (WALKER, 2011; PADILLA; GIL e MANZANARES, 2018). No entanto, já foi também relatado que *S. cerevisiae* produz compostos tóxicos como peptídeos antimicrobianos, os quais alteram a integridade da membrana plasmática (BRANCO et al., 2015). Outro fator que pode estar relacionado com a dominância da *S. cerevisiae* US-05 em alguns ensaios é o fato de que esta cepa é adaptada para o uso em mosto cervejeiro, o qual possui por exemplo compostos do lúpulo, que podem ser prejudiciais ao crescimento microbiano (SAKAMOTO e KONINGS, 2003). Dessa forma, as duas leveduras têm potencial competitivo, fazendo com que seja necessário mais aprofundamento na avaliação das interações entre esses organismos para esclarecer o comportamento delas em co-cultura.

A avaliação da dinâmica populacional dos ensaios de co-cultura entre *S. cerevisiae* e *C. apicola* foi comprometida não sendo possível sua realização pois

houve reação cruzada dos anticorpos anti-Sc utilizados, os quais exerceram reação positiva contra a *C. apicola*.

A citometria de fluxo permite visualizar as interações entre leveduras em co-cultura, sendo uma boa ferramenta para acompanhar o processo de fermentação em nível de proporção, para os casos que as técnicas de marcação das células sejam conseguidas. Além disto, para um completo entendimento das interações interespecíficas, bem como o real mecanismo que comandam as interações entre os organismos são necessárias outras formas de avaliação como quantificação de moléculas tóxicas ou sinais, entre outras técnicas.

5.2 Acompanhamento do processo fermentativo

O acompanhamento do processo fermentativo foi feito por meio de análises físico-químicas, que auxiliam na interpretação das mudanças que ocorrem durante a fermentação. Assim, as características das cervejas produzidas estão descritas na Tabela 3. Os pHs finais das cervejas produzidas se mantiveram próximos entre os ensaios, variando de 4,61 a 4,80 no bloco controle, de 4,55 a 4,93 no bloco com *C. apicola*, de 4,61 a 4,83 no bloco com *P. anomala* e de 4,56 a 4,76 no bloco com *T. delbrueckii* (Tabela 3). Esses valores são semelhantes também aos pHs finais das cervejas produzidas por Canonico et al. (2019) com co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *P. anomala* DiSVA 2 em proporções de 1:1, 1:2 e 1:20 (entre 4,44 e 4,48). Já no trabalho de Canonico et al. (2017) a cerveja produzida em co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254 em proporção de 1:20 possuía pH igual a 4,32.

Em todos os ensaios, apesar de a produção do mosto ter sido padronizada, houve diferença na concentração inicial de maltose entre os blocos, sendo maior no bloco controle, seguido da co-cultura com *T. delbrueckii*, *P. anomala* e em menor concentração nos ensaios com *C. apicola* (Tabela 3). Essa variação ocorreu pelo fato de os experimentos (blocos) terem sido realizados em momentos diferentes, na ordem exata decrescente das concentrações de maltose. Neste caso, é possível que durante o armazenamento, a maltose tenha sido oxidada ou transformada quimicamente em outra substância que não foi quantificada neste experimento.

Tabela 3 – Características das cervejas produzidas por fermentação em cultura pura e em co-cultura.

Ensaio	Concentração inicial do extrato (°Brix)	Proporção (Sc:ÑS)	Bloco	Características								
				Maltose Inicial (g/L)	Maltose Final (g/L)	FAN Inicial (mg/L)	FAN Final (mg/L)	FAN Consumo (Δ mg/L)	pH	Extrato final (°Brix)	Extrato Consumo (Δ °Brix)	Etanol % (v/v)
1	10	1:100	Sc (Controle)	56,34	12,45	99,21	73,19	26,02	4,65	5,6	4,4	2,16
			Sc + Td	51,36	12,56	68,28	49,02	19,26	4,62	5,2	4,8	4,26
			Sc + Pa	42,5	12,00	83,97	60,58	23,39	4,41	5,6	4,4	2,7
			Sc + Ca	33,24	12,96	93,22	75,76	17,46	4,55	5,8	4,2	3,77
2	12	1:10	Sc (Controle)	64,08	13,03	109,46	77,16	32,30	4,64	7,0	5,0	2,38
			Sc + Td	61,79	13,40	103,92	58,77	45,15	4,60	6,6	5,4	5,08
			Sc + Pa	41,22	13,81	96,10	72,46	23,64	4,61	6,6	5,4	2,94
			Sc + Ca	36,18	12,94	112,28	88,92	23,36	4,64	6,8	5,2	3,81
3	12	1:1000	Sc (Controle)	63,56	12,88	109,21	83,06	26,15	4,72	7,0	5,0	2,18
			Sc + Td	62,63	13,47	64,91	61,42	3,49	4,72	6,8	5,2	4,87
			Sc + Pa	46,26	12,10	99,73	87,47	12,26	4,66	6,6	5,4	2,91
			Sc + Ca	36,35	16,49	105,71	89,46	16,25	4,55	7,4	4,6	4,28
4	16	1:1	Sc (Controle)	89,29	13,29	140,87	115,87	25,00	4,61	9,4	6,6	3,14
			Sc + Td	78,79	15,48	110,30	75,63	34,67	4,56	9,2	6,8	6,09
			Sc + Pa	56,92	12,74	128,62	103,36	25,26	4,64	9,2	6,8	4,87
			Sc + Ca	46,77	15,12	141,82	123,97	17,85	4,66	9,6	6,4	6,01
5	16	1:100	Sc (Controle)	79,88	14,42	137,66	117,56	20,10	4,69	9,6	6,4	3,25
			Sc + Td	78,78	17,77	98,74	82,49	16,25	4,63	9,4	6,6	6,27
			Sc + Pa	59,34	14,35	132,88	115,99	16,89	4,73	9,8	6,2	3,85
			Sc + Ca	46,49	Dp*	135,38	128,93	6,45	4,75	10,4	5,6	5,5

Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Td = *Torulaspora delbrueckii*; Ca = *Candida apicola*; Pa = *Pichia anomala*; ÑS = Não-*Saccharomyces*; *Dp = Dados perdidos.

Tabela 3 – Continuação.

Ensaio	Concentração inicial do extrato (°Brix)	Proporção (Sc:ÑS)	Bloco	Características								
				Maltose Inicial (g/L)	Maltose Final (g/L)	FAN Inicial (mg/L)	FAN Final (mg/L)	FAN Consumo (Δ mg/L)	pH	Extrato final (°Brix)	Extrato Consumo (Δ °Brix)	Etanol % (v/v)
6	16	1:100	Sc (Controle)	90,40	13,93	139,33	115,23	24,10	4,70	9,6	6,4	3,4
			Sc + Td	82,08	Dp*	91,64	80,56	11,08	4,65	9,6	6,4	5,8
			Sc + Pa	48,34	17,38	131,00	108,11	22,89	4,77	10,4	5,6	3,54
			Sc + Ca	46,18	Dp*	134,17	130,95	3,22	4,77	11,2	4,8	4,79
7	16	1:100	Sc (Controle)	84,38	15,15	142,92	115,69	27,23	4,69	9,6	6,4	3,28
			Sc + Td	79,56	Dp*	115,00	88,15	26,85	4,62	9,6	6,4	6,12
			Sc + Pa	49,51	14,21	121,24	104,86	16,38	4,77	9,8	6,2	4,35
			Sc + Ca	41,60	Dp*	146,52	125,71	20,81	4,76	10,8	5,2	4,98
8	16	1:10000	Sc (Controle)	82,05	14,99	136,12	122,41	13,71	4,71	9,6	6,4	3,13
			Sc + Td	74,08	Dp*	104,52	81,65	22,87	4,69	11,0	5,0	5,1
			Sc + Pa	65,64	17,7	129,37	112,74	16,63	4,73	10,4	5,6	3,48
			Sc + Ca	46,24	Dp*	143,84	125,58	18,26	4,81	12,6	3,4	3,05
9	20	1:10	Sc (Controle)	109,91	33,81	166,89	148,56	18,33	7,76	14,4	5,6	3,03
			Sc + Td	93,34	Dp*	104,52	Dp*	Dp*	4,68	14,8	5,2	5,16
			Sc + Pa	57,15	27,26	151,26	141,13	10,13	4,75	14,6	5,4	4,33
			Sc + Ca	55,70	Dp*	163,84	151,35	12,49	4,80	15,6	4,4	2,96
10	20	1:1000	Sc (Controle)	101,90	40,98	135,35	Dp*	Dp*	4,78	14,8	5,2	3,27
			Sc + Td	97,87	Dp*	124,99	114,28	10,71	4,69	15,4	4,6	4,46
			Sc + Pa	66,19	31,43	166,40	146,14	20,26	4,82	15,4	4,6	3,89
			Sc + Ca	47,15	Dp*	183,31	159,81	23,50	4,88	17,0	3,0	2,14
11	22	1:100	Sc (Controle)	116,70	44,54	192,78	175,35	17,43	4,80	17,4	4,6	2,56
			Sc + Td	103,81	Dp*	142,45	127,28	15,17	4,76	17,4	4,6	4,49
			Sc + Pa	78,54	36,38	178,91	159,52	19,39	4,83	17,8	4,2	3,41
			Sc + Ca	60,92	Dp*	191,23	178,07	13,16	4,93	19,0	3,0	2,96

Com respeito ao consumo de nitrogênio amino livre (FAN), foi observado que na co-cultura com *T. delbrueckii* os ensaios 2, 4 e 8; na co-cultura com *P. anomala* os ensaios 4, 8 e 11 e na co-cultura com *C. apicola* apenas o ensaio 8 foram os que tiveram maior consumo de FAN em relação ao bloco controle. De forma similar, Canonico et al. (2016) observaram maior consumo de FAN nas co-culturas entre *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* em proporções de 1:1, 1:10 e 1:20 em relação à cultura pura de *S. cerevisiae* US-05, nesses casos os autores verificaram ainda uma aumento no teor de compostos voláteis. O consumo de FAN do meio está interligado com a formação de novos aminoácidos, síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, a viabilidade e vitalidade das células e também diretamente relacionado à produção de compostos voláteis de aroma na cerveja (STEWART, 2016).

O consumo de extrato (°Brix) do mosto durante a fermentação das cervejas em todas as condições testadas no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 e as co-culturas de *T. delbrueckii* com *S. cerevisiae* US-05, *P. anomala* com *S. cerevisiae* US-05 e *C. apicola* com *S. cerevisiae* US-05 pode ser acompanhado pela Figura 8.

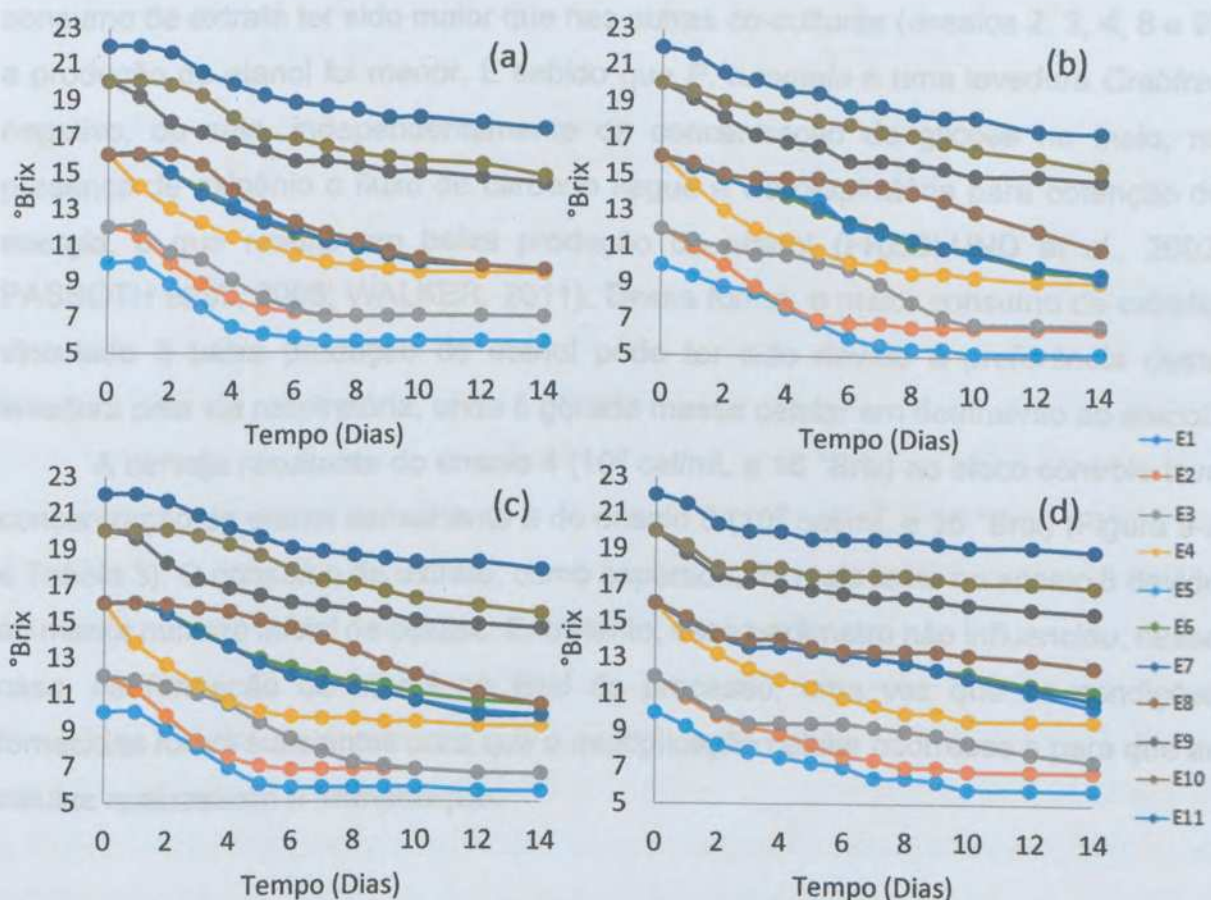


Figura 8 – Consumo de extrato (°Brix) do mosto ao longo do tempo dos ensaios 1 ao 11 no bloco controle com *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e nas co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

Foi verificado um lento consumo do extrato (°Brix) do mosto nos ensaios 8 ($10^2|10^6$ cel/mL e 16 °Brix) e 3 ($10^3|10^6$ cel/mL e 12 °Brix) na co-cultura entre *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, respectivamente, em relação ao controle (Figura 8-b). Este efeito pode estar relacionado à dificuldade da *S. cerevisiae* em se desenvolver no momento inicial da fermentação por ter sido inoculada em uma baixa concentração, e também por uma baixa taxa de consumo de maltose por parte da *T. delbrueckii*. Este comportamento está de acordo com o que foi relatado no experimento de Toh et al. (2018) que verificaram consumo lento de maltose quando *T. delbrueckii* estava em proporção de 20x maior que *S. cerevisiae* em relação à fermentação em co-cultura cuja *T. delbrueckii* estava na proporção 2 vezes maior. Quando *T. delbrueckii* foi utilizada em cultura pura, os níveis de maltose praticamente ficaram inalterados. Em uma varredura feita entre 10 diferentes cepas de *T. delbrueckii*, apenas uma cepa foi capaz de metabolizar maltose (MICHEL et al., 2016a).

Avaliando o consumo de extrato (Δ) entre as co-culturas testadas (Tabela 3), é possível verificar que na co-cultura com *P. anomala*, apesar de em vários ensaios o consumo de extrato ter sido maior que nas outras co-culturas (ensaios 2, 3, 4, 8 e 9), a produção de etanol foi menor. É sabido que *P. anomala* é uma levedura *Crabtree* negativo, ou seja, independentemente da concentração de glicose no meio, na presença de oxigênio o fluxo de carbono segue a via respiratória para obtenção de energia, o que resulta em baixa produção de etanol (FREDLUND et al., 2002; PASSOTH et al., 2006; WALKER, 2011). Dessa forma, o maior consumo de extrato, vinculado à baixa produção de etanol pode ter sido devido à preferência desta levedura pela via respiratória, onde é gerada massa celular em detrimento ao etanol.

A cerveja resultante do ensaio 4 (10^6 cel/mL e 16 °Brix) no bloco controle teve concentração de etanol semelhante à do ensaio 8 (10^2 cel/mL e 16 °Brix) (Figura 9-a e Tabela 3). O consumo de extrato, como esperado, foi mais lento no ensaio 8 devido ao menor número inicial de células. Entretanto, esse parâmetro não influenciou, nesse caso, na formação de etanol no final do processo, uma vez que as condições fornecidas foram suficientes para que a multiplicação celular ocorresse e para que as células realizassem a fermentação.

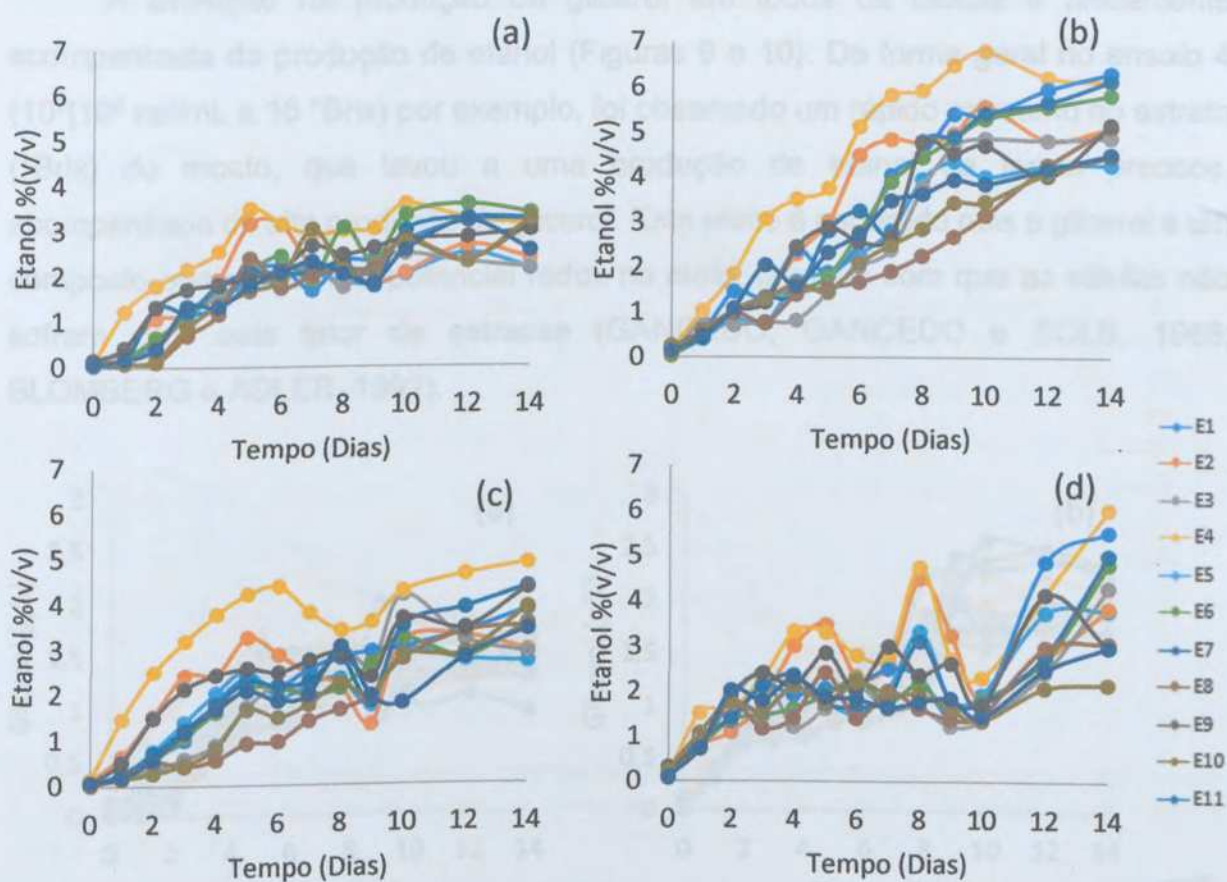


Figura 9 – Produção de etanol ao longo do tempo dos ensaios 1 ao 11 no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e as co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

Foi evidente a maior produção de etanol em todos os ensaios com co-cultura na presença de *T. delbrueckii* (Figura 9 e Tabela 3), independentemente da concentração de extrato e da proporção entre as leveduras, em relação aos demais blocos. Além disso, todas as co-culturas geraram maior teor de etanol em relação à cultura pura de *S. cerevisiae* US-05. Nesse sentido, nas condições testadas, a adição das leveduras não-*Saccharomyces* para a realização da fermentação em co-cultura exercem de forma geral contribuição na produção de etanol.

Canonico et al. (2016) avaliaram a fermentação em co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254 em proporção de 1:10 na produção de cervejas a partir de mosto com 12,7 °Brix, e obtiveram cerveja com teor de etanol de 4,68% (v/v), concentração pouco abaixo do encontrado nesta pesquisa que foi de 5,08% (v/v) em condição de fermentação semelhante como no ensaio 2 ($10^5|10^6$ cel/mL e 12 °Brix). Esta pequena diferença no teor de etanol pode ser atribuída à cepa de levedura utilizada.

A evolução na produção de glicerol em todos os blocos é nitidamente acompanhada da produção de etanol (Figuras 9 e 10). De forma geral no ensaio 4 ($10^6|10^6$ cel/mL e 16 °Brix) por exemplo, foi observado um rápido consumo no extrato (°Brix) do mosto, que levou a uma produção de etanol de forma precoce, acompanhada de alta produção de glicerol. Este efeito é esperado pois o glicerol é um composto que equilibra o potencial redox no meio, fazendo com que as células não sofram com este fator de estresse (GANCEDO; GANCEDO e SOLS, 1968; BLOMBERG e ADLER, 1992).

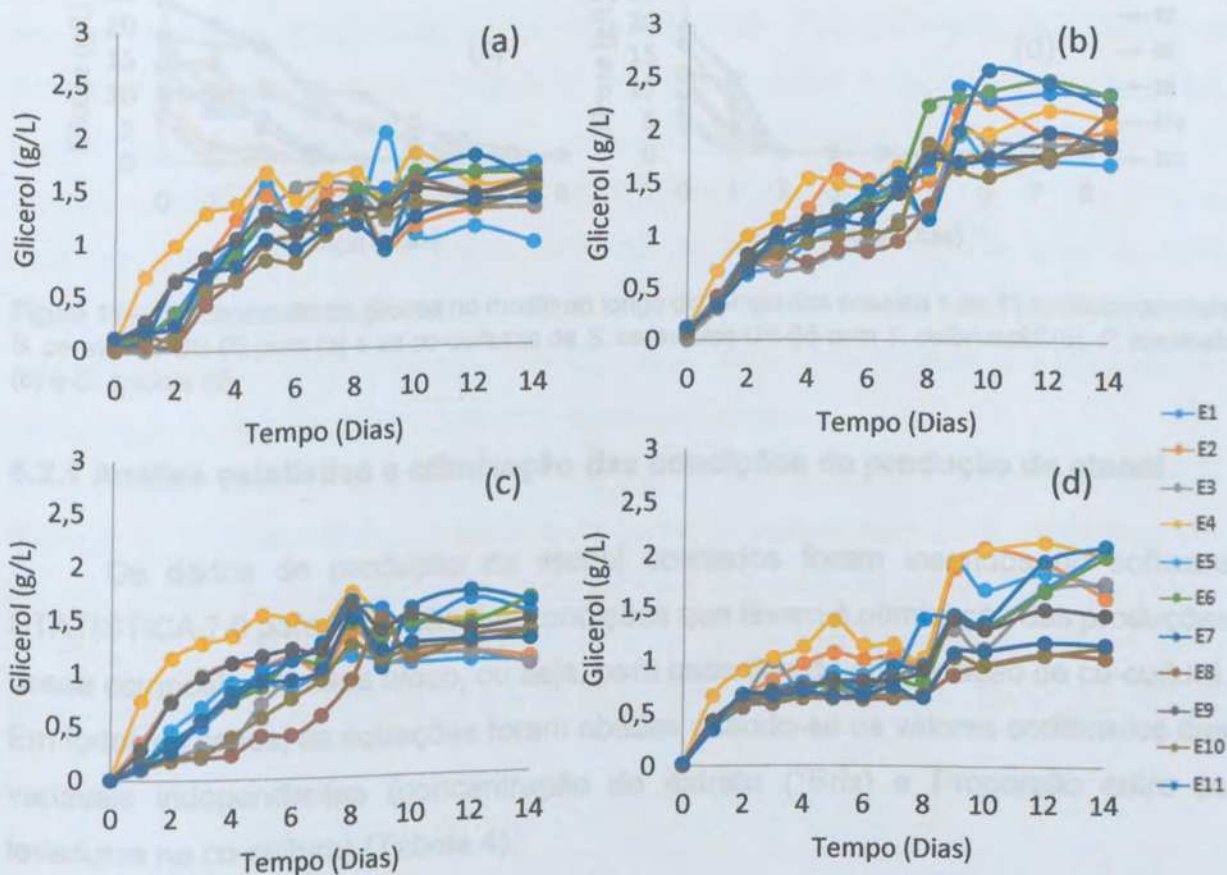


Figura 10 – Produção de glicerol ao longo do tempo dos ensaios 1 a 11 no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e as co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

Um consumo mais rápido de glicose foi observado nas co-culturas com *T. delbrueckii* e com *C. apicola* em relação à cultura pura com *S. cerevisiae* (Figura 11). Este efeito pode ter ocorrido pois nas co-culturas o número total de células inoculadas foi maior que no bloco controle. Assim, como a glicose é um substrato simples e altamente assimilável, seu consumo foi rápido e por ambas as espécies de leveduras presentes. Entretanto, na co-cultura com *P. anomala* verificou-se um retardo no

consumo, fato que pode estar associado às condições de competição ocorrida entre as leveduras.

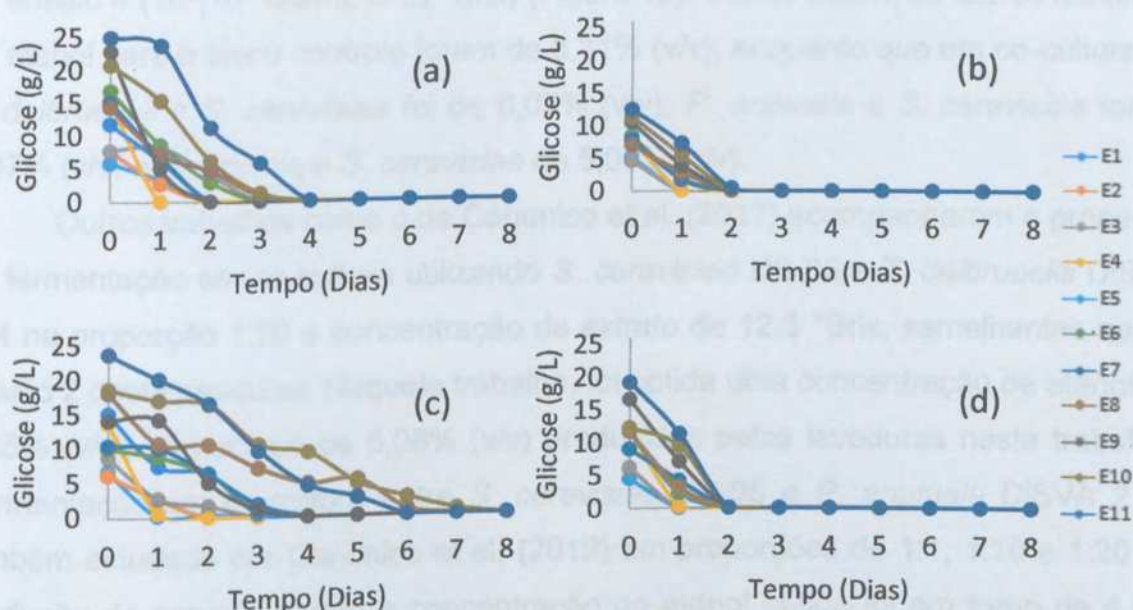


Figura 11 – Concentração de glicose no mosto ao longo do tempo dos ensaios 1 ao 11 no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e as co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

5.2.1 Análise estatística e otimização das condições de produção de etanol

Os dados de produção de etanol coletados foram inseridos no software STATISTICA 7.0 para obtenção das condições que levam à otimização das produções desse composto em cada bloco, ou seja, para cada tipo de combinação de co-cultura. Em todos os casos, as equações foram obtidas usando-se os valores codificados das variáveis independentes (concentração do extrato (°Brix) e Proporção entre as leveduras na co-cultura) (Tabela 4).

Tabela 4 – Equações que representam a condição otimizada de produção de etanol em cada bloco.

Bloco	Equação	R ²
Controle (Sc pura)	Etanol = 3,31 + 0,29 Brix – 0,48 Brix ²	0,8954
Sc + Td	Etanol = 6,07 – 0,87 Brix ² – 0,29 Proporção – 0,26 Proporção ²	0,9465
Sc + Pa	Etanol = 4,02 + 0,42 Brix – 0,48 Brix ² – 0,30 Proporção	0,7886
Sc + Ca	Etanol = 5,09 – 0,52 Brix – 1,03 Brix ² – 0,57 Proporção	0,7411

Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Td = *Torulasporea delbrueckii*; Pa = *Pichia anomala*; Ca = *Candida apicola*.

A concentração máxima de etanol foi obtida na região do ponto central para todas as leveduras testadas, exceto na co-cultura com *P. anomala*, onde o máximo foi no ensaio 4 ($10^6|10^6$ cel/mL e 16 °Brix) (Figura 12). Sendo assim, os teores máximos de etanol para o bloco controle foram de 3,31% (v/v), enquanto que em co-cultura de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* foi de 6,07% (v/v); *P. anomala* e *S. cerevisiae* foi de 4,87% (v/v) e *C. apicola* e *S. cerevisiae* de 5,09% (v/v).

Outros trabalhos como o de Canonico et al. (2017) acompanharam o processo de fermentação em co-cultura utilizando *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254 na proporção 1:20 e concentração de extrato de 12,3 °Brix, semelhantes ao do ensaio 2 desta pesquisa. Naquele trabalho, foi obtida uma concentração de etanol de 4,65% (v/v), menor que os 5,08% (v/v) produzidos pelas leveduras neste trabalho. Fermentação em co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *P. anomala* DiSVA 2 foi também estudada por Canonico et al. (2019) em proporções de 1:1, 1:10 e 1:20 na produção de cervejas, onde a concentração de etanol obtida foi em torno de 4,0% (v/v). As diferenças nas concentrações de etanol encontradas nesta pesquisa em relação ao dos outros autores citados pode estar relacionada a variações na composição do mosto, bem como das cepas utilizadas.

Assim, para a aplicação de uso de fermentação em co-cultura com *T. delbrueckii*, *P. anomala* e *C. apicola*, bem como da cultura pura de *S. cerevisiae* US-05, a produção de etanol pode ser dimensionada utilizando-se as equações da Tabela 4. Para tanto, os valores de concentração do mosto desejados devem estar compreendidos entre 10 a 22 °Brix e as proporções entre leveduras de 1:1 a 1:10000.

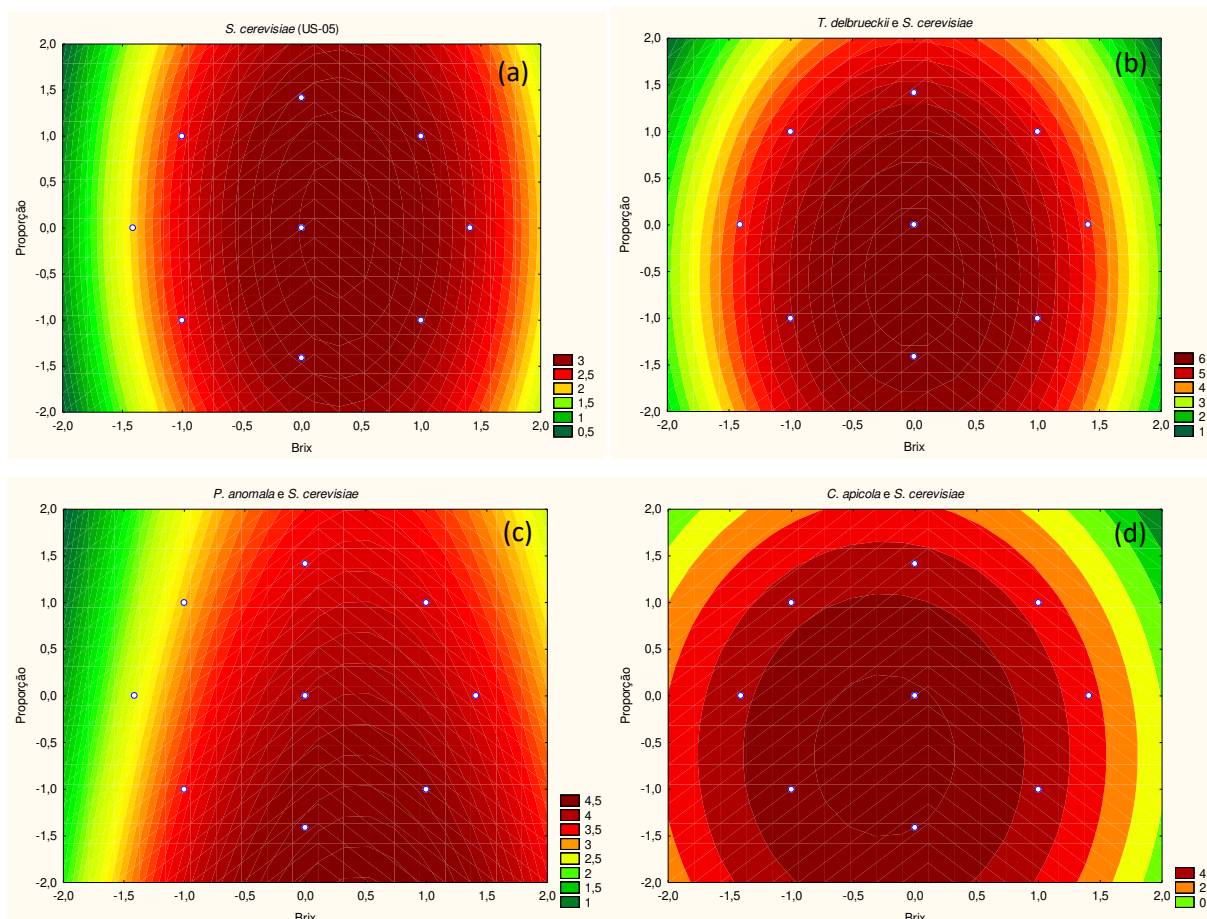


Figura 12 – Curvas de contorno da concentração de etanol em função do brix e da proporção entre leveduras no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e as co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

5.2.2 Análise estatística e otimização das condições de produção de glicerol

Assim como para etanol, os dados relativos à concentração de glicerol nos mostos foram analisados no software STATISTICA 7.0 para obtenção da condição maximizada de produção desse composto (Tabela 5 e Figura 13).

Tabela 5 – Equações que representam as condições para produção de glicerol em cada bloco.

Bloco	Equação	R ²
Controle (Sc pura)	Glicerol = 1,62 + 0,13 Brix – 0,21 Brix ²	0,9486
Sc + Td	Glicerol = 2,29 – 0,27 Brix ² – 0,08 Proporção ²	0,8996
Sc + Pa	Glicerol = 1,58 + 0,12 Brix – 0,23 Brix ² – 0,1 Proporção ²	0,9227
Sc + Ca	Glicerol = 2,05 – 0,19 Brix – 0,31 Brix ² + 0,19 Proporção – 0,27 Proporção ²	0,8806

Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Td = *Torulaspota delbrueckii*; Pa = *Pichia anomala*; Ca = *Candida apicola*.

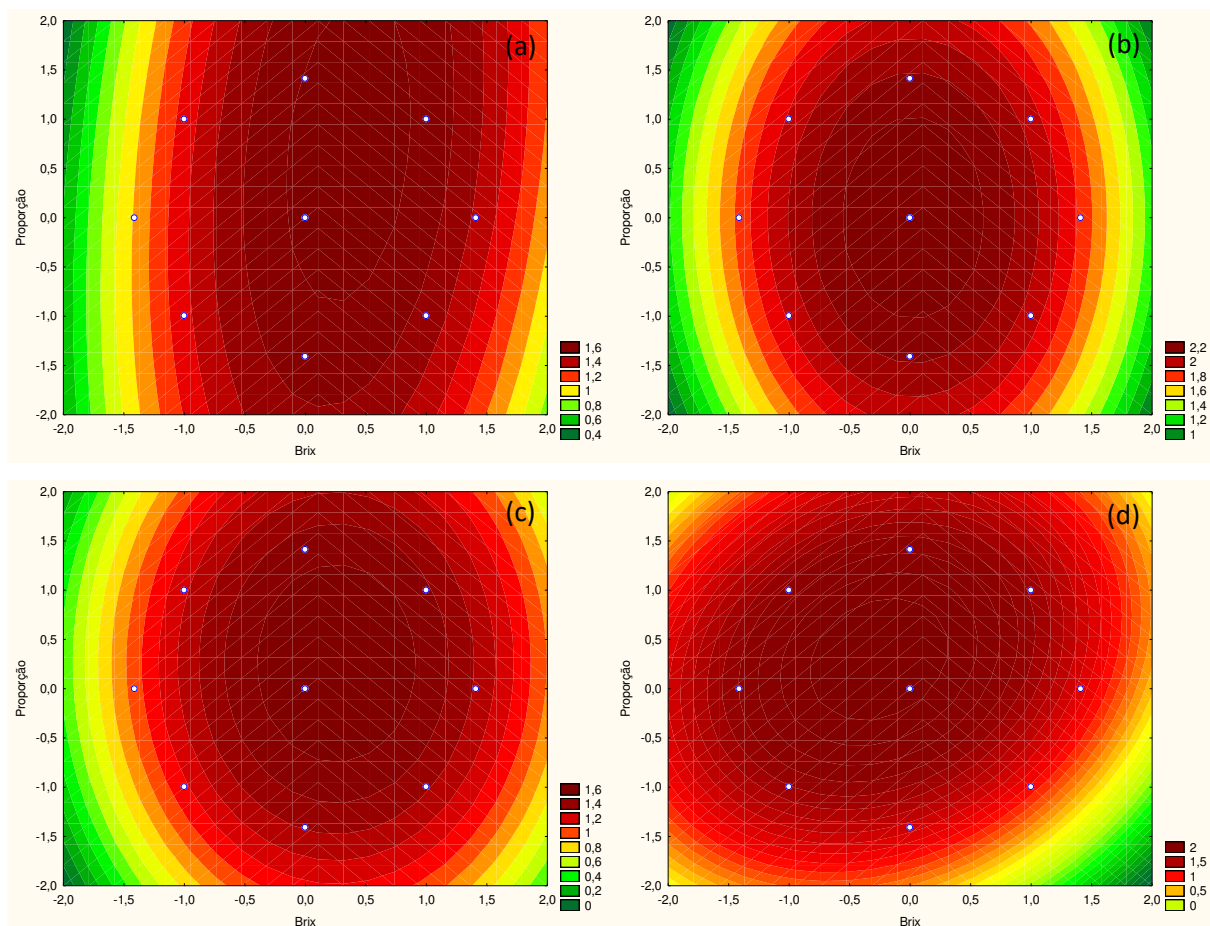


Figura 13 – Curvas de contorno da concentração de glicerol em função do brix e da proporção entre leveduras no bloco controle *S. cerevisiae* US-05 pura (a) e as co-culturas de *S. cerevisiae* US-05 com *T. delbrueckii* (b), *P. anomala* (c) e *C. apicola* (d).

Durante a multiplicação da levedura, alguns intermediários da glicólise são utilizados para a biossíntese de componentes celulares, o que causa um excesso de NADH e leva a um desequilíbrio redox. Dessa forma, a síntese do glicerol, que envolve a oxidação de um NADH para NAD⁺, ajuda a restabelecer o balanço redox, principalmente em condições de estresse osmótico (GANCEDO; GANCEDO e SOLS, 1968; BLOMBERG e ADLER, 1992).

O glicerol é o terceiro maior produto da fermentação, depois do etanol e do dióxido de carbono, podendo beneficiar o corpo das bebidas alcoólicas fermentadas em certas concentrações devido a sua viscosidade e densidade (ZHAO; PROCOPIO e BECKER, 2015). Além disso, o glicerol equilibra a sensação alcoólica e a adstringência das bebidas, conferindo também um grau de suavidade no paladar (JONES et al., 2008).

A concentração de glicerol em cervejas varia entre 1 a 2 g/L, onde seu limiar de percepção sensorial é de 10 g/L (PARKER e RICHARDSON, 1970; BRIGGS et al., 2004). Em experimento de otimização realizado por Kaur et al. (2013) em vinhos, onde foram variadas as concentrações de glicerol e etanol, a maior aceitabilidade sensorial da bebida foi obtida em 6,19 g/L de glicerol. Em cervejas, a concentração de glicerol no âmbito sensorial é pouco estudada, devendo ser realizadas mais pesquisas para o esclarecimento da sua real contribuição.

As concentrações máximas de glicerol encontradas neste trabalho foram, assim como para o etanol, na região do ponto central, com valores de 1,62 g/L no bloco controle, 2,29 g/L entre *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*, 1,58 g/L na co-cultura entre *P. anomala* e *S. cerevisiae*, 2,05 g/L na co-cultura entre *C. apicola* e *S. cerevisiae*. Dessa forma, em todos os blocos o glicerol foi produzido em concentrações ideais para cervejas.

Foi relatado que *T. delbrueckii* possui boa resposta ao estresse por pressão osmótica (ALVES-ARAÚJO et al., 2007), sendo esta propriedade relacionada à sua capacidade de produzir grandes quantidades de glicerol sob condições anaeróbicas (BRANDAM et al., 2013). Este efeito foi verificado em fermentação em co-cultura entre *T. delbrueckii* Td 291 e *S. cerevisiae* (Cross evolution-285) em proporção de $10^7:10^6$ UFC/mL em mosto sintético de suco de uva estudados por Shekhawat, Bauer e Setati (2017), que obtiveram valores de glicerol de 6,84 g/L em condição anaeróbica, 6,46 g/L em 1% de oxigênio dissolvido, 1,74 g/L em 5% e 1,09 g/L em 21%. Estes trabalhos comprovam a boa produção de glicerol pela *T. delbrueckii* sob condições anaeróbicas, como verificado em nosso trabalho, onde esta levedura em co-cultura produziu mais glicerol que as demais co-culturas estudadas.

5.2.3 Produção de compostos voláteis pelas leveduras

A concentração final dos compostos voláteis presentes nas bebidas está descrita na Tabela 6. O composto acetato de etila apresentou-se em concentrações superiores em todos os ensaios envolvendo a co-cultura entre *P. anomala* e *S. cerevisiae* em relação aos outros blocos, independentemente da condição proposta, tendo um destaque no ensaio 1 ($10^4|10^6$ cel/mL e 10 °Brix) e ensaio 2 ($10^5|10^6$ cel/mL e 12 °Brix), nos quais sua concentração foi ainda maior com valores de 180,67 e

159,16 mg/L, respectivamente (Tabela 6). O mesmo foi observado para o composto 1-propanol, com exceção do ensaio 11 ($10^4|10^6$ cel/mL e 22 °Brix), cuja concentração foi maior nas cervejas produzidas apenas com *S. cerevisiae* em relação aos outros blocos. Algumas cepas de *P. anomala* foram relatadas como produtoras de acetato de etila em níveis acima de 150 mg/L, sendo que níveis próximos de 200 mg/L podem atribuir características desagradáveis às bebidas, como aromas que remetem a solvente (PRETORIUS e LAMBRECHTS, 2000; VIANA et al., 2008).

Pichia anomala já foi estudada na produção de vinho e cidra de maçã (SATORA et al., 2014; YE; YUE e YUAN, 2014) e relatada como boa produtora de compostos voláteis em bebidas (PASSOTH et al., 2006). Um estudo de produção de vinho realizado com fermentação em co-cultura entre *P. anomala* Pi9 e *S. cerevisiae* EC1118 revelou um aumento geral da produção de propanol, álcool isobutílico, álcool amílico, acetato de isoamila e hexanoato de etila em relação à fermentação em cultura pura de *S. cerevisiae* (DOMIZIO et al., 2011). Em fermentação de cervejas, *P. anomala* ainda é pouco estudada por ser relacionada à deterioração dessa bebida (TIMKE et al., 2008). Entretanto, Osburn et al. (2018) mostraram que a cepa de *P. anomala* YH82 exibiu boa performance na elaboração de cerveja ácida, produzindo notas de frutas como maçã, pera e damasco. Em pesquisa realizada por Canonico et al. (2019) com produção de cerveja a partir de co-cultura entre *P. anomala* DiSVA 2 e *S. cerevisiae* US-05 na proporção de 1:1 e extrato com 12,3 °Brix, foram produzidos acetato de etila a 15,7 mg/L, assim como 1-propanol (17,9 mg/L) e álcool isobutílico (7,6 mg/L). Essas concentrações foram semelhantes às obtidas neste estudo nas condições do ensaio 4 ($10^6|10^6$ cel/mL e 16 °Brix). Além disso, estes mesmos autores concluíram que essas leveduras, quando em co-cultura, produziram cervejas com maior concentração de acetato de etila e menor concentração de acetaldeído em comparação às cervejas produzidas apenas com *S. cerevisiae*. Dessa forma, *P. anomala* em combinação com *S. cerevisiae* pode trazer características desejáveis na produção de cervejas.

Tabela 6 – Concentração dos compostos voláteis nas cervejas produzidas por fermentações em cultura pura e co-cultura.

Ensaio	Concentração inicial do extrato (°Brix)	Proporção (Sc:ÑS)	Bloco	Compostos Voláteis (mg/L)					
				Acetato de etila	1-propanol	Álcool isobutílico	Álcool isoamílico	Octanoato de etila	Álcool 2-feniletil
1	10	1:100	Sc (Controle)	4,98	3,89	9,50	73,33	11,73	7,66
			Sc + Td	4,77	3,50	6,76	59,14	9,87	4,40
			Sc + Pa	180,67	7,25	12,02	91,50	9,62	4,29
			Sc + Ca	4,08	3,66	5,79	42,20	13,93	10,35
2	12	1:10	Sc (Controle)	5,57	5,06	8,84	72,87	9,19	3,57
			Sc + Td	4,96	3,41	9,03	69,95	8,85	4,81
			Sc + Pa	159,16	4,88	8,59	70,00	9,88	2,31
			Sc + Ca	4,72	4,48	8,78	64,65	13,12	8,93
3	12	1:1000	Sc (Controle)	5,01	4,50	8,97	78,33	8,97	4,11
			Sc + Td	5,06	4,06	6,65	62,44	10,15	3,25
			Sc + Pa	27,04	6,20	7,66	67,89	9,73	1,96
			Sc + Ca	4,60	4,93	8,72	56,41	7,59	8,94
4	16	1:1	Sc (Controle)	8,46	4,87	8,36	64,60	10,82	5,20
			Sc + Td	7,03	7,89	7,96	74,98	9,43	4,66
			Sc + Pa	11,43	21,39	7,34	62,58	9,96	3,24
			Sc + Ca	6,82	5,97	9,55	74,63	7,80	4,19
5	16	1:100	Sc (Controle)	6,32	6,78	9,23	93,60	10,97	4,93
			Sc + Td	6,44	2,92	3,72	91,07	8,12	5,47
			Sc + Pa	15,10	6,81	15,38	96,47	9,57	2,22
			Sc + Ca	3,47	*nd	1,89	68,50	8,28	5,62

Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Td = *Torulaspota delbrueckii*; Ca = *Candida apicola*; Pa = *Pichia anomala*; ÑS = Não-*Saccharomyces* *nd = não detectado.

Tabela 6 – Continuação.

Ensaio	Concentração inicial do extrato (°Brix)	Proporção (Sc:ÑS)	Bloco	Compostos Voláteis (mg/L)					
				Acetato de etila	1- propanol	Álcool isobutílico	Álcool isoamílico	Octanoato de etila	Álcool 2- feniletíl
6	16	1:100	Sc (Controle)	7,73	8,16	7,09	156,17	9,06	7,73
			Sc + Td	4,66	4,69	8,52	80,46	8,99	3,28
			Sc + Pa	13,46	4,76	7,00	74,98	7,40	1,59
			Sc + Ca	8,65	4,97	8,57	59,68	8,47	4,92
7	16	1:100	Sc (Controle)	5,61	5,97	9,21	95,36	11,14	3,59
			Sc + Td	4,88	4,34	9,20	80,16	11,70	3,70
			Sc + Pa	9,25	6,56	10,82	100,71	8,01	3,07
			Sc + Ca	5,26	6,21	8,80	65,23	8,58	5,18
8	16	1:10000	Sc (Controle)	5,52	5,60	10,09	96,80	12,67	3,84
			Sc + Td	6,24	2,87	6,22	59,99	7,52	4,55
			Sc + Pa	32,70	7,39	7,57	74,36	*nd	1,67
			Sc + Ca	3,27	1,45	5,31	44,01	*nd	4,13
9	20	1:10	Sc (Controle)	6,28	4,85	5,86	66,00	*nd	0,71
			Sc + Td	5,62	6,33	5,11	61,88	7,71	1,32
			Sc + Pa	11,43	7,12	5,79	66,04	*nd	0,17
			Sc + Ca	4,75	0,55	6,01	47,48	*nd	1,88
10	20	1:1000	Sc (Controle)	6,68	5,52	5,68	72,65	7,69	0,98
			Sc + Td	4,17	2,15	4,20	43,23	8,05	0,36
			Sc + Pa	14,28	6,41	5,41	78,90	8,52	*nd
			Sc + Ca	3,27	1,63	4,45	35,34	*nd	1,19
11	22	1:100	Sc (Controle)	6,22	9,01	7,18	82,16	*nd	0,74
			Sc + Td	3,50	1,84	4,63	68,44	*nd	*nd
			Sc + Pa	27,69	5,93	3,71	43,80	9,02	*nd
			Sc + Ca	3,27	0,64	2,10	26,33	*nd	0,59

Torulasporea delbrueckii é uma não-*Saccharomyces* relatada por alguns autores como boa produtora de compostos voláteis que levam à melhoria dos atributos sensoriais de cervejas como aroma frutado (BASSO; ALCARDE e PORTUGAL, 2016; MICHEL et al., 2016a; CANONICO; COMITINI e CIANI, 2017). Entretanto, a fermentação em co-cultura com *T. delbrueckii* realizada nesta pesquisa não trouxe aumento na concentração de acetato de etila (um dos compostos responsáveis pelo aroma frutado) em relação à fermentação em cultura pura de *S. cerevisiae* (Tabela 6). Apenas no ensaio 8 ($10^2|10^6$ cel/mL e 16 °Brix) foi possível observar um aumento na concentração desse composto. Este fato pode estar relacionado à proporção utilizada neste ensaio (1:10000), onde *T. delbrueckii* iniciou a fermentação em maior número, podendo contribuir com esta característica.

Nos ensaios 3 ($10^3|10^6$ cel/mL e 12 °Brix) e ensaio 10 ($10^3|10^6$ cel/mL e 20 °Brix) *T. delbrueckii* dominou a fermentação (Figura 6) e, nestes casos, a concentração de octanoato de etila, que remete ao aroma de maçã/anis, foi superior ao do bloco controle, indicando que nestas condições pode haver um incremento destes aromas nas bebidas. Canonico et al. (2016) também verificaram aumento de octanoato de etila em fermentação de cervejas por co-cultura entre *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii* DiSVA 254 em proporções de 1:1, 1:10 e 1:20, respectivamente em relação a cultura pura de *S. cerevisiae* US-05.

Canonico, Comitini e Ciani (2017) elaboraram cerveja por fermentação em co-cultura entre *T. delbrueckii* DiSVA 254 e *S. cerevisiae* US-05 na proporção de 1:20 com 12,3 °Brix de concentração inicial do mosto, condição esta que se aproxima ao ensaio 2 ($10^5|10^6$ cel/mL e 12 °Brix) realizado nesta pesquisa. A partir dessa condição, foram obtidas bebidas com acetato de etila a 20,38 mg/L, 1-propanol a 24,63 mg/L, álcool isobutílico a 28,06 mg/L, álcool isoamílico a 70,74 mg/L, octanoato de etila a 0,011 mg/L e álcool 2-fenietil a 15,45 mg/L. Estes valores estão divergentes dos encontrados nesta pesquisa, com exceção do álcool isoamílico (Tabela 6). Essa divergência pode ter devido às diferenças entre a composição dos mostos utilizados, assim como nas condições em que os processos foram realizados, ou mesmo nas diferentes cepas de *T. delbrueckii* utilizadas.

O álcool isoamílico, composto volátil que remete ao aroma de álcool/banana (MEILGAARD, 1975), foi produzido em maior concentração em relação a todos outros compostos analisados, ficando em vários ensaios com concentração acima do limite de percepção, que é de 50 a 65 mg/L (MEILGAARD, 1975). A concentração de octanoato de etila nas condições testadas variaram de 7,69 a 12,67 mg/L nas cervejas produzidas por cultura pura, de 7,52 a 11,70 mg/L na co-cultura com *T. delbrueckii*, de 7,59 a 13,12 mg/L na co-cultura com *C. apicola* e de 7,40 a 9,96 mg/L na co-cultura com *P. anomala*. Esta concentração está muito acima do limite de percepção desse composto, que é de 0,9-1,0 mg/L, sendo que o octanoato de etila possui aroma que remete à maçã/anis (MEILGAARD, 1975).

O composto álcool 2-feniletil remete ao aroma de rosas, e sua concentração variou entre 0,17 e 10,35 mg/L em todos os ensaios, concentração esta que está abaixo do limite de percepção desse composto, que é de 40 mg/L (MEILGAARD, 1975). Os compostos 1-propanol e álcool isobutílico também ficaram para todas as condições testadas abaixo do limite de percepção de 600 e 100 mg/L, respectivamente (MEILGAARD, 1975). Estas concentrações baixas são interessantes para a qualidade final de cervejas, visto que estes compostos são relacionados ao aroma de álcool/doce e solvente (MEILGAARD, 1975). Entretanto, a concentração absoluta de um composto volátil por si só não define o sabor e aroma de uma cerveja. O mais importante é a sinergia que ocorre entre os compostos. Mesmo estando abaixo do seu limite de percepção teórico, o composto ainda pode contribuir para a bebida final (MEILGAARD, 1975).

Em todas as condições testadas não foram detectados acetato de isoamila, acetato feniletil, álcool amílico e hexanoato de etila. Isto não indica que as bebidas não possuem esses compostos, mas sim que estes estão em concentração abaixo do limite de detecção do equipamento (1 mg/L).

Algumas cervejarias utilizam a técnica de fermentação em alta densidade, ou seja, utilização de altas concentrações iniciais de extrato com objetivo de otimizar a planta de produção (STEWART, 2010). Nestas condições, as leveduras são submetidas a uma situação de estresse pela elevada pressão osmótica no momento inicial da fermentação e, posteriormente, pelos altos níveis de etanol no meio. Além disso, é característico desse sistema uma maior produção de compostos voláteis, como álcoois superiores e ésteres de acetato (GIBSON, 2011; PULIGUNDLA et al.,

2011). Entretanto, de modo geral a concentração de compostos voláteis produzidos a partir da condição de alta densidade testada neste trabalho, como no ensaio 9 ($10^5|10^6$ cel/mL e 20 °Brix), foi menor que em baixa densidade, como no ensaio 2 ($10^5|10^6$ cel/mL e 12 °Brix) (Tabela 6). Este efeito pode estar associado ao menor consumo de FAN observado nestas condições (Tabela 3), possivelmente pelo fato de as leveduras, neste caso, estarem submetidas além do estresse osmótico, também ao estresse populacional da co-cultura.

A fermentação em co-cultura com a participação de leveduras não-*Saccharomyces* na produção de cervejas tem sido utilizada para aumentar a complexidade das bebidas no quesito sensorial, através da maior produção de compostos voláteis características dessas leveduras. Assim, foi observado que na co-cultura com *P. anomala* a produção de acetato de etila foi maior em relação a todas outras fermentações. Porém, para um uso adequado da *P. anomala*, deve se avaliar a condição na qual está levedura não produza quantidades demasiadamente altas desse composto, pois pode aparecer aromas de solvente que são indesejáveis nas bebidas. De forma geral, as fermentações com *T. delbrueckii* não promoveram aumento dos compostos voláteis em relação a cultura pura de *S. cerevisiae* US-05, diferentemente do relatado na literatura de que fermentações com *T. delbrueckii* promoveram bebidas com atributos sensoriais de aroma frutado.

5.3 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada para as cervejas produzidas sob as condições dos ensaios do ponto central, onde a concentração do mosto era de 16 °Brix e a proporção entre *Saccharomyces*/não-*Saccharomyces* de 1:100. A escolha desta condição se deu com base na maior concentração de etanol obtida a partir dessas combinações. A avaliação sensorial foi realizada por *beer sommeliers*, os quais julgaram as quatro cervejas distintas produzidas a partir dos diferentes blocos (Figura 14). Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o parecer nº 2.551.752.

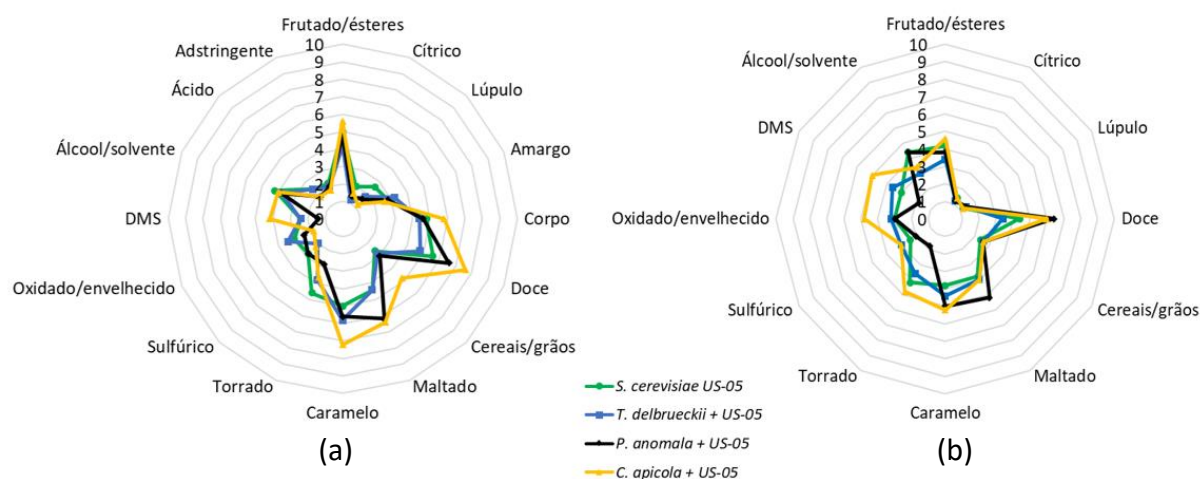


Figura 14 – Perfil sensorial de sabor (a) e aroma (b) das cervejas produzidas por *S. cerevisiae* US-05 cultura pura e as co-culturas com *T. delbrueckii*, *P. anomala* e *C. apicola*.

Na avaliação feita pelos *beer sommeliers* não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% nas médias das notas para aroma e sabor em nenhum atributo, entretanto as cervejas no geral foram avaliadas com característica de sabor doce alto, sendo mais expressivo nas co-culturas com *C. apicola* + US-05 e *P. anomala* + US-05 (Figura 14). Essas cervejas tiveram concentração final de extrato mais alto (Tabela 3), dessa forma acentuando o sabor e aroma doce da cerveja.

O atributo frutado/ésteres é de extrema importância e amplamente discutido no ramo cervejeiro. As notas médias para este atributo variaram de 4,2 a 5,6 no sabor e de 3,4 a 4,6 no aroma (Figura 14). As notas mais altas foram atribuídas à cerveja produzida com *C. apicola* e a menor nota na produzida com *T. delbrueckii*. Outras pesquisas que fizeram uso de *T. delbrueckii* DiSVA 254 em co-cultura com *S. cerevisiae* US-05, como o trabalho de Canonico et al. (2017), verificaram aumento do atributo frutado/ésteres em relação à cerveja produzida em cultura pura com *S. cerevisiae* US-05.

Pela análise dos compostos voláteis, a co-cultura com *P. anomala* teve destaque na produção de acetato de etila nas várias combinações testadas. Este éster remete ao aroma frutado (MEILGAARD, 1975), entretanto a concentração elevada deste composto em relação às outras co-culturas não foi percebida pelos julgadores durante a análise sensorial.

No contexto geral, os atributos que remetem a defeitos na cerveja como DMS, Álcool/Solvente, Sulfúrico e Oxidado/Envelhecido tiveram notas baixas em todas as

cervejas, com exceção da produzida por *C. apicola*, que teve nota de 4,8 para aroma oxidado/envelhecido, nota 5 para aroma de DMS e nota 4,2 para sabor de DMS. Uma cerveja com poucos defeitos é crucial para sua aceitação e indica que as condições propostas, bem como o processo de produção foram conduzidos de forma adequada. As notas mais altas dadas aos atributos de oxidado/envelhecido bem como de DMS na cerveja produzida com *C. apicola* não indica que esta levedura seja inadequada para a produção de cerveja, mas é interessante uma avaliação em outras condições para verificar seu comportamento.

Em todas as cervejas produzidas o aroma e sabor de lúpulo, bem como o amargor foram classificados com intensidade baixa. O extrato de malte utilizado, segundo o fabricante é lupulado, entretanto não é revelado sua concentração. Assim, as condições propostas neste estudo levaram a cervejas com alta concentração de extrato final, que remete ao sabor doce, que pode ter mascarado o amargor e o sabor de lúpulo.

Destaque para notas altas no aroma alcoólico/doce que a co-cultura com *P. anomala* obteve na avaliação sensorial. Esta percepção é compatível com os valores da concentração do composto 1-propanol, obtidas na análise química, que foram maiores para esta co-cultura em relação às demais.

Nos ensaios do ponto central na co-cultura entre *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, esta última dominou a fermentação (Figura 6), dessa forma era esperado que houvesse alguma intensificação nos atributos de aroma frutado/ésteres como relatado na literatura (CANONICO et al., 2016). Entretanto, foi observado menor consumo de FAN em relação ao bloco controle (Tabela 3), além disso foi também verificado menor concentração de alguns compostos voláteis como acetato de etila, 1-propanol, álcool isoamílico, octanoato de etila e álcool 2-fenietil (Tabela 6). Assim, como a produção de compostos voláteis está intimamente ligada ao consumo de FAN, este efeito pode justificar a menor intensidade nas notas para aroma frutado/ésteres obtidos na avaliação dos *beer sommeliers*.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível identificar algumas influências das proporções entre as leveduras durante uma fermentação em co-cultura na produção de cervejas, bem como o impacto da concentração inicial do mosto, dando origem a diferentes cervejas dependendo da levedura utilizada.

Com o uso da citometria de fluxo foi possível visualizar, ao nível de proporções, as interações entre as leveduras na co-cultura com *T. delbrueckii* e *P. anomala*, sendo uma boa ferramenta para o acompanhamento do processo fermentativo.

O uso das não-*Saccharomyces* possibilitaram a produção de cervejas com teor de etanol em níveis satisfatórios e concentração acima da fermentação tradicional apenas com *S. cerevisiae* US-05, entretanto a produção de compostos voláteis e características sensoriais frutadas não foram como esperados.

Finalmente, a utilização de leveduras não-*Saccharomyces* é viável, pois deu origem a cervejas diferenciadas, com características próprias, sendo que as interações interespecíficas não prejudicaram a produção de etanol e demais atributos físico-químicos, comparado a cerveja fermentada de forma tradicional, ou seja, apenas com *S. cerevisiae*. Estudos adicionais são interessantes para ajustar as condições de fermentação que sejam adequadas a cada objetivo.

7 REFERÊNCIAS

ABERNATHY, D. G.; SPEDDING, G.; STARCHER, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 2, p. 122–127, 2009.

ALBERGARIA, H.; FRANCISCO, D.; GORI, K.; ARNEBORG, N.; GÍRIO, F. *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 965–972, 2010.

ALBERTIN, W.; CHASSERIAUD, L.; COMTE, G.; PANFILI, A.; DELCAMP, A.; SALIN, F.; MARULLO, P.; BELY, M. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

ALVES-ARAÚJO, C.; PACHECO, A.; ALMEIDA, M. J.; SPENCER-MARTINS, I.; LEÃO, C.; SOUSA, M. J. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. **Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 898–904, 2007.

ANALYTICA EBC. Sensory Analysis: Description Analysis (IM) 13.10/1997. **European Brewery Convention**, 1997. Disponível em: <<http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=348>>. Acesso em: 5 set. 2017.

ARELLANO-PLAZA, M.; NORIEGA-CISNEROS, R.; CLEMENTE-GUERRERO, M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; ROBLES-HERRERA, P. D.; MANZO-ÁVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A.; GSCHAEDLER-MATHIS, A. Fermentative capacity of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* after oxidative stress. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, July, p. 519–526, 2017.

ARRIZON, J.; MOREL, S.; GSCHAEDLER, A.; MONSAN, P. Fructanase and fructosyltransferase activity of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 560–565, abr. 2012.

ASTRUP, A.; ESTRUCH, R.; HENDRIKS, H.; KOK, F.; MARCOS, A.; SOLFRIZZI, V.; ZUGRAVU, C.-A. Moderate consumption as part of a healthy lifestyle. **Beer and Health**, n. 5º, p. 128, 2016.

AZZOLINI, M.; TOSI, E.; LORENZINI, M.; FINATO, F.; ZAPPAROLI, G. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 277–293, 12 fev. 2015.

BAKER, E.; WANG, B.; BELLORA, N.; PERIS, D.; HULFACHOR, A. B.; KOSHALEK, J. A.; ADAMS, M.; LIBKIND, D.; HITTINGER, C. T. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 11, p. 2818–2831, nov. 2015.

BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, n. June, p. 112–120, ago. 2016.

BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMARÈDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 312–320, 2008.

BLIECK, L.; TOYE, G.; DUMORTIER, F.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R.; THEVELEIN, J. M.; VAN DIJCK, P. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 815–824, 1 fev. 2007.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 33, p. 145–212, 1992.

BRANCO, P.; VIANA, T.; ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 112–118, 2015.

BRANDAM, C.; LAI, Q. P.; JULIEN-ORTIZ, A.; TAILLANDIER, P. Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: kinetics and carbon mass balance. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 9, p. 1848–1853, 2013.

BRASIL. **Decreto nº 9.902 de 8 de Julho de 2019**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/decreto/D9902.htm>. Acesso em: 10 de agosto de 2019.

BREWERS ASSOCIATION. **For small & independent craft brewers**. Disponível em: <<https://www.brewersassociation.org/>>. Acesso em: 24 jul. 2019a.

BREWERS ASSOCIATION. **National beer sales & production data**. Disponível em: <<https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/>>. Acesso em: 24 jul. 2019b.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**. Washington: CRC press, 2004.

BUDRONI, M.; ZARA, G.; CIANI, M.; COMITINI, F. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts. In: KANAUCHI, M. **Brewing Technology**, IntechOpen, cap.4, p. 81-100, August, 2017.

CANONICO, L.; AGARBATI, A.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**, v. 56, p. 45–51, jun. 2016.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulasporea delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, n. March, p. 7–13, 2017.

CANONICO, L.; GALLI, E.; CIANI, E.; COMITINI, F.; CIANI, M. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 11, 2019.

CERVBRASIL. **Anuário 2016.** Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuário2016/161130_CervBrasil-Anuário2016_WEB.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017.

CIANI, M.; CAPECE, A.; COMITINI, F.; CANONICO, L.; SIESTO, G.; ROMANO, P. Yeast interactions in inoculated wine fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–7, 2016.

COGHE, S.; BENOOT, K.; DELVAUX, F.; VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F. R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 3, p. 602–608, 2004.

COMITINI, F.; INGENIIS DE, J.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 235–240, 2004.

DAENEN, L.; SAISON, D.; STERCKX, F.; DELVAUX, F. R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 478–488, 10 out. 2008.

DASARI, S.; KÖLLING, R. Cytosolic localization of acetohydroxyacid synthase Ilv2 and its impact on diacetyl formation during beer fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 727–731, 2011.

DE GAETANO, G.; COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; BADIMON, L.; BEJKO, D.; ALKERWI, A.; CHIVA-BLANCH, G.; ESTRUCH, R.; LA VECCHIA, C.; PANICO, S.; POUNIS, G.; SOFI, F.; STRANGES, S.; TREVISAN, M.; URSINI, F.; CERLETTI, C.; DONATI, M. B.; IACOVIELLO, L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 6, p. 443–467, mar. 2016.

DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; COMITINI, F.; GOBBI, M.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 170–180, 2011.

EHRlich, F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 40, n. 1, p. 1027–1047, jan. 1907.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Beverage production - mashing**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/mashing>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

FERMENTIS. **SafAle US-05 - Fermentis**. Disponível em: <<https://fermentis.com/en/fermentation-solutions/you-create-beer/safale-us-05/>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

FREDLUND, E. **Central Carbon Metabolism in the Biocontrol Yeast *Pichia anomala*. Influence of Oxygen Limitation**. 2004. Swedish University of Agricultural Sciences. PhD Doctoral Thesis, 2004.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395–402, ago. 2002.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M.; SOLS, A. Glycerol metabolism in yeasts: pathways of utilization and production. **European Journal of Biochemistry**, v. 5, p. 165–172, 1968.

GIBSON, B. R. 125th Anniversary review: improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 268–284, 2011.

GIRHARD, M.; TIEVES, F.; WEBER, E.; SMIT, M. S.; URLACHER, V. B. Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1625–1635, 19 fev. 2013.

GONZALEZ, R.; QUIRÓS, M.; MORALES, P. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. **Trends in Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 55–61, 2013.

GOVERNO DO BRASIL. **Número de cervejarias brasileiras cresce 23%**. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/financas-impostos-e-gestao-publica/2019/01/numero-de-cervejarias-brasileiras-cresce-23>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.

HU, X. H.; WANG, M. H.; TAN, T.; LI, J. R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R. M.; LUO, Z. W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1479–1487, 18 dez. 2007.

JIN-JING, W.; WANG, Z. Y.; LIU, X. F.; GUO, X. N.; HE, X. P.; WENSEL, P. C.; ZHANG, B. R. Construction of an industrial brewing yeast strain to manufacture beer with low caloric content and improved flavor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 767–774, 2010.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - The ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 503–517, 2013.

JONES, P. R.; GAWEL, R.; FRANCIS, I. L.; WATERS, E. J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. **Food Quality and Preference**, v. 19, n. 6, p. 596–607, 2008.

KAUR, M.; SHARMA, H. K.; PATIL, S.; SHITANDI, A. Optimization of ethanol concentration, glycerol concentration and temperature conditions of grape-mahua wine to maximize the quality and overall acceptability. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 6, p. 2426–2430, 2013.

KEMSAWASD, V.; BRANCO, P.; ALMEIDA, M. G.; CALDEIRA, J.; ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 14, p. 1–8, 2015.

KING, A.; RICHARD DICKINSON, J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 16, n. 6, p. 499–506, abr. 2000.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 317–323, 2008.

KROGERUS, K.; GIBSON, B. R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 86–97, 2013.

KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V.; GIBSON, B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 65–78, 24 jan. 2017.

LAPOLLI, C. **Mercado da Cerveja 2018**. In: ABRACERVA. 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Arned, 2016.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. Anuário da cerveja no Brasil 2018: Crescimento e Inovação. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, n. 72, p. 6, 2018. MEIER-DÖRNBERG, T.; HUTZLER, M.; MICHEL, M.; METHNER, F.-J.; JACOB, F. The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 41, 2017.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry in beer: Part II: flavor and flavor threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas**, v. 12, n. 3, p. 151–168, 1975.

MERICO, A.; SULO, P.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 976–989, 2007.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 129–144, abr. 2016a.

MICHEL, M.; MEIER-DÖRNBERG, T.; JACOB, F.; METHNER, F.-J.; WAGNER, R. S.; HUTZLER, M. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 569–587, out. 2016b.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 297–304, 2003.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Lafonte, 1^a ed, p. 357, 2009.

NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v. 20, n. 4, p. 331–341, 2003.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1569–1576, dez. 2005.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S. R.; NICKENS, D. M.; ROGERS, C. M.; SAUSEN, C.; CAPUTO, R.; MILLER, J.; LI, H.; TENNESSEN, J. M.; BOCHMAN, M. L. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76–84, 2018.

PADILLA, B.; GIL, J.; MANZANARES, P. Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 68, 2018.

PAN, W.; JUSSIER, D.; TERRADE, N.; YADA, R. Y.; MIRA DE ORDUÑA, R. Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 660–666, abr. 2011.

PARKER, W. .; RICHARDSON, P. The quantitative determination of glycerol in beer by gas-liquid chromatography. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 191–198, 1970.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. Ä.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3–13, jan. 2006.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 2014.

PRETORIUS, I. S.; LAMBRECHTS, M. G. Yeast and its importance to wine aroma: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 1, p. 97–129, 2000.

PUERTAS, B.; JIMÉNEZ, M. J.; CANTOS-VILLAR, E.; CANTORAL, J. M.; RODRÍGUEZ, M. E. Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 733–746, 2017.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V. S. R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133–1144, 22 set. 2011.

RAYNAL, C.; WARDROP, F.; PILLET, O.; LANGUET, P.; DUMONT, A.; ORTIZ-JULIEN, A. An innovative tool for winemakers: sequential inoculation with a non-*Saccharomyces* yeast and a *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Wine and Viticulture Journal**, v. 26, n. 1, p. 22–32, 2011.

REID, V. J.; THERON, L. W.; TOIT, M. Du; DIVOL, B. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 6838–6849, 2012.

RENAULT, P. E.; ALBERTIN, W.; BELY, M. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 4105–4119, 2013.

RONKSLEY, P. E.; BRIEN, S. E.; TURNER, B. J.; MUKAMAL, K. J.; GHALI, W. A. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 342, n. February, p. d671, 2011.

ROSCA, I.; PETROVICI, A. R.; BREBU, M.; STOICA, I.; MINEA, B.; MARANGOCI, N. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 949–954, 2016.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, 15 jan. 2008a.

SAERENS, S. M. G.; VERBELEN, P. J.; VANBENEDEN, N.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1039–1051, 27 out. 2008b.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; UYTENHOVE, B.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1206–1215, jun. 2009.

SATORA, P.; TARKO, T.; SROKA, P.; BLASZCZYK, U. The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 5, p. 729–740, 2014.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHOLTES, C.; NIZET, S.; COLLIN, S. Guaiacol and 4-methylphenol as specific markers of torrefied malts. Fate of volatile phenols in special beers through aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9522–9528, out. 2014.

SEBRAE. **Microcervejarias no brasil**. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2017.

SHEKHAWAT, K.; BAUER, F. F.; SETATI, M. E. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2479–2491, 2 mar. 2017.

SHEN, N.; WANG, J.; LIU, C.; LI, Y.; LI, Q. Domesticating brewing yeast for decreasing acetaldehyde production and improving beer flavor stability. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 3, p. 347–355, 2014.

SPITAELS, F.; WIEME, A. D.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.-M.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95384, 18 abr. 2014.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; NICOLINO, M. P.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 947–995, 2014.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 61–80, 8 set. 2014.

STEWART, G. *Saccharomyces* species in the production of beer. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 34, 2016.

STEWART, G. G. High-gravity brewing and distilling - Past experiences and future prospects. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 68, n. 1, p. 1–9, 2010.

SWANGKEAW, J.; VICHITPHAN, S.; BUTZKE, C. E.; VICHITPHAN, K. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 335–343, jun. 2009.

TATARIDIS, P.; KANELIS, A.; LOGOTETIS, S.; NERANCIS, E. Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, n. 124, p. 415–426, 2013.

TIMKE, M.; WANG-LIEU, N. Q.; ALTENDORF, K.; LIPSKI, A. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 93, n. 1–2, p. 151–161, 2008.

TOFALO, R.; CHAVES-LÓPEZ, C.; DI FABIO, F.; SCHIRONE, M.; FELIS, G. E.; TORRIANI, S.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 179–187, 2009.

TOH, D. W. K.; CHUA, J. Y.; LIU, S. Q. Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. May, p. 26–33, 2018.

VANBENEDEN, N.; VAN ROEY, T.; WILLEMS, F.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 83–91, nov. 2008.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 2–3, p. 140–150, 2003.

VARELA, C. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 9861–9874, 27 dez. 2016.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 1ª ed, v. 1, p.492, 2010.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G. U. Y.; DUFOUR, J.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R.; BOX, P. O.; OSMOND, G.; SA, A. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110–118, 2003.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 778–785, 2008.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25–34, 14 jan. 2011.

WALKER, G.; STEWART, G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 17 nov. 2016.

WANG, D.; SUN, J.; ZHANG, W.; JIA, F.; YANG, Y.; LIN, Z.; FENG, J.; PAVLOVIC, M. Disruption of brewer's yeast alcohol dehydrogenase ii gene and reduction of acetaldehyde content during brewery fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 64, n. 4, p. 195–201, 2006.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: The practical guide to beer fermentation**. Brewers Publications, p.304, 2010.

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

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

ANEXO 1 – Ficha de avaliação sensorial

Nome: _____ **Data:** ____/____/____.

Por favor, avalie a amostra quanto ao aroma e sabor. Para isto, atribua notas entre 1 a 10 para cada atributo descrito abaixo.

Observação: Nota = 1 significa ausência do atributo na amostra.

Nota = 10 significa presença forte do atributo na amostra.

Código da Amostra

Aroma

Atributo	Nota
Frutado/ésteres	_____
Álcool/solvente	_____
Cítrico	_____
Lúpulo	_____
DMS	_____
Cereais/grãos	_____
Maltado	_____
Caramelo	_____
Queimado/cozido	_____
Sulfúrico	_____
Oxidado/envelhecido	_____
Doce	_____

Sabor

Atributo	Nota
Frutado/ésteres	_____
Álcool/solvente	_____
Cítrico	_____
Lúpulo	_____
DMS	_____
Cereais/grãos	_____
Maltado	_____
Caramelo	_____
Queimado/cozido	_____
Sulfúrico	_____
Oxidado/envelhecido	_____
Doce	_____
Amargo	_____
Ácido	_____
Adstringente	_____
Corpo	_____

Comentários: _____

