**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização de leveduras não convencionais para
produção de cervejas**

Rafael Felipe Basso

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2019**

Rafael Felipe Basso
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização de leveduras não convencionais para produção de
cervejas**

Orientadora:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Basso, Rafael Felipe

Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas / Rafael Felipe Basso. - - Piracicaba, 2019.

112 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Torulaspora delbrueckii* 2. *Dekkera anomala* 3. *Brettanomyces anomalus* 4. Cerveja I. Título

**Dedico este trabalho aos meus
pais, minha irmã, meu cunhado e
meu sobrinho; pessoas essenciais
em minha vida, que me
incentivaram do início ao fim
dessa importante etapa.**

**E à minha namorada, pelo amor,
incentivo, apoio e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela integridade, capacidade e oportunidades que sempre me concede. Pela resiliência e fôlego para enfrentar os momentos de dúvida e dificuldades.

À minha família, a qual me sinto muito privilegiado em ter. Pessoas maravilhosas que sempre me apoiam. Também, à minha namorada pelo amor e suporte.

À professora Dra. Sandra Helena da Cruz, por acreditar no meu potencial e pela valiosa orientação e auxílio no meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Dr. Cauré B. Portugal pela camaradagem, orientação e suporte acadêmico desde o final da minha graduação.

À toda equipe da Fermentec, em especial ao Dr. Henrique V. de Amorim, Henrique Neto, Mário Lúcio e Silene, por abrirem as portas para que eu pudesse conduzir os experimentos na incrível estrutura que a empresa dispõe e pelo suporte científico.

À empresa White Labs por gentilmente fornecer as leveduras não convencionais avaliadas neste projeto.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, a Gloriosa, por existir e me dar tantas oportunidades.

À CAPES por conceder minha bolsa de estudos.

*"In the end, we are our choices.
Build yourself a great story."*
(Jeff Bezos)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Cerveja: definição e estilos	19
3.2 Principais etapas do processo produtivo	20
3.3 Compostos de aroma e sabor	22
3.3.1 Aldeídos	23
3.3.2 Álcoois superiores	23
3.3.3 Ácidos orgânicos	24
3.3.4 Ésteres	24
3.3.5 Dicetonas vicinais	25
3.3.6 Compostos sulfurosos	26
3.3.7 Compostos fenólicos	27
3.4 Leveduras convencionais	28
3.5 Leveduras não convencionais	30
3.5.1 <i>Brettanomyces</i>	30
3.5.2 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	34
3.5.3 Outras leveduras não convencionais	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Microrganismos	39
4.2 Manutenção das leveduras	39
4.3 Produção do mosto cervejeiro utilizado nas análises	40
4.4 Parâmetros analíticos e microbiológicos	40
4.4.1 Cariotipagem	41
4.4.2 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes meios de cultivo ...	41
4.4.3 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes fontes de carbono	43
4.4.4 Avaliação da tolerância ao etanol e compostos do lúpulo	44
4.4.5 Avaliação da formação de espuma durante a fermentação	45
4.4.6 Evolução da fermentação com base na perda de massa	45

4.4.7	Avaliação da capacidade de floculação	46
4.4.8	Teste qualitativo do potencial de produção de sulfeto de hidrogênio	47
4.4.9	Teste da capacidade de esporulação.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Cariotipagem	49
5.2	Crescimento em diferentes fontes de carbono	51
5.3	Crescimento populacional em diferentes meios de cultivo	54
5.4	Tolerância ao etanol e compostos do lúpulo	58
5.5	Avaliação da capacidade de formação de espuma	62
5.6	Evolução da fermentação com base na perda de massa.....	63
5.7	Capacidade de floculação	65
5.8	Teste qualitativo de produção de sulfeto de hidrogênio	67
5.9	Teste de esporulação	68
6.	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXOS	81

RESUMO

Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas

O crescimento do mercado de cervejas artesanais tem demandado inovações. Uma abordagem que se destaca neste contexto é o uso de leveduras não convencionais em processos controlados de fermentação. Para ter melhores resultados neste cenário é fundamental que o produtor conheça as capacidades e limitações das leveduras que serão utilizadas na produção de cervejas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar características fisiológicas, essenciais e complementares, de uma cepa de *Brettanomyces anomalus* e uma *Torulaspora delbrueckii* para a produção de cervejas, comparando-as com duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* já utilizadas na indústria cervejeira. Avaliou-se o perfil cromossômico das leveduras (cariotipagem), a capacidade de crescimento em diferentes substratos e fontes de carbono, bem como em diferentes concentrações de etanol e compostos de lúpulo, a capacidade de esporulação, floculação, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), formação de espuma e a evolução da fermentação em função do tempo. Foram observadas diferenças entre os padrões cromossômicos das quatro leveduras. A intensidade de produção de H₂S foi maior para a *B. anomalus* (WLP640) quando comparada com *T. delbrueckii* (WLP603), que foi classificada com a mesma intensidade de produção da S-33 (*S. cerevisiae*). As duas leveduras não convencionais atenderam às características fisiológicas essenciais para fermentação de cervejas. A *B. anomalus* foi capaz de metabolizar diversas fontes de carbono, como glicose, frutose, sacarose, maltose, matotriose e celobiose, ao passo que a *T. delbrueckii* cresceu apenas em glicose, frutose e sacarose, apontando sua potencial aplicação para produção de cervejas com teor alcoólico reduzido ou seu uso em inoculações sequenciais ou co-inoculações com outras leveduras. Ambas apresentaram crescimento em teores alcoólicos de 4% e 8%, ao passo que *T. delbrueckii* tolerou maior concentração de compostos do lúpulo em relação à *B. anomalus*, que não foi capaz de crescer em meio com as maiores concentrações combinadas de álcool (8% v/v) e α -ácidos (80 mg/L). Os resultados permitem concluir que as leveduras *B. anomalus* e *T. delbrueckii* possuem potencial para a produção de cervejas, desde que seja observada a compatibilidade de suas características fisiológicas com a expectativa acerca das características da cerveja.

Palavras-chave: *Torulaspora delbrueckii*; *Dekkera anomala*; *Brettanomyces*; Cerveja

ABSTRACT

Characterization of non-conventional yeasts for beer crafting

The booming in the craft beer market worldwide has demanded innovations to bring up distinctive products. An approach that stands out in this context is the use of non-conventional yeasts in controlled beer fermentation processes. To have better outcomes in this scenario, it is essential that the producer knows the capabilities and limitations of those yeasts. Thus, this study aimed to assess essential and complementary physiological traits of one strain of *Brettanomyces anomalus* and one of *Torulaspora delbrueckii* for beer brewing, comparing them with two *Saccharomyces cerevisiae* strains already used in commercial breweries. The characteristics assessed were chromosome profile (karyotyping technique), growth capacity in different substrates and carbon sources, as well as under different concentrations of ethanol and hop compounds, the capability of sporulation, flocculation, hydrogen sulfide (H₂S) production and foam formation and, finally, the fermentation evolution pattern. Differences in the chromosomal profile were observed among the four strains. The potential for H₂S production was higher for *B. anomalus* (WLP640) when compared to *T. delbrueckii* (WLP603), which had the same potential than S-33 (*S. cerevisiae*). Both non-conventional yeasts have met the essential physiological traits demanded to carry beer wort fermentation. *B. anomalus* was able to metabolize many of the assessed carbon sources, as glucose, fructose, sucrose, maltose, maltotriose and cellobiose, while the *T. delbrueckii* strain was able to grow only in glucose, fructose and sucrose, pointing its potential application for low alcohol beer production, as well as its use in sequential inoculations or co-inoculations with other yeasts. Both showed satisfying growth under alcohol contents of 4% and 8%. *T. delbrueckii* tolerated higher hop compounds concentration when compared to *B. anomalus*, that was unable to grow at the highest combined concentrations of ethanol (8% v/v) and α -acids (80 mg/L). The results lead to the conclusion that the yeasts *B. anomalus* and *T. delbrueckii* can be explored in beer brewing, provided that an alignment between their physiological traits and the expectations around the beer characteristics are observed.

Keywords: *Torulaspora delbrueckii*; *Dekkera anomala*; *Brettanomyces*; Beer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição simplificada do processo de produção de cerveja	21
Tabela 2 - Linhagens das leveduras avaliadas	39
Tabela 3 - Valor máximo de DO _{600nm} após 72 h de cultivo das leveduras em diferentes fontes de carbono	51
Tabela 4 – Valor máximo de DO _{600nm} obtido pelas leveduras após 72 h de cultivo em diferentes meios.....	57
Tabela 5 - Valor máximo de DO _{600nm} da levedura após 72 h de cultivo.....	60
Tabela 6 - Altura média atingida pela espuma durante a fermentação de mosto cervejeiro com SG = 1,048	62
Tabela 7 - Média da capacidade de floculação (%) com base na sedimentação celular após 30 minutos de repouso.....	65
Tabela 8 - Teste de esporulação, expressos em relação à capacidade de esporular (positivo e negativo) e o tempo para a observação de células esporuladas (ascos)	69
Tabela 9 - Crescimento celular de <i>Brettanomyces anomalus</i> WLP640 em meio YPD, YPM e mosto cervejeiro.....	81
Tabela 10 - Crescimento celular de <i>Torulaspora delbrueckii</i> WLP603 em YPD, YPM e mosto cervejeiro.....	83
Tabela 11 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S-33) em YPD, YPM e mosto cervejeiro.....	85
Tabela 12 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FT013C em YPD, YPM e mosto cervejeiro.....	87
Tabela 13 - Crescimento celular de <i>Brettanomyces anomalus</i> WLP640 em diferentes fontes de carbono.	89
Tabela 14 - Crescimento celular de <i>Torulaspora delbrueckii</i> WLP603 em diferentes fontes de carbono	92
Tabela 15 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S-33) em diferentes fontes de carbono	95
Tabela 16 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (FT013C) em diferentes fontes de carbono.....	98
Tabela 17 - Crescimento celular de <i>Brettanomyces anomalus</i> em meios contendo etanol e/ou lúpulo.....	101

Tabela 18 - Crescimento celular de <i>Torulaspora delbrueckii</i> em meios contendo etanol e/ou lúpulo	104
Tabela 20 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S-33) em meios contendo etanol e/ou lúpulo	107
Tabela 22 - Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (FT013C) em meios contendo etanol e/ou lúpulo	110

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos quatro anos, o número de cervejarias cresceu acima de 23% no Brasil e o número de registros de cervejas ultrapassou os 8.900 em 2017 (MAPA, 2018). Nos Estados Unidos, o faturamento do mercado de cervejas artesanais cresceu 8% em 2017, em relação à 2016, passando a representar mais de 23% do faturamento geral do mercado de cervejas, que corresponde ao montante de US\$ 26 bilhões (Brewers Association, 2018). Na Europa, o número de microcervejarias chegou a crescer acima dos 300%, em alguns países, entre 2010 e 2016, como é o caso da Espanha, Suécia e Noruega, com crescimento relativo de 1010%, 817% e 571%, respectivamente (The Brewers of Europe, 2017). Esse cenário indica a necessidade das cervejarias em inovar para conseguir destaque neste mercado que cresce e se especializa em ritmo acelerado.

As inovações podem ser conquistadas em diversas etapas do processo produtivo de cerveja, desde o uso de ingredientes inusitados até a aplicação de técnicas incomuns de produção. Nesse sentido, a fermentação é uma etapa determinante na qualidade da cerveja e representa um ponto chave na busca por inovação com baixo custo de implantação, pois além da bioconversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono, a levedura produz diversos subprodutos e intermediários metabólicos, como ésteres, álcoois superiores, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e sulfurosos que constituem a maior parte dos compostos ativos de sabor e aroma da cerveja (Pires *et al.*, 2014).

Antes do desenvolvimento da ciência e de aparatos tecnológicos que possibilitaram melhor entendimento e controle sobre as etapas produtivas, as cervejas apresentavam características diferentes das que conhecemos hoje e não havia reprodutibilidade entre as produções. As fermentações ocorriam espontaneamente, sem controle da microbiota que atuava no processo, dependendo dos microrganismos presentes no ambiente, na matéria-prima e nos utensílios usados na produção (Basso, Alcarde and Portugal, 2016). Mais tarde, percebeu-se que fermentações mais rápidas e com melhores resultados organolépticos eram alcançadas quando se juntava parte do mosto “modificado” ao mosto da produção seguinte, acelerando o início do processo fermentativo e trazendo melhores características à cerveja, consequência da introdução dos microrganismos presentes na fermentação anterior. Assim se iniciava o processo de seleção, ainda que inconsciente, das leveduras mais adaptadas

ao processo, principalmente espécies do gênero *Saccharomyces* (Steensels and Verstrepen, 2014).

Os avanços mais significativos para a obtenção do perfil sensorial da cerveja como conhecemos hoje, muito provavelmente, foram aqueles relacionados à ciência da fermentação. No século XVII, Antonie van Leeuwenhoek descreveu a levedura; no século XIX, Charles Cagniard de la Tour afirmou que leveduras eram responsáveis pela fermentação alcoólica e Emil Hansen estabeleceu técnicas de isolamento, que permitiram o uso de culturas puras; avanços que contribuíram para produções mais uniformes e controladas (Lodolo *et al.*, 2008). Se por este lado os avanços foram positivos, por outro, acabaram por restringir a diversidade microbiológica nos processos de fermentação de mosto cervejeiro e, conseqüentemente, limitar a grande variedade de compostos químicos e características organolépticas que poderiam ser alcançados pelo metabolismo de leveduras não-*Saccharomyces* (Steensels *et al.*, 2015; Steensels and Verstrepen, 2014).

Os cervejeiros podem aproveitar a diversidade dos padrões de assimilação de substratos observada entre as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* (Dijken, 2002) para imprimir um perfil sensorial inusitado em seus produtos. No caso de alguns estilos fermentados espontaneamente, por exemplo o tradicional estilo belga *Lambic*, uma complexa sucessão de microrganismos autóctones conduz a fermentação e obtém uma cerveja com características singulares de sabor e aroma (Spitaels *et al.*, 2014). Contudo, pode-se empregar leveduras não-convencionais em processos controlados de fermentação, inoculando culturas puras para conduzir uma parte ou todo o processo fermentativo com o objetivo de, por exemplo, enriquecer a cerveja com um composto de interesse, como é o caso do uso de *Torulaspora delbrueckii* para a produção de 4-vinyl guaiacol, que confere aroma de cravo à bebida (Holt *et al.*, 2018).

No entanto, para a aplicação comercial, é fundamental a avaliação de alguns aspectos fisiológicos básicos das leveduras, como a capacidade de consumir os açúcares do mosto e sua tolerância ao etanol e compostos do lúpulo, a fim de verificar a capacidade dos microrganismos em se desenvolver e conduzir a fermentação nas condições impostas na produção de cerveja. Ainda, é importante verificar algumas características tecnológicas de aplicação, como por exemplo a taxa de floculação e capacidade de formação de espuma durante a fermentação, que são complementares

e auxiliarão o cervejeiro nas tomadas de decisão acerca da aplicação dessas leveduras no processo.

2. OBJETIVO

Avaliar as características fisiológicas essenciais e complementares de duas leveduras não-*Saccharomyces*, *Brettanomyces anomalus* e *Torulaspora delbrueckii*, quanto à aptidão na condução de processos controlados de fermentação de cervejas, comparando-as com duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* já empregadas na indústria cervejeira.

As características essenciais avaliadas são: padrão de crescimento e capacidade de assimilação de açúcares relevantes para o processo e a tolerância ao etanol e compostos do lúpulo.

As características complementares são: avaliação do perfil cromossômico das leveduras, capacidade de formação de espuma durante a fermentação, evolução da fermentação com base no desprendimento de CO₂ e capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio, de floculação e de esporulação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cerveja: definição e estilos

A cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Segundo a legislação brasileira, a cerveja é a bebida resultante da fermentação, mediante levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou do extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo. Uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte pode ser substituída por adjuntos cervejeiros. A cerveja pode ser adicionada de corantes, saborizantes e aromatizantes. Ainda, a cerveja pode ser classificada quanto ao seu extrato primitivo, cor, teor alcoólico e proporção de malte de cevada contido na composição (BRASIL, 2009). Por outro lado, as cervejas podem ser classificadas segundo suas características, indicando diferentes estilos.

Existem diversas classificações de estilos de cerveja, sendo que o primeiro critério de classificação se baseia no tipo de fermentação, separando as famílias Ale e Lager. A primeira é fermentada com cepas de levedura *S. cerevisiae*, ou de alta fermentação, ao passo que os estilos da família Lager, são fermentados com cepas de *S. pastorianus*, de baixa fermentação. De maneira geral, a grande diferença entre as cervejas das duas famílias é que as Ales são fermentadas a temperaturas mais altas, de 18°C a 24°C, e apresentam maiores concentrações de compostos aromáticos oriundos da fermentação, como ésteres e álcoois superiores; enquanto as Lagers são fermentadas a temperaturas mais baixas, geralmente de 8°C a 14°C, e apresentam perfil relativamente neutro de aromas originados na fermentação (Lodolo *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2014; Ravasio *et al.*, 2018).

No entanto, existem estilos de cervejas fermentadas com um consórcio de microrganismos, em fermentações espontâneas ou controladas, ou até mesmo utilizando exclusivamente leveduras não convencionais (BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM – BJCP, 2015). As cervejas do estilo *Lambic*, por exemplo, resultam de processos espontâneos de fermentação, onde uma diversa e complexa sucessão de microrganismos conduzem o processo fermentativo; esses microrganismos estão presentes no ambiente da cervejaria e inoculam o mosto durante seu resfriamento, nos recipientes conhecidos como *coolship*, tanques amplos e rasos, e também nos barris de madeira para onde o mosto resfriado é transferido

para as etapas de fermentação e envelhecimento da cerveja (Spitaels *et al.*, 2014). Enquanto as *American Wild Ales*, por exemplo, são fermentadas usando inóculos puros de levedura, podendo utilizar apenas leveduras não-*Saccharomyces* para conduzir todo o processo fermentativo, bem como utilizá-las em co-inoculações ou inoculações sequenciais com *Saccharomyces* spp. e/ou bactérias (BJCP, 2015).

Apesar da existência de guias para referenciar cervejeiros quando desejam criar algum exemplar dentro dos estilos, o universo cervejeiro é muito amplo e livre, permitindo a criação de cervejas diferentes de qualquer uma já referenciada. Portanto, o uso de leveduras não convencionais não é restrito apenas aos estilos que aceitem ou demandem características impressas por essa classe de microrganismos, podendo servir como base para o desenvolvimento de novos produtos.

3.2 Principais etapas do processo produtivo

O processo produtivo de cerveja pode ser separado, de forma simplificada, em duas grandes partes, a obtenção do mosto e, em seguida, a produção da cerveja. A primeira parte envolve a moagem do malte, a infusão do malte moído em água (mostura), a filtração e clarificação, fervura e, finalmente, o resfriamento. A segunda, também conhecida como etapa fria, é composta pela fermentação, maturação e filtração (Kunze, 2010). O esquema simplificado das etapas de produção está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição simplificada do processo de produção de cerveja

Processo	Descrição	Objetivo
Moagem	Quebra dos grãos sem desintegrar a casca	Expor o endosperma e as enzimas ao meio e aumentar a superfície de contato
Mosturação	Adição de água quente	Extração e dissolução dos compostos e ativação enzimática
Filtração e clarificação	Filtrar o mosto usando a casca como elemento filtrante	Separar a fração sólida da líquida (mosto)
Fervura	Fervura do mosto e adição dos lúpulos	Estabilidade coloidal, sensorial e microbiológica, além da adição dos lúpulos para conferir amargor, sabor e aroma
<i>Whirlpool</i>	Centrifugação do mosto	Sedimentar as partículas sólidas insolúveis de forma rápida e, em seguida, resfriamento do mosto até temperatura compatível à inoculação da levedura
Resfriamento e fermentação	Abaixamento da temperatura do mosto e adição da levedura. Acompanhamento da evolução da fermentação e remoção da levedura	Resfriar o mosto até a temperatura de inoculação da levedura, que produzirá a cerveja a partir da fermentação do mosto, transformando as características do produto. Após a fermentação remove-se a levedura sedimentada no fundo do tanque
Maturação	Armazenamento em tanques, livre de oxigênio e a baixas temperaturas	Aperfeiçoamento das propriedades organolépticas da bebida e estabilidade físico-química
Filtração	Passagem da cerveja através de elemento filtrante	Remoção da levedura em suspensão e do <i>trub</i> frio
Carbonatação	Adição e/ou ajuste de CO ₂	Atingir o volume certo de CO ₂ para formação de espuma e sensação frisante adequada a cada estilo
Envase	Enchimento de garrafas, latas e/ou barris	Envase nos recipientes convenientes para distribuição ao mercado
Estabilização microbiológica	Pasteurização ou filtração	Inativação ou remoção de microrganismos

Adaptado de (Sinha, 2007)

A moagem dos cereais é feita de forma a triturar o endosperma e manter a casca a mais íntegra possível, pois servirá como elemento filtrante mais adiante no processo. No endosperma se encontram os carboidratos, principalmente amido, que serão hidrolisados durante a mosturação e terão papel fundamental na fermentação e em algumas características da cerveja. O próximo passo é a mosturação, infusão do malte moído em água potável, para a solubilização do amido e outros compostos do cereal; a proporção malte:água e o binômio tempo e temperatura são estabelecidos e

controlados pelo cervejeiro de acordo com o resultado pretendido no produto. Após a mosturação, a mistura líquida com as partes sólidas é transferida para a tina de filtração e clarificação, onde ocorre a separação das fases sólida, basicamente casca de malte e amido e proteínas insolúveis, e líquida, conhecida como mosto. O mosto segue para a fervura, por tempo determinado pelo cervejeiro.

Os principais objetivos da fervura são: extração e isomerização dos componentes do lúpulo, coagulação de proteínas, esterilização do mosto, inativação das enzimas, formação de compostos redutores, aromáticos e de cor, remoção de compostos voláteis indesejáveis, concentração do mosto. Em seguida, procede-se o *whirlpool*, processo de turbilhonamento tangencial do mosto para sedimentação das partículas sólidas e coloidais, como o resíduo do lúpulo e proteínas insolúveis. Então, o mosto é resfriado e transferido para os tanques, onde é adicionado o agente de fermentação, para a condução da fermentação e maturação da cerveja (Esslinger, 2009; Sinha, 2007). As últimas etapas do processo produtivo consistem da filtração (opcional), carbonatação, envase e pasteurização (opcional).

Embora descrito de forma resumida, o processo produtivo pode ser bastante complexo, por apresentar muitas variáveis. Além disso, com as modificações que o mercado cervejeiro têm passado, há uma busca constante por diferenciação de produto, de forma que os cervejeiros têm empregado técnicas incomuns de produção que não estão descritas anteriormente, como fermentações sequenciais e envelhecimento em barris de madeira, por exemplo (Basso, Alcarde and Portugal, 2016). Assim, em alguns casos, pode haver aumento no número de passos dentro das etapas com o objetivo de agregar características inusitadas à cerveja.

3.3 Compostos de aroma e sabor

As características organolépticas da cerveja resultam da combinação de centenas de compostos ativos com potencial de aroma e de sabor, sendo a grande parte deles originados durante a fermentação. O metabolismo das leveduras, principalmente de carboidratos e proteínas, produz subprodutos e intermediários metabólicos que, quando em concentrações adequadas, podem trazer características desejáveis à bebida (Pires *et al.*, 2014; Lodolo *et al.*, 2008). As leveduras produzem compostos com potencial de sabor em diferentes concentrações em função da composição do mosto, condições de fermentação e cepa de levedura usada (He *et al.*, 2014). As classes de compostos com maior influência no perfil de sabor e aroma

da cerveja podem ser listados como etanol, aldeídos, álcoois superiores, ésteres, dicetonas vicinais, ácidos orgânicos, compostos sulfurosos e fenólicos (Lodolo *et al.*, 2008; He *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2014).

Não existe legislação que estabeleça a concentração máxima dos compostos de aroma em cerveja (Hernandes, 2018). No entanto, centenas de compostos voláteis têm sido detectados em cervejas, incluindo compostos pertencentes a classes dos ésteres, álcoois, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos, compostos contendo furano, compostos aromáticos, heterocíclicos e compostos que contém enxofre (como revisado por Hernandez, 2018).

3.3.1 Aldeídos

Os aldeídos são produzidos, principalmente, durante a preparação do mosto, pela reação de Maillard e oxidação de lipídeos, e pelo metabolismo fermentativo e de aminoácidos, como intermediários metabólicos (Lodolo *et al.*, 2008).

O principal aldeído encontrado nas cervejas é o acetaldeído, um intermediário metabólico da produção do etanol e do ácido acético (Lodolo *et al.*, 2008). Na produção de etanol, o piruvato proveniente da glicólise é descarboxilado à acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, em seguida o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase ou oxidado a ácido acético. A enzima álcool desidrogenase tem o zinco como cofator (White and Zainasheff, 2010), portanto se houver falta desse mineral no mosto a levedura pode passar a acumular acetaldeído e excretá-lo para o meio.

O acetaldeído geralmente recebe o descritivo sensorial de “gramíneo” e “maçã verde”, sendo considerado um defeito em cervejas quando em concentrações acima do limiar de percepção, de 10 a 20 mg.L⁻¹ (Meilgaard, 1975b; Meilgaard, Dalgliesh and Clapperton, 1979).

3.3.2 Álcoois superiores

Os álcoois superiores compreendem os compostos organolépticos mais abundantes nas cervejas (Pires *et al.*, 2014) e manifestam grande expressão nas características de aroma e sabor, podendo contribuir também com sensação de aquecimento e percepção alcoólica (He *et al.*, 2014). Alguns dos principais álcoois são: *n*-Propanol (álcool, doce), isobutanol (solvente), álcool isoamílico (álcool, banana), álcool amílico (álcool, solvente), 2-Feniletanol (rosas) (Pires *et al.*, 2014).

Os álcoois superiores são subprodutos do metabolismo de aminoácidos, pelas rotas anabólica (Eden *et al.*, 2001) e catabólica (rota de Ehrlich) (Sentheshanmuganathan and Elsdén, 1958). Portanto, a composição de aminoácidos do mosto e a proporção entre eles influencia diretamente o perfil e a concentração de álcoois superiores produzidos. Como exemplo, pode-se citar a relação direta entre a concentração de valina, leucina e isoleucina e o aumento na produção de isobutanol, álcool isoamílico e álcool amílico, respectivamente (Procopio *et al.*, 2013).

3.3.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são importantes na redução do pH e na contribuição do gosto ácido da bebida, além de alguns contribuírem com aroma e sabor característicos. Muitos são os ácidos orgânicos presentes na cerveja decorrentes do metabolismo de leveduras. Esses compostos podem ser divididos em duas classes, a dos voláteis e dos não voláteis, sendo os principais ácidos voláteis que ocorrem nas cervejas o acético, láctico, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, capríco, caprílico, cáprico e láurico (Whiting, 1976; Michel *et al.*, 2016b).

Cepas de *Brettanomyces* (teleomorf. *Dekkera*), por exemplo, são conhecidas por produzirem altas concentrações de ácido acético em aerobiose, assim como podem produzir grandes quantidades de ácido isovalérico (ácido graxo volátil) durante a fermentação (Crauwels *et al.*, 2015a). Em paralelo, *T. delbrueckii* é capaz de sintetizar concentrações mais elevadas dos ácidos láctico e succínico, quando comparada com *S. cerevisiae* (Panagiotis *et al.*, 2013).

3.3.4 Ésteres

Os ésteres, junto com os álcoois superiores, representam um grupo muito relevante para as características de aroma e sabor da cerveja, conferindo aromas caracterizados como frutado e floral (He *et al.*, 2014). Os principais ésteres presentes nas cervejas são acetato de etilo (frutado, solvente), acetato de isoamilo (banana), caproato de etilo (frutado, maçã), caprilato de etilo (anis, maçã) e acetato de fenil-etil (floral, mel) (Verstrepen *et al.*, 2003b; Pires *et al.*, 2014). Apesar de geralmente estarem presentes em baixas concentrações, em alguns casos abaixo do limiar de percepção, os ésteres podem ter efeito sinérgico com outros compostos, participando do perfil organoléptico da bebida (Meilgaard, 1975a).

A levedura sintetiza esses compostos a partir da condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois (Nordström, 1963). As principais enzimas envolvidas nessas reações são as Álcool acetil transferases (AATases) e as Acyl-CoA:etanol O-acyltransferase (AEATases), essenciais na formação de ésteres de acetato e ésteres de etilo, respectivamente, sendo que as últimas apresentam atividade de síntese e hidrólise de ésteres (Yoshioka and Hashimoto, 1981; Saerens *et al.*, 2006). A síntese de ésteres durante a fermentação, assim como a de outros compostos produzidos pelas leveduras, depende de diversos fatores, como composição do mosto, condições de fermentação e cepa de levedura utilizada. A presença de oxigênio e ácidos graxos insaturados no meio de fermentação reduzem a atividade de enzimas relacionadas à formação de ésteres (Fujii *et al.*, 1997), assim como o uso de tanques de fermentação muito altos, também reduzem a produção desses compostos por exercerem pressão sobre as células (Meilgaard, 2001); ao contrário, mostos com elevada densidade original tendem a estimular a produção de ésteres, especialmente os de acetato (Meilgaard, 2001).

3.3.5 Dicetonas vicinais

Diacetil (2,3-Butanodiona) e 2,3-Pentanodiona são as principais dicetonas vicinais encontradas em cervejas. Para a maioria dos estilos a percepção sensorial desses compostos são indesejáveis, com a primeira conferindo notas aromáticas “amanteigadas” e a segunda de “mel” à bebida (Krogerus and Gibson, 2013; Bamforth and Kanauchi, 2004).

O limiar de percepção das dicetonas vicinais pode variar em função da sensibilidade do consumidor e das características da cerveja, sendo mais facilmente detectáveis quanto mais sutis forem suas características organolépticas. O limiar atribuído ao diacetil varia de 0,1 a 0,2 ppm para as cervejas lagers, embora já tenha sido relatado valor de 17 ppb (Saison *et al.*, 2009), e 0,1 a 0,4 ppm para as ales, enquanto o limiar da 2,3-Pentanodiona é maior, variando de 0,9 a 1,0 ppm (Wainwright, 1973).

Esses compostos podem indicar contaminação do processo, uma vez que são formados por bactérias, especialmente do gênero *Pediococcus* (Bamforth and Kanauchi, 2004). Contudo, também são produzidos por *Saccharomyces* spp. durante a fermentação, pela síntese dos aminoácidos valina e isoleucina, que produz os intermediários metabólicos α -acetolactato e α -acetohidroxibutirato, respectivamente.

Ao serem excretados para o meio, esses precursores podem ser oxidados espontaneamente a diacetil e 2,3-pentanodiona (Krogerus and Gibson, 2013). Entretanto, as dicetonas vicinais podem ser reduzidas a acetoina e 2,3-butanodiol, no caso do diacetil, e a 2,3-pentanodiol, no caso da 2,3-pentanodiona, pelo metabolismo das próprias leveduras, através da ação de enzimas, como a álcool desidrogenase e outras enzimas específicas (Bamforth and Kanauchi, 2004).

A produção de diacetil por *T. delbrueckii* em fermentações cervejeiras pode ser considerável, ficando acima do limiar de percepção (Michel *et al.*, 2016a). Ao passo que *Brettanomyces* tendem a produzir baixas concentrações de 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona (Michel *et al.*, 2016b).

3.3.6 Compostos sulfurosos

Os compostos sulfurosos voláteis compreendem uma classe que, acima de determinados limites, são indesejáveis ao perfil organoléptico da cerveja, uma vez que podem conferir características descritas como “ovo podre”, “fósforo queimado”, “repolho cozido”, “cebola” etc (Landaud, Helinck and Bonnarme, 2008). Esses compostos podem derivar diretamente dos maltes e dos lúpulos utilizados na elaboração das cervejas, ou a partir de precursores que são transformados química ou enzimaticamente durante o processo de produção (Landaud, Helinck and Bonnarme, 2008).

Diversos são os compostos de enxofre com atividade aromática que podem ser formados durante a fermentação, como por exemplo o dimetilsulfureto (DMS) a partir da redução do precursor dimetilsulfóxido (DMSO) (Bokulich and Bamforth, 2013). Contudo, os principais compostos sulfurosos produzidos pela levedura são o dióxido de enxofre (SO₂) e o sulfeto de hidrogênio (H₂S), que apresentam baixo limiar de percepção, de 25 ppm e 5-10 ppb, respectivamente (Lodolo *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2003; Landaud, Helinck and Bonnarme, 2008). Embora o cervejeiro deva favorecer condições para minimizar a produção desses compostos pela levedura, a fim de manter a qualidade organoléptica da cerveja, a presença de alguns compostos sulfurosos voláteis em concentrações muito baixas, podem contribuir com o caráter típico de alguns estilos de cerveja e podem auxiliar na estabilidade sensorial da bebida (Landaud, Helinck and Bonnarme, 2008).

A produção desses compostos está relacionada, principalmente, ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos, como a metionina e a cisteína. Para a

síntese desses aminoácidos a levedura necessita de enxofre e nitrogênio. O enxofre é obtido de fontes inorgânicas, como o sulfato e sulfito, tendo o íon HS^- como intermediário. Em condições limitadas de nitrogênio no meio, há falta dos precursores da síntese de cisteína e metionina, que sequestrariam o íon HS^- para a formação desses aminoácidos. Consequentemente, pode ocorrer acúmulo de H_2S dentro da célula com posterior excreção para o meio. A redução do sulfato também pode levar à formação de SO_2 (Swiegers and Pretorius, 2007).

Acredita-se que a redução na concentração de H_2S na cerveja recém fermentada é realizada com o dióxido de carbono eliminado do fermentador. Contudo, foram levantadas evidências de que essa redução ocorre, principalmente, pelo metabolismo (reabsorção) das leveduras, quando os açúcares fermentescíveis são esgotados (Oka *et al.*, 2008).

Portanto, o cervejeiro deve se manter atento ao perfil e concentração dos compostos nitrogenados e de enxofre do mosto, bem como à atividade da levedura nos estágios finais da fermentação, a fim de manejar a produção de compostos sulfurosos.

3.3.7 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos voláteis são indesejáveis para muitos estilos de cerveja. Contudo, são fundamentais e/ou complementares para alguns, como é o caso dos estilos de cerveja de trigo alemãs, cervejas defumadas e aquelas que se favorecem do metabolismo de espécies de leveduras não convencionais.

Esses compostos são produzidos durante a fermentação, por leveduras capazes de metabolizar os ácidos hidroxicinâmicos presentes no mosto. Esses ácidos estão presentes no malte, são adicionados ao meio durante a etapa de mosturação e carregados no mosto até a fermentação, onde podem ser reduzidos a compostos fenólicos voláteis (Steensels *et al.*, 2015; Vanbeneden *et al.*, 2008).

Os principais compostos fenólicos são o 4-etilguaicol, 4-etilfenol e 4-etilcatecol e seus precursores, 4-vinilguaicol, 4-vinilfenol e 4-vinilcatecol (Steensels *et al.*, 2015). Compreendem características sensoriais descritas como cravo, medicinal e noz moscada, por exemplo.

3.4 Leveduras convencionais

As leveduras cervejeiras denominadas convencionais são aquelas comumente empregadas na produção de cervejas. De toda cerveja produzida e comercializada no mundo dominam as fermentadas com cepas puras de duas espécies de leveduras *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*.

A levedura *S. cerevisiae*, utilizada na produção de cervejas ale, apresenta maior diversidade genética, ao passo que *S. pastorianus*, empregada na fermentação de cervejas lager, são geneticamente mais conservadas (Lodolo *et al.*, 2008). Consequentemente, os cervejeiros dispõem de mais opções de cepas para produção de cervejas da família ale, resultado da pluralidade genética e metabólica apresentada pelas diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Acredita-se ainda que a maioria das cepas dessa espécie são híbridos, com relato de que diversas delas, especialmente aquelas usadas para a produção de cervejas de estilo belga, são originadas da hibridação entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (Capece *et al.*, 2018; González, Barrio and Querol, 2008)

A espécie *S. pastorianus* surgiu da hibridação entre espécies ocorrida dentro do ambiente das cervejarias, tendo uma parte do genoma oriundo de *S. cerevisiae* e a outra de *S. eubayanus* (Libkind *et al.*, 2011). Essa espécie pode ser classificada em dois diferentes grupos, que apresentam também características fenotípicas diferentes: o tipo *Frohberg*, tetraploide ($2n$ herdados de *S. cerevisiae* e $2n$ de *S. eubayanus*) cujo surgimento é associado às cervejarias alemãs; e o tipo *Saaz*, triploide ($1n$ herdado de *S. cerevisiae* e $2n$ de *S. eubayanus*), associado às cervejarias da Dinamarca (Budroni *et al.*, 2017).

As razões mais prováveis para explicar a hegemonia das leveduras *Saccharomyces* em processos controlados de fermentação são sua abundância e domínio em ambientes fermentativos (Budroni *et al.*, 2017); consequência de alguns fatores como preferência pelo metabolismo fermentativo sobre o respiratório, por apresentarem o efeito *Crabtree* (repressão da respiração pela glicose) e de tolerarem altos teores de etanol e outros estresses impostos pelo ambiente durante a fermentação (Steensels and Verstrepen, 2014). Ademais, apresentam alta eficiência na produção de etanol e podem contribuir com características sensoriais positivas à cerveja (Pires *et al.*, 2014).

Leveduras *Saccharomyces* spp. são capazes de consumir uma variedade de fontes de carbono, a depender da espécie e da cepa em questão. Podem consumir

carboidratos como glicose, frutose, sacarose, maltose, maltotriose, galactose e rafinose, por exemplo. Cepas de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* são capazes de hidrolisar até mesmo amido e dextrinas (Ogata, Iwashita and Kawada, 2017). Um importante parâmetro de diferenciação entre *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* é a habilidade da levedura lager em metabolizar melibiose (Lodolo *et al.*, 2008).

A tolerância ao etanol e aos compostos do lúpulo são características relevantes, pois a partir delas o cervejeiro tem embasamento para escolher a cepa adequada ou ajustar sua receita à uma determinada linhagem. De modo geral, leveduras do gênero *Saccharomyces* são capazes de tolerar teores alcoólicos relativamente altos em relação aos teores alcançados no universo das cervejas populares. Em um estudo com cepas de *S. cerevisiae* oriundas da produção de vinho, houve boa tolerância a teores alcoólicos de 5% e 8%, ao passo que muitas cepas sucumbiram em teores entre 13% e 18% (García *et al.*, 2016). Cepas dessa mesma espécie, isoladas de cerveja, apresentaram tolerância ao etanol em concentração de até 15% e cepas de *S. pastorianus* toleraram concentração de até 10% (Sanchez, Solodovnikova and Wendland, 2012).

Em relação aos compostos do lúpulo, as *Saccharomyces* spp. são tolerantes aos iso- α -ácidos, responsáveis por conferir amargor à cerveja e que podem apresentar efeito inibitório contra microrganismos, especialmente bactérias gram-positivas. Leveduras do gênero *Saccharomyces* dispõem de alguns mecanismos de defesa, como o sequestro e acúmulo de iso- α -ácidos nos vacúolos, alteração na estrutura da parede celular de forma a reduzir a passagem desses ácidos para dentro da célula e o sistema de exportação dessas substâncias para fora do citosol. Assim, são capazes de fermentar mostos com altas concentrações de iso- α -ácidos (Hazelwood *et al.*, 2010).

Outro parâmetro importante para a fabricação de cervejas é a capacidade da levedura em produzir espuma durante o processo fermentativo. A produção excessiva de espuma durante a fermentação é indesejável, principalmente, por reduzir o volume útil do fermentador e carregar compostos do lúpulo, reduzindo o amargor. A formação de espuma durante essa etapa depende de diversos fatores, incluindo a cepa de levedura utilizada (Kordialik-Bogacka and Ambroziak, 2004). Portanto, cepas que produzam menos espuma durante o processo fermentativo são desejáveis.

A habilidade e adaptação de inúmeras cepas de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* para a produção de cervejas é incontestável. Contudo, um potencial de exploração

desses microrganismos, relativamente pouco empregado no universo cervejeiro, é sua aplicação em sinergia com leveduras não convencionais, em co-inoculação ou inoculação sequencial, a fim de alcançar produtos com qualidades singulares.

3.5 Leveduras não convencionais

O crescimento do movimento de retomada das cervejas artesanais tem atraído cada vez mais interesse por leveduras não convencionais, uma vez que representam um potencial na busca por inovação de produto. Contudo, leveduras não-*Saccharomyces* contemplam microrganismos que não passaram pelo processo de domesticação, ao contrário das tradicionais *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, de forma que suas características na produção de cervejas podem variar muito. Portanto, a investigação e conhecimento do metabolismo e fisiologia inerentes de cada microrganismo, com objetivo de saber suas capacidades e limitações, é fundamental. Como comentado anteriormente, para serem aplicadas com sucesso na produção de cervejas, as leveduras devem apresentar características metabólicas adequadas a tal processo, como a capacidade de se desenvolver e fermentar o mosto cervejeiro, bem como conferir características desejáveis ao produto.

Os tópicos seguintes trazem algumas informações relevantes acerca das leveduras estudadas neste trabalho, bem como de algumas outras leveduras não convencionais com potencial de aplicação em fermentações cervejeiras.

3.5.1 *Brettanomyces*

Os primeiros isolamentos de leveduras do gênero *Brettanomyces* tiveram como fonte a cerveja. A primeira documentação ocorreu em 1904, por Niels Hjelte Claussen, quem atribuiu à *Brettanomyces* o desenvolvimento das características organolépticas peculiares das melhores cervejas inglesas. Mais tarde, em 1921, Kufferath e Van Laer isolaram duas cepas de cerveja belga, com as mesmas características descritas por Claussen. Em 1940, Custers fez o primeiro estudo sistêmico de leveduras *Brettanomyces*, usando isolados de cervejas belgas e inglesas (Steensels *et al.*, 2015; Barnett, 2004). Contudo, leveduras do gênero *Brettanomyces* são isoladas de diversas outras fontes, como casca de frutas, *kefir*, chá, sidra, refrigerante, vinho e barris de madeira (Basso, Alcarde and Portugal, 2016; Smith and Divol, 2016). Desde sua primeira descrição, a taxonomia desse gênero já passou por diversas mudanças, contudo o que se adota atualmente é a denominação oficial *Dekkera*, para a forma

sexuada (ou teleomórfica), e *Brettanomyces* para a forma assexuada (ou anamórfica) (Steensels *et al.*, 2015).

As espécies mais estudadas dentro desse gênero são *B. bruxellensis* e *B. anomalus* (Steensels *et al.*, 2015), provavelmente por serem isoladas com mais frequência em ambientes de cervejaria, especialmente, em fermentações espontâneas. Embora ainda sejam temidas como contaminantes na produção de diversas bebidas, inclusive da cerveja (Bokulich and Bamforth, 2013), leveduras do gênero *Brettanomyces* são essenciais para o desenvolvimento das características de alguns estilos, como das belgas *lambic*, das americanas *coolship ales* e outros estilos de cervejas ácidas (Spitaels *et al.*, 2014; Michel *et al.*, 2016b; Bokulich, Bamforth and Mills, 2012).

Como as *Saccharomyces* spp., as leveduras do gênero *Brettanomyces* geralmente dispõem do efeito Crabtree, que favorece o metabolismo fermentativo sobre o respiratório em meios com determinada concentração de açúcares, mesmo com disponibilidade de oxigênio. Contudo, uma característica metabólica que as diferencia das leveduras convencionais é o efeito Custer (Barnett and Entian, 2005). Nesse caso, esses microrganismos conduzem a fermentação mais rápido em presença de oxigênio, interrompendo a fermentação ou aumentando a fase *lag* quando em anaerobiose. Isso ocorre na maioria das cepas de *Brettanomyces* devido a um desbalanço *redox* na célula, causado pela supressão de NAD⁺ (aceptor de hidrogênio) em função da produção de compostos oxidados, como o ácido acético, e à incapacidade de reestabelecer esse balanço através da produção de metabólitos reduzidos além do etanol, como o glicerol (Uscanga, Délia and Strehaiano, 2003). Logo, o aporte de pequenas quantidades de oxigênio pode ser vantajoso para reduzir a duração de fermentações conduzidas com *Brettanomyces*. Contudo, deve-se levar em conta a tendência de menor produção de etanol e maior produção de ácido acético e biomassa nessas condições (Uscanga, Délia and Strehaiano, 2003).

Essas leveduras têm chamado a atenção de pesquisadores e cervejeiros para aplicações em ambientes controlados de fermentação, por sua capacidade de imprimir características peculiares ao perfil sensorial da bebida. Diversas características metabólicas são responsáveis pela singularidade de *Brettanomyces*, como o padrão de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, a produção de compostos fenólicos e de alguns ácidos orgânicos (Basso, Alcarde and Portugal, 2016).

Brettanomyces são capazes de consumir ampla gama de fontes de carbono relevantes para a produção de cervejas, incluindo mono, di e trissacarídeos, além de açúcares mais complexos (Colomer, Funch and Forster, 2019). Algumas cepas têm capacidade de consumir carboidratos incomuns, como a celobiose. Esse é o dissacarídeo constituinte da celulose, encontrado na parede celular de vegetais, presente, por exemplo, em barris de madeira usados para a fermentação e/ou maturação de algumas cervejas (Smith and Divol, 2016). A habilidade de utilização desse substrato varia de acordo com espécie e cepa, havendo indícios de que, em isolados de cerveja, mais cepas de *B. anomalus* são capazes de consumir celobiose em relação a *D. bruxellensis* (Daenen *et al.*, 2008a; Crauwels *et al.*, 2015b). Essa habilidade é baseada na produção e atividade da enzima β -glicosidase (Daenen *et al.*, 2008a). Tal enzima é responsável, também, pela quebra de glicosídeos, compostos constituídos por uma molécula aromática ligada a uma ou mais unidades de β -D-glicose, que precisam ser hidrolisadas para contribuir com o aroma da cerveja. Os glicosídeos são encontrados em vegetais, sendo adicionados à cerveja, principalmente, por meio da adição do lúpulo, mas também pela adição de frutas, folhas e sementes (Colomer, Funch and Forster, 2019). Logo, o cervejeiro pode se valer da utilização de cepas que produzem a enzima β -glicosidase para buscar novos perfis aromáticos, por meio da alteração na composição dos compostos de aroma. Ainda, *Brettanomyces* são capazes de utilizar dextrinas, carboidratos com maior grau de polimerização, que geralmente estão presentes na cerveja finalizada, resultando em bebidas “superatenuadas” e com menor sensação de corpo. Tal característica é desejável na produção de alguns estilos de cerveja e representa uma fonte de diferenciação de produto, além de possibilitar a produção de cervejas com menor concentração de carboidratos (Basso, Alcarde and Portugal, 2016).

A capacidade de *Brettanomyces* crescer em diversos substratos e em meios pobres em nutrientes se deve, pelo menos em parte, às suas características genômicas (Woolfit *et al.*, 2007). Além de poder apresentar maiores doses de genes em relação à *Saccharomyces*, existem variações na ploidia ($2n$ ou $3n$), aneuploidias, inserções e deleções de genes e perda de heterozigose (Crauwels *et al.*, 2015b), criando divergências entre cepas no que diz respeito às capacidades metabólicas.

Existem evidências de que o genoma de *Brettanomyces* é enriquecido em genes relacionados ao transporte e metabolismo de nitrogênio e lipídios. Os subprodutos desses metabolismos, junto com os do metabolismo de carboidratos, são

bastante importantes na influência das características de aroma e sabor da bebida. Até o momento, o conhecimento acerca do consumo do nitrogênio é limitado (Smith and Divol, 2016). Contudo, sabe-se que *B. bruxellensis* são capazes de consumir diversas fontes de nitrogênio, com algumas cepas crescendo em fontes como nitrato, nitrito e amônio (Smith and Divol, 2016; Crauwels *et al.*, 2015b).

Entre os diversos aspectos que tornam essas leveduras interessantes para a produção de cerveja, estão a tolerância a baixos valores de pH, eficiência metabólica na utilização de nutrientes, tolerância ao stress osmótico e ao etanol, em concentrações de 12,0% a 15,0% (v/v) (Lentz *et al.*, 2014; Barata *et al.*, 2008; Steensels *et al.*, 2015). Além disso podem produzir compostos de aroma e sabor interessantes, que trazem complexidade sensorial à bebida, como no caso das *Lambics* belgas, em que *Brettanomyces* desempenham papel essencial para o perfil organoléptico.

Essas leveduras podem contribuir com características organolépticas cujas descrições variam desde frutado, até acético, suor, celeiro e medicinal, dependendo das condições de fermentação adotadas (Steensels *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos 4-vinilguaicol, 4-etilguaicol, 4-vinilfenol e 4-etilfenol, talvez sejam os mais característicos de *Brettanomyces*, com os descritores sensoriais peculiares de celeiro, cravo, selvagem, couro, medicinal e condimentado (Crauwels *et al.*, 2015a). Além dessas notas características, essas leveduras tendem a produzir altas concentrações de ésteres de etila em relação a ésteres de acetato, devido a atividade hidrolítica de esterases com afinidade pelos últimos. Por isso, cervejas fermentadas com culturas de *Brettanomyces* frequentemente apresentam concentrações elevadas dos ésteres acetato de etila (frutado, solvente), caproato de etila (maçã, floral), caprilato de etila (abacaxi, floral) e caprato de etila (doce, frutas secas), imprimindo caráter frutado e floral às cervejas (Budić-Leto *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2016b). Os principais ácidos orgânicos produzidos são o isovalérico, geralmente encontrado em *lambics* jovens, e o acético, ácido característico do vinagre (Crauwels *et al.*, 2015a). Enfim, *Brettanomyces* não contribuem com concentrações significativas de diacetil, usualmente mantendo esse composto abaixo do limiar de percepção (Yakobson, 2010).

Dados os atributos fisiológicos singulares de *Brettanomyces*, pertinentes à produção de cerveja, leveduras desse gênero representam uma possibilidade de abordagem de baixo custo para a produção de cervejas com características

diferenciadas, sem a necessidade de investimentos em equipamentos ou mudanças na estrutura produtiva da cervejaria.

3.5.2 *Torulaspora delbrueckii*

Embora haja relatos do seu uso na fermentação de cervejas de trigo produzidas na região da Baviera, *Torulaspora delbrueckii* (anamorf. *Candida colliculosa*) é uma espécie de levedura pouco explorada para a produção de cervejas (Michel *et al.*, 2016a; Panagiotis *et al.*, 2013). Quando o assunto é produção de vinho, essa espécie é mais conhecida e aplicada (Albertin *et al.*, 2014). Acredita-se que o uso de *T. delbrueckii* pelo homem remonta a 4.000 anos, participando da história da humanidade em diversos bioprocessos (Albertin *et al.*, 2014). Essa espécie pode ser isolada de diversos ambientes naturais e, também, daqueles ambientes relacionados a atividades humanas, fato que evidencia sua capacidade de adaptação metabólica. Cepas dessa espécie estão associadas a variados processos de fermentação de alimentos como pão (Pacheco *et al.*, 2012), cacau (Papalexandratou *et al.*, 2011), azeitona (Kotzekidou, 1997) e pepino (Etchells, Costilow and Bell, 1952) e de bebidas como tequila (Lachance, 1995), mescal (Valdez *et al.*, 2011) e kefir (Loretan, Mostert and Viljoen, 2003).

T. delbrueckii são capazes de consumir diversas fontes de carbono, desde açúcares comuns ao mosto cervejeiro, como glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, bem como outros açúcares: galactose, lactose, rafinose, trealose, manitol, sorbitol, glicerol, melezitose e sorbose (Michel *et al.*, 2016a). Contudo, a capacidade de consumo dos açúcares é dependente da cepa, com algumas incapazes de consumir até mesmo a maltose, açúcar mais abundante no mosto cervejeiro. Nesses casos, a concentração de etanol ao final da fermentação é baixo, apontando seu potencial para a produção de cervejas com teor alcoólico reduzido (Michel *et al.*, 2016b; Canonico *et al.*, 2016).

Existem evidências de que há uma ordem no consumo dos diferentes açúcares quando presentes concomitantemente no meio de fermentação, com repressão catabólica da maltose pela glicose e pela sacarose, de forma que a glicose e sacarose são consumidas preferencialmente à maltose (Alves-Araújo *et al.*, 2007). Outra característica interessante é que, apesar de não apresentarem o efeito *Custer* (como *Brettanomyces*), *T. delbrueckii* tendem a aumentar a taxa de fermentação em presença de oxigênio (Hanl, Sommer and Arneborg, 2005). Ao final da fermentação,

pode ou não haver floculação das células, a depender da cepa em questão. Contudo, leveduras dessa espécie tendem a produzir cervejas límpidas (Michel *et al.*, 2016a).

Um aspecto relevante, inerente às cepas dessa espécie, é a tolerância aos estresses, como alta pressão osmótica (osmotolerante) (Alves-Araújo *et al.*, 2007) e baixas temperaturas (criotolerante) (Salvadó *et al.*, 2011). Estas características são interessantes para aplicações na produção de cervejas a partir de mostos com alta concentração inicial de açúcares (e.g. cervejas com alta densidade) e fermentações a baixas temperaturas (e.g. fermentações *lager*), respectivamente. Ademais, *T. delbrueckii* foi capaz de tolerar concentrações de álcool de 14% (v/v) em produção de vinho (Bely *et al.*, 2008), embora em ensaios conduzidos com mosto cervejeiro, foram capazes de tolerar concentração de 5% de etanol, mas não de 10%. Apresentam, também, tolerância aos iso- α -ácidos, de forma que são capazes de crescer em concentrações tão elevadas quanto 90 ppm, que corresponde a cervejas bastante lupuladas, como as do estilo IPA. Ainda, foram capazes de crescer em meio combinado com 50 ppm de iso- α -ácidos e 5% (v/v) de etanol (Michel *et al.*, 2016a).

Talvez, a característica mais atraente de *T. delbrueckii* para a fermentação de cervejas seja o perfil de produção de compostos de aroma e sabor, como ésteres e álcoois superiores (Basso, Alcarde and Portugal, 2016). Cervejas produzidas com essa espécie são, geralmente, descritas com perfil organoléptico frutado e floral. Essas características podem ser intensificadas em fermentações mistas de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, uma vez que essa prática tende a aumentar a concentração de ésteres como o acetato de etila, acetato de isoamila e butanoato de etila e álcoois superiores como os álcoois amílico e isoamílico, n-propanol e isobutanol (Canonico, Comitini and Ciani, 2017). Outra aptidão interessante é a habilidade de *T. delbrueckii* em alterar a composição de álcoois monoterpênicos, compostos aromáticos oriundos do lúpulo, modificando, assim, o perfil da bebida. Uma cepa isolada de produção de vinho foi capaz de transformar o monoterpênóide geraniol (floral, rosa, citrus) em linalol (floral, coentro) e α -terpineol (floral, lilás), sendo esse último formado também a partir do linalol. Do mesmo modo, geraniol, linalol e α -terpineol foram convertidos a partir de nerol (floral, “verde”) (King and Richard Dickinson, 2000).

Contudo, um atributo de *T. delbrueckii* referente às propriedades organolépticas que merece atenção, é o fato de leveduras dessa espécie contribuírem com concentrações altas de diacetil, podendo impactar negativamente as

características de aroma da bebida (Michel *et al.*, 2016a). Apesar de ser um atributo dependente da cepa, existem estratégias relativamente simples que podem contornar esse traço das cepas produtoras desse composto, como o uso da enzima acetolactato descarboxilase, por exemplo, que transforma o acetolactato (precursor do diacetil) direto em acetoína (Bokulich and Bamforth, 2013). Embora existam poucos estudos abordando a contribuição de leveduras não-*Saccharomyces* em relação à produção de compostos sulfurosos, há evidência de que *T. delbrueckii* produz baixos níveis do composto sulfeto de hidrogênio (H₂S), indesejável à cerveja (Renault *et al.*, 2009).

T. delbrueckii, portanto, é capaz de tolerar o ambiente hostil de fermentação, consumir os açúcares do mosto (pelo menos parcialmente) e pode contribuir positivamente com o perfil organoléptico da cerveja, despontando como uma levedura interessante para a produção de novas cervejas.

3.5.3 Outras leveduras não convencionais

O universo das leveduras não convencionais com propriedades notáveis para a produção de cervejas distintivas é bastante amplo e contempla diversos gêneros e espécies, como por exemplo: *Lachancea thermotolerans*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia kluyveri* (Basso, Alcarde and Portugal, 2016; Michel *et al.*, 2016b; Domizio *et al.*, 2016). Cada espécie apresenta particularidades que podem enriquecer o perfil sensorial da bebida ou, até mesmo, contribuir para a produção de cervejas com outros apelos, como aquelas reduzidas em calorias, com teor alcoólico reduzido ou cervejas funcionais (Basso, Alcarde and Portugal, 2016).

A levedura *Lachancea thermotolerans* desponta com potencial para a produção de cervejas ácidas, em substituição ao uso de bactérias lácticas, dada a capacidade de algumas cepas produzirem concentrações relativamente altas de ácido láctico (0,24 g.L⁻¹). Contribuem ainda com boas características organolépticas, com produção do éster lactato de etila (frutado), altas concentrações de glicerol e baixas concentrações de dicetonas vicinais. Podem consumir maltose, mas aparentemente não consomem maltotriose. Se apresentam tolerantes ao etanol, uma vez que podem produzir concentrações satisfatórias desse composto em fermentação de mosto de malte, mantendo a viabilidade celular alta após a fermentação (> 89%), além de tolerarem concentrações consideráveis de iso- α -ácidos (Domizio *et al.*, 2016).

Devido às boas contribuições para as características de aroma, baixa produção de compostos indesejáveis, resistência a ambientes estressantes (como no caso de fermentação de cervejas) e por serem isoladas com frequência na indústria de alimentos (comida e bebida), *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) também é cotada para a produção de cervejas distintivas (Capece *et al.*, 2018). Toleram meios com alta osmolaridade e alta concentração de etanol (Lee *et al.*, 2011), são capazes ainda de crescer em ausência de oxigênio, em temperaturas que variam de 3°C a 37°C, e valores de pH de 2,0 a 12,4 (Fredlund, 2004). Contribuem com produção de compostos aromáticos como propanoato de etila, feniletanol, acetato de 2-feniletila e acetato de etila, o qual é importante pela característica sensorial (frutado ou solvente, dependendo da concentração) e por apresentar propriedade antifúngica (Passoth *et al.*, 2006; Fredlund *et al.*, 2004). Apesar de ser uma característica dependente de cepa, são capazes de metabolizar a maltose, principal açúcar do mosto cervejeiro (Lee *et al.*, 2011).

Em inoculações sequenciais com *S. cerevisiae*, *Pichia kluyveri* se apresenta promissora na produção de cervejas com elevada concentração de ésteres e álcoois superiores, a partir de mostos com diferentes variedades de lúpulo. Adicionalmente, são cotadas como boa opção para produção de cervejas sem álcool ou com teor alcoólico reduzido, por serem capazes de consumir apenas a glicose como fonte de carbono do mosto cervejeiro. Nesse sentido, *Candida tropicalis* também produz fermentados com baixo teor alcoólico, como no caso de fermentações de mosto de sorgo (N'Guessan *et al.*, 2010) e de extrato de malte (Alloue-Boraud *et al.*, 2015); embora o uso de *C. tropicalis* para produção de bebidas deva ser observado com cuidado, uma vez que são considerados microrganismos patogênicos para pessoas imunocomprometidas (Wingard, Merz and Saral, 1979).

Portanto, a exploração do universo das leveduras não-convencionais se apresenta bastante promissora como uma ferramenta na busca por cervejas com características únicas e inovadoras. Contudo, deve-se atentar para as características de cada microrganismo, a fim de antecipar os prováveis resultados sobre as características organolépticas da cerveja, mas, acima de tudo, certificar a biossegurança do microrganismo a ser utilizado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

As leveduras utilizadas foram *Torulaspora delbrueckii* (WLP603) e *Brettanomyces anomalus* (WLP640) gentilmente cedidas pela White Labs (San Diego, EUA); *Saccharomyces cerevisiae* (Ale; S-33; LESAFFRE, Marcq-en-Baroeul, França), adquirida no comércio local, na forma seca; e, *S. cerevisiae* (Ale; FT013C), proveniente do banco de microrganismos da empresa Fermentec (Piracicaba, Brasil).

A Tabela 2 sumariza as linhagens utilizadas.

Tabela 2 - Linhagens das leveduras avaliadas

CÓDIGO	ESPÉCIE	FONTE
FT013C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentec
S-33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentis/Lessaffre
WLP603	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	White Labs
WLP640	<i>Brettanomyces anomalus</i>	White Labs

4.2 Manutenção das leveduras

O procedimento para a obtenção das culturas a serem conservadas para utilização durante a condução do trabalho foi o mesmo para as quatro cepas. A biomassa foi obtida por cultivo das leveduras em placas contendo o meio YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose e 15 g/L ágar [BD DIFCO™, Sparks, EUA]) e incubação em incubadora para B.O.D. (MARCONI, MA415) a 27°C durante 72 horas, exceto para *B. anomalus* cujo tempo de incubação foi de 96 horas devido ao crescimento mais lento. Parte dessa biomassa foi diluída em série em água peptonada (1 g/L peptona [BD BACTO™, Sparks, EUA]), novamente plaqueada em YPDA e incubada nas mesmas condições anteriores, para a obtenção de colônias isoladas que seguiram para a avaliação do perfil cromossômico pelo método de cariotipagem.

Após a confirmação da pureza do material, as culturas foram transferidas para criotubos contendo solução de glicerol (10 g/L [SYNTH, Diadema, Brasil]) para a conservação das mesmas em freezer ultrafrio (INDREL, IULT335D) a -80°C.

4.3 Produção do mosto cervejeiro utilizado nas análises

O mosto foi produzido com malte base, tipo Pilsen (AGRÁRIA, Guarapuava, Brasil), água mineral (UBÁ, Itirapina, Brasil) e lúpulos em *pellets* Hallertauer Magnum (12,3% α -ácidos) e Hallertauer Tradition (5,4% α -ácidos) (BARTH-HAAS, Nuremberg, Alemanha).

O malte foi moído em moinho de dois rolos, de forma a expor seu conteúdo amiláceo e manter a casca a mais íntegra possível. A etapa de mosturação foi realizada pelo método de infusão simples a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com relação água:malte de 3:1, durante uma hora. O final da conversão do amido (objetivo da mosturação) foi confirmado com o teste de tintura de iodo 2%, que após reação com o mosto manteve cor clara amarelada, indicando o final da conversão. Posteriormente, foi conduzida a inativação enzimática, mantendo o mosto à temperatura de 78°C durante 5 minutos. A mistura, solução e parte sólida, foi então filtrada para separar a parte líquida (mosto) da parte sólida e a casca acumulada foi lavada com água (relação água:malte inicial de 3,8:1) para extrair os açúcares retidos. Após a filtração, o mosto seguiu para a fervura, etapa em que se adicionou os lúpulos ao iniciar a ebulição na proporção de 1 grama de lúpulo para cada 0,95 litros de mosto, com duração de 60 minutos.

Em seguida, o mosto foi filtrado em funis de vidro com algodão, coletado em Erlenmeyers e autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

O material foi armazenado a 4°C até a utilização nas seguintes análises: avaliação da capacidade e padrão de crescimento em diferentes substratos; avaliação da formação de espuma durante a fermentação; evolução da fermentação com base na perda de massa; teste da capacidade de esporulação.

4.4 Parâmetros analíticos e microbiológicos

As características essenciais das leveduras avaliadas neste trabalho foram a capacidade de assimilação e o padrão de crescimento em açúcares relevantes para o processo e a tolerância ao etanol e compostos do lúpulo.

As características secundárias foram a avaliação do perfil cromossômico das leveduras, capacidade de formação de espuma durante a fermentação, evolução da fermentação com base no desprendimento de CO_2 e capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio, de floculação e de esporulação.

4.4.1 Cariotipagem

A avaliação do perfil cromossômico das leveduras foi realizada pela Fermentec utilizando a técnica de cariotipagem para separação de cromossomos intactos (Basso *et al.*, 1993).

As leveduras foram plaqueadas em meio YPDA e as placas incubadas a 28°C por 72 - 96 horas para o crescimento das colônias. O DNA cromossômico intacto foi obtido mediante extração com células imobilizadas em “plugs” de agarose. As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose e submetidas a um campo elétrico pulsado no sistema TAFE (Transversing Alternating Field Electrophoresis). Ao final da eletroforese os cromossomos foram corados, visualizados com luz ultravioleta e fotografados.

4.4.2 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes meios de cultivo

As leveduras foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento populacional em diferentes meios de cultivo a 27°C. Os meios de cultivo avaliados foram: YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L dextrose [BD DIFCO™, Sparks, EUA]), YPM (10 g/L extrato de levedura [BD DIFCO™, Sparks, EUA], 20 g/L peptona [BD BACTO™, Sparks, EUA], 20 g/L maltose [SIGMA, St. Louis, EUA]) e mosto cervejeiro diluído a Gravidade Específica (SG) de 1,017, correspondente a aproximadamente 30 g/L de açúcares.

As leveduras foram reativadas em meio YPD (5 mL), submetidas a diluição seriada e cultivadas em meio YPDágar para obtenção de colônias isoladas. Após o crescimento, a solução de células foi obtida, transferindo uma colônia, com auxílio de uma alça de inoculação, para 2 mL de solução salina (9 g.L⁻¹ NaCl [SYNTH]); após separação das células por centrifugação (9980 g, 15 min a 5°C; BECKMAN, AVANTI J-E), o *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de solução salina cujo ajuste da DO_{600nm} foi realizado. Uma alíquota de 50 µL desta solução de células foi coletada, diluída 40x em água destilada (50 µL em 1950 µL) e teve a absorbância a 600 nm aferida (MERCK, SPECTROQUANT® PROVE 300) para o cálculo de ajuste da densidade óptica (DO) da suspensão de células. A DO_{600nm} foi ajustada para 0,4, de forma que, após a diluição com o meio de cultivo, a DO_{600nm} final fosse 0,2.

O teste foi conduzido em microplaca com 96 poços de fundo cônico. Cada poço foi preenchido com 200 µL, sendo composto por 100 µL do meio de cultivo,

esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão, e 100 µL da suspensão de células, ambos concentrados duas vezes. Para o branco dos meios, utilizou-se 100 µL do meio e 100 µL de solução salina; para o branco das leveduras, utilizou-se 100 µL da suspensão de células e 100 µL de solução salina. A placa foi selada com filme adesivo transparente (SUPRIMAIS).

O crescimento celular foi medido em leitor multifuncional de microplacas (TECAN, INFINITE M200 PRO), com temperatura controlada, configurado para fazer leituras automáticas de absorbância a 600nm em nove pontos do poço a cada uma hora, durante 72 horas, precedidas de agitação por 10 segundos.

Os resultados foram avaliados em função da somatória dos valores obtidos em cada um dos nove pontos de leitura (Σ DO 600nm), de forma a minimizar o efeito dos diferentes padrões de sedimentação das células de cada linhagem nos poços. Os nove pontos de leitura foram distribuídos no poço de acordo com o arranjo apresentado na Figura 1. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial.

Figura 1 – Arranjo dos nove pontos de leitura realizados por poço em cada intervalo de tempo

4.4.3 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes fontes de carbono

A capacidade e o padrão de crescimento das linhagens de leveduras foram avaliados em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) [BD DIFCO™, Sparks, EUA] contendo como fonte de carbono um dos oito açúcares: glicose, frutose, sacarose, maltose, maltotriose, melibiose, celobiose e xilose. A análise foi realizada em microplacas com 96 poços de fundo cônico.

As soluções estoque de YNB e das fontes de carbono foram preparadas e, então, esterilizadas por filtração (0,22 μm). As células foram reativadas em tubos contendo 5 mL de YPD a 27°C, por 96h e, então, inoculadas em 10 mL do mesmo meio por períodos de tempo diferentes, de forma a iniciar o teste quando todas as quatro cepas estivessem na fase de maior atividade metabólica (μ máximo), determinada a partir dos resultados obtidos na análise descrita no item 4.4.2.

A biomassa foi recuperada por centrifugação (9980 x g, 15 min a 5°C – BECKMAN, AVANTI J-E) e lavada duas vezes com solução salina (9 g/L NaCl). Posteriormente, ajustou-se a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ da suspensão de trabalho (item 4.4.2). Os poços foram preenchidos com volume de 200 μL , composto por 20 μL da solução estoque (10x) de YNB, 40 μL da solução estoque da fonte de carbono (100 g/L), 40 μL de água deionizada estéril e 100 μL da suspensão de células com $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$. Dessa forma, as concentrações finais foram: YNB 0,0067 g/L, fonte de carbono 20 g/L e suspensão de células com $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$.

A placa foi selada com filme adesivo transparente (SUPRIMAIS). O crescimento celular foi medido em leitor multifuncional de microplacas (TECAN, INFINITE M200 PRO), configurado para 27°C, com leituras automáticas de absorbância a 600 nm em nove pontos do poço a cada uma hora, durante 72 horas, precedidas de agitação por 10 segundos.

Os resultados foram avaliados em função da somatória dos valores obtidos em cada um dos nove pontos de leitura ($\Sigma \text{DO } 600\text{nm}$), de forma a minimizar o efeito dos diferentes padrões de sedimentação das células de cada linhagem nos poços. Os nove pontos de leitura foram distribuídos no poço de acordo com o arranjo apresentado na Figura 1. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além

disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial.

4.4.4 Avaliação da tolerância ao etanol e compostos do lúpulo

Os ensaios de tolerância ao etanol e compostos do lúpulo foram conduzidos em microplacas de 96 poços de fundo cônico, selada com filme adesivo transparente (SUPRIMAIS) e incubada em leitor multifuncional de microplacas (TECAN, INFINITE M200 PRO), configurado para 27°C, com leituras automáticas de absorbância a 600nm em nove pontos do poço a cada uma hora, durante 72 horas, precedidas de agitação por 10 segundos. Os resultados foram avaliados em função da somatória dos valores obtidos em cada um dos nove pontos de leitura (Σ DO 600nm), de forma a minimizar o efeito dos diferentes padrões de sedimentação das células de cada linhagem nos poços. Os nove pontos de leitura foram distribuídos no poço de acordo com o arranjo apresentado na Figura 1. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial.

A capacidade de crescimento das leveduras foi avaliada em meio contendo etanol (4% ou 8%, v/v) ou α -ácido (40 mg/L ou 80 mg/L), bem como meio combinado contendo etanol e α -ácido, nas concentrações, respectivamente: 4% e 40 mg/L; 4% e 80 mg/L; 8% e 40 mg/L e, finalmente, 8% e 80 mg/L.

As leveduras reativadas em meio YPD (5 mL), após diluição em série, foram cultivadas em meio YPD ágar para obtenção de colônias isoladas. O ajuste da DO_{600nm} da suspensão de células para 0,4 foi feito seguindo os mesmos passos descritos no item 4.4.2. O volume de 100 μ L da suspensão foi usado para todos os tratamentos.

O meio de cultivo usado foi o YPM, concentrado 4x, para que o volume usado em todos os tratamentos fosse de 50 μ L.

As soluções estoque de etanol e lúpulo foram preparadas em diferentes concentrações para que sempre fossem mantidas as proporções de meio, células e

solução, em todos os tratamentos, para preencher os poços das microplacas com 200 μL de volume final.

As soluções estoque de etanol foram produzidas diluindo álcool etílico absoluto [SYNTH] em água destilada. Foi usado volume de 50 μL dessas soluções com concentração de 16% (v/v) e 32% (v/v) para atingir as concentrações finais de 4% (v/v) e 8% (v/v), respectivamente.

As soluções estoque de lúpulo foram preparadas diluindo extrato de lúpulo (54,7% α -ácido [HOPSTEINER®, Nova Iorque, EUA]) em álcool 70% [SAFRA, Rio Claro, Brasil]. A concentração adotada foi de 40x, buscando minimizar ao máximo qualquer efeito do etanol usado para dissolver o extrato. Dessa forma, as soluções preparadas tinham 1600 mg/L e 3200 mg/L de α -ácido para atingir as concentrações finais de 40 mg/L e 80 mg/L, respectivamente, ao usar 5 μL das mesmas.

Para o teste da resistência cruzada, mantiveram-se as proporções e concentrações usadas para a suspensão de células, meio de cultivo e solução estoque de extrato de lúpulo. A alteração foi na solução estoque de etanol, uma vez que o volume usado no poço diminuiu de 50 μL para 45 μL . Assim, foi preparada uma solução com 17,8% (v/v) e 35,6% (v/v) de etanol para atingir a concentração final de 4% (v/v) e 8% (v/v) de etanol, respectivamente.

4.4.5 Avaliação da formação de espuma durante a fermentação

A avaliação de produção de espuma foi conduzida com base no trabalho de (Regodón *et al.*, 1997), diferindo apenas quanto ao meio usado e à temperatura adotada. Após a contagem das células em hemocitômetro e ajuste da população, as cepas foram inoculadas na razão de $1,2 \times 10^7$ células/mL em tubos de ensaio (16mm x 150mm) contendo 10 mL de mosto cervejeiro com SG = 1,048. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 27°C e a altura máxima atingida pela espuma foi aferida durante a fermentação.

4.4.6 Evolução da fermentação com base na perda de massa

As células do ultra freezer foram reativadas em 5 mL de YPD, a 27°C, por 72 horas. Para a multiplicação celular, uma alíquota dessa suspensão foi inoculada em 10 mL de mosto cervejeiro com SG = 1,048 e incubada a 27°C e agitação de 140 rpm em incubadora (MARCONI, M830) por 72 horas.

A avaliação da evolução da fermentação foi realizada da seguinte maneira: a biomassa foi centrifugada e, após contagem das células em hemocítmetro, a população foi ajustada com solução salina (9 g/L NaCl) para 3×10^8 células/mL. Em seguida, inoculou-se 1 mL da suspensão em tubos tipo Falcon de 50 mL com fundo cônico, estéreis, contendo 24 mL de mosto (SG = 1,048), esterilizado a 121°C e 1 atm de pressão. As amostras foram incubadas a 27°C, sem agitação constante. Foram realizadas pesagens dos tubos em balança de precisão com duas casas decimais (GEHAKA, BK3000), precedidas de agitação manual, a cada uma hora até que a massa do sistema se repetisse por três vezes seguidas. O experimento foi conduzido em triplicata.

A evolução da fermentação pode ser estimada através da perda de massa do sistema, ocasionada pelo desprendimento de CO₂ (Sanchez, Solodovnikova and Wendland, 2012; García *et al.*, 2016).

4.4.7 Avaliação da capacidade de floculação

A capacidade de floculação das leveduras foi avaliada tendo como base o método de Helm (ANALYTICA, MICROBIOLOGY, 3.5.3.3, EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2011), contando com adaptações, como descrito por (Powell, Quain and Smart, 2003). Outra adaptação adotada foi quanto ao tempo de repouso das amostras antes da retirada da alíquota usada para leitura da DO_{600nm}.

As leveduras foram cultivadas em meio YPD (10 mL em Erlenmeyer de 250 mL), incubados a 27°C e agitação de 150 rpm (MARCONI, M830), durante 48 horas.

As células foram lavadas uma vez com água Milli-Q, a população viável foi aferida em hemocítmetro com uso do corante eritrosina para identificar as células não viáveis e, então, ressuspensas com volume de água necessário para ajustar a população à concentração de 1×10^8 células/mL. Após o ajuste, uma alíquota de 1 mL de cada uma das cepas foi transferida, em triplicata, para tubos tipo Eppendorf e seguiram para lavagens precedidas da recuperação da biomassa por centrifugação (17970 x g, 15 minutos, SIGMA 1-15K). No tratamento controle, após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de EDTA dissódico (0,5M, pH 7 [FLUKA, Seelze, Alemanha]). O tratamento experimental foi lavado uma vez com solução de CaSO₄ (0,51g/L [SYNTH]) e, então, ressuspensado em solução de suspensão (0,51 g/L CaSO₄, 6,82 g/L acetato de sódio [J.T. BAKER, Xalostoc, México], 4% álcool etílico [SYNTH], 0,45% ácido acético glacial [J.T.BAKER]).

As amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex, invertidas (de cabeça para baixo) cinco vezes e, posteriormente, mantidas em repouso a 20°C. Uma alíquota de 100 µL foi coletada logo abaixo do menisco, após 30 minutos de repouso, e diluídas 10 vezes em água deionizada. A absorbância das amostras foi mensurada a 600 nm em espectrofotômetro (HACH, DR/4000V) e determinou-se o percentual de floculação segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Floculação (\%)} = \left(\frac{DO \text{ controle} - DO \text{ experimental}}{DO \text{ controle}} \right) \times 100$$

4.4.8 Teste qualitativo do potencial de produção de sulfeto de hidrogênio

O potencial de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi testado inoculando as leveduras em placas de Petri contendo meio BiGGY ágar (BD BBL™, Sparks, EUA) (Linderholm *et al.*, 2008).

As células foram obtidas conforme descrito no item 4.4.2. O inóculo foi compreendido de 10 µL da suspensão de células de cada uma das leveduras de interesse, WLP640 (*B. anomalus*), WLP603 (*T. delbrueckii*), S-33 e FT013C, além de um controle positivo, FT1136L (*Candida tropicalis*), e um negativo, FT134L (*S. cerevisiae*).

As placas, após inoculadas, foram incubadas a 27°C por 72 horas, conforme indicação do fabricante. Posteriormente, o resultado foi avaliado visualmente, fotografado e ranqueado. O potencial de produção de H₂S é considerado maior quanto mais intensa a coloração marrom produzida pelas colônias.

4.4.9 Teste da capacidade de esporulação

O teste de esporulação foi conduzido com base no teste realizado por Gerke *et al.* (2010), com algumas adaptações quanto aos meios de crescimento das células, diluição da cultura e tempo de incubação.

As células foram reativadas em tubos contendo 5 mL de meio YPD e multiplicadas em 100 mL de YPD e 100 mL de mosto cervejeiro (SG = 1,017), incubadas a 27°C e 125 rpm (MARCONI, M830) durante 72 horas.

A esporulação foi induzida transferindo 2 mL da suspensão de células para Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL de solução de acetato de potássio (10 g.L⁻¹;

SYNTH). Os frascos foram mantidos em mesa agitadora, à temperatura ambiente ($26,6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e agitação de 180 rpm durante 72 horas.

As células foram rastreadas para a formação de ascos a cada 24 horas, através de microscopia por contraste de fase. A expressão dos resultados é qualitativa, de forma a revelar a capacidade, ou não, daquele microrganismo em esporular nas condições adotadas.

4.5 Análises estatísticas

Os resultados das seguintes análises foram submetidos à análise estatística: avaliação da capacidade e padrão de crescimento em diferentes substratos, avaliação da capacidade e padrão de crescimento em diferentes fontes de carbono, avaliação da tolerância ao etanol e compostos do lúpulo, avaliação da formação de espuma durante a fermentação, avaliação da capacidade de floculação.

Os resultados de cada experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando apontada diferenças estatisticamente significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o *software* SAS (versão 9.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o potencial de leveduras não convencionais para a produção de cervejas, este trabalho possibilitou a avaliação das capacidades e limitações fisiológicas, importantes à aplicação em ambientes controlados de fermentação, de leveduras não-*Saccharomyces*, usando uma cepa de *B. anomalus* e uma de *T. delbrueckii* como modelo.

Para confirmar a possibilidade de aplicação de cepas dessas espécies, foram avaliadas a capacidade e padrão de crescimento em meio rico adicionados de glicose ou de maltose, em mosto cervejeiro, em meios definidos com adição de diferentes fontes de carbono, tolerância ao etanol e ao lúpulo e potencial de produção de sulfeto de hidrogênio. Bem como características tecnológicas interessantes a aplicação prática em cervejarias, como potencial de formação de espuma durante a fermentação, capacidade de floculação e de esporulação.

5.1 Cariotipagem

Inicialmente, as leveduras foram analisadas quanto ao perfil cromossômico pelo método de cariotipagem eletroforética. Os resultados obtidos mostraram que as leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Torulaspora* apresentaram cariótipos distintos em relação às leveduras do gênero *Saccharomyces* quanto ao número de cromossomos, como apresentado na Figura 2. As análises do cariótipo eletroforético revelaram que as leveduras estavam livres de outras espécies contaminantes, sendo que cada uma apresentou uniformidade no seu perfil cromossômico, os quais foram característicos dos respectivos gêneros e espécie (Pacheco *et al.*, 2012; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Mitrakul, Henick-Kling and Egli, 1999).

A cariotipagem é uma técnica eficiente, utilizada para diferenciar e caracterizar microrganismos a partir da análise do perfil das bandas dos cromossomos. Esse método de caracterização de microrganismos a partir do padrão cromossômico é difundido para a diferenciação de cepas de leveduras *Saccharomyces* spp., porém se apresenta eficiente, também, para a distinção de leveduras não-convencionais (Pacheco *et al.*, 2012).

Figura 2 - Perfil cromossômico das leveduras: (A) *B. anomalus* WLP640, (B) *T. delbrueckii* WLP603, (C) *S. cerevisiae* FT013C e (D) *S. cerevisiae* S-33

A técnica utilizada neste estudo foi a de eletroforese em campo pulsado, que separa os cromossomos das leveduras, na sua forma intacta, por eletroforese. O padrão da disposição dos cromossomos no gel funciona como uma impressão digital do microrganismo, permitindo identificá-lo, além de possibilitar verificar se a cultura que está sendo usada está pura (livre de contaminantes).

5.2 Crescimento em diferentes fontes de carbono

Para a apresentação e discussão dos resultados desta análise, foi realizada uma correlação entre o crescimento populacional das leveduras nas diferentes fontes de carbono e a capacidade de assimilação e metabolização desses carboidratos. Portanto, considerou-se que o aumento da turbidez do meio devido ao crescimento populacional ao longo do tempo depende da capacidade da levedura em assimilar e metabolizar determinada fonte de carbono.

Todas as leveduras estudadas foram capazes de crescer em glicose, frutose e sacarose, apesar de apresentarem perfil diferente de crescimento. A metabolização de sacarose indica que todas produzem a enzima invertase, responsável por hidrolisar esse dissacarídeo em glicose e frutose (Alves-Araújo *et al.*, 2007). Nenhuma levedura apresentou crescimento expressivo em xilose e melibiose, sendo a metabolização de reservas das próprias células e de aminoácidos que compõem o meio utilizado a provável causa do pequeno crescimento observado. O valor máximo de ΣDO observado para cada levedura nas diferentes fontes de carbono está apresentado na Tabela 3. Para as oito fontes de carbono avaliadas, o crescimento populacional foi bastante variado o que demonstra as diferenças na capacidade de assimilação e metabolização de açúcares entre as quatro cepas de leveduras utilizadas neste experimento (Figura 3).

Tabela 3 - Valor máximo de ΣDO_{600nm} após 72 h de cultivo das leveduras em diferentes fontes de carbono

	GLI*	FRU	SAC	MAL	MALTO	MEL	CEL	XIL
<i>B. anomalus</i> WLP640	7,68 a	7,50 a	6,23 b	4,06 c	4,25 c	1,17 d	4,16 c	0,72 d
<i>T. delbrueckii</i> WLP603	5,56 a, b	5,94 a	5,40 b	0,71 d	1,06 c, d	0,73 d	1,02 c, d	1,43 c
<i>S. cerevisiae</i> S-33	6,26 a	6,21 a	6,27 a	5,24 b	1,52 c	0,75 d	0,99 d	0,78 d
<i>S. cerevisiae</i> FT013C	4,20 b	4,57 a, b	5,01 a	3,43 c	2,55 d	1,12 e	1,27 e	1,11 e

* GLI – glicose; FRU – frutose; SAC – sacarose; MAL – maltose; XIL – xilose; MALTO – maltotriose; mel – melibiose; CEL – celobiose;

Letras iguais na linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa para o cultivo da levedura nos diferentes açúcares, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 3 - Crescimento das leveduras: (A) WLP640 – *B. anomalus*; (B) WLP603 – *T. delbrueckii*; (C) S-33 – *S. cerevisiae*; (D) FT013C – *S. cerevisiae* em meio YNB e como fonte de carbono: (—) Glicose; (—) Frutose; (—) Sacarose; (—) Maltose; (—) Maltotriose; (—) Melibiose; (—) Celobiose; (—) Xilose, a 27°C. $\Sigma DO 600nm$ = soma de nove leituras de absorbância (600nm) por poço em cada intervalo de tempo. As curvas representam a média de quatro repetições.

B. anomalus apresentou maior desempenho com os monossacarídeos, glicose e frutose, seguido por sacarose. Essa levedura também foi capaz de assimilar celobiose, maltose e maltotriose, ainda que com menor eficiência. A semelhança nas curvas de crescimento em maltose e maltotriose aponta a possibilidade dessa cepa apresentar transportadores e enzimas α -glicosidase com afinidades semelhantes a ambos carboidratos. A assimilação de celobiose indica a capacidade dessa cepa produzir a enzima β -glicosidase, fato já observado e relatado na literatura para exemplares dessa espécie (Daenen *et al.*, 2008b; Daenen, 2008; Vervoort *et al.*, 2016). A produção da β -glicosidase enaltece a aplicação dessa cepa para a produção de cervejas em que se busca diferencial de aroma, uma vez que essa enzima realiza a hidrólise de β -glicosídeos, moléculas não voláteis, compostas por um açúcar e um composto aromático, liberado quando o glicosídeo é hidrolisado (Daenen *et al.*, 2008a).

A cepa de *T. delbrueckii* avaliada foi capaz de consumir apenas glicose, frutose e sacarose, dentre os açúcares avaliados neste trabalho. As curvas de crescimento para essas três fontes de carbono foram similares durante a fase exponencial de crescimento, até 13 horas após o início das leituras. A incapacidade dessa cepa em consumir maltose, o açúcar mais abundante no mosto cervejeiro, está, provavelmente, ligada à falta da enzima maltase. Essa informação é de grande valia para a aplicação prática dessa levedura, uma vez que permite que o cervejeiro adote alguma estratégia para o consumo desse açúcar, como co-inoculação ou inoculação sequencial com uma levedura capaz de consumi-lo. Essa característica pode ser interessante, também, para a produção de cervejas com reduzido teor alcoólico (Canonico *et al.*, 2016).

Ambas as linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de crescer em maltose. Ao passo que apresentaram curvas de crescimento semelhantes para glicose, frutose e sacarose, tiveram menor eficiência de multiplicação celular em maltose. A linhagem S-33 não apresentou crescimento expressivo em maltotriose, ao contrário da FT013C, que atingiu a leitura máxima de DO_{600nm} igual a 2,55 para esse tratamento (Tabela 3). O crescimento menor em maltose e maltotriose pode estar relacionado ao menor saldo energético gerado no consumo dessas fontes de carbono em relação aos monossacarídeos, devido ao transporte ativo desses açúcares, e a um possível desbalanço do potencial redox. A disparidade de crescimento observada entre a maltose e maltotriose, provavelmente está ligada a diferenças de afinidade dos

transportadores aos carboidratos e diferença da taxa de atividade da α -glicosidase (hidrólise) pelas leveduras (Zastrow *et al.*, 2000; Zastrow *et al.*, 2001; Rautio and Londesborough, 2003).

Os resultados indicam que a capacidade e eficiência de crescimento, das *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* dependem do açúcar que está sendo utilizado. Vale a pena lembrar que esse experimento foi conduzido com os diferentes açúcares isoladamente, sendo que a combinação entre eles pode alterar os padrões de metabolização de cada um (por exemplo, repressão do metabolismo da maltose pela glicose) (Rautio and Londesborough, 2003; Lodolo *et al.*, 2008). Essas observações da variação nos padrões de crescimento das cepas nos diferentes carboidratos, bem como entre as diferentes cepas para o mesmo carboidrato, apontam para possíveis diferenças nas taxas de assimilação e metabolização dessas fontes de carbono, assim como no balanço energético e redox das células gerados pelo consumo dos diversos carboidratos.

Os resultados obtidos para o crescimento de cada levedura no meio contendo os diferentes açúcares estão apresentados nos Anexos A, B, C e D.

5.3 Crescimento populacional em diferentes meios de cultivo

As leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento em meio YPD, YPM e mosto cervejeiro. Para as quatro cepas avaliadas, o crescimento em YPD foi maior que em YPM (Figura 4), o que é explicado pelo menor saldo energético gerado no consumo da maltose, uma vez que sua assimilação depende de transporte ativo simporte, com gasto de ATP para a manutenção do equilíbrio iônico das células (Zastrow *et al.*, 2000). É possível observar, também, um perfil distinto de crescimento populacional entre as quatro leveduras em mosto cervejeiro (Figura 5), no qual as *Saccharomyces* foram capazes de crescer mais que as não-*Saccharomyces*.

Figura 4 – Crescimento das leveduras: (A) *B. anomalus* WLP640, (B) *T. delbrueckii* WLP603, (C) *S. cerevisiae* S-33 e (D) FT013C nos meios (—) YPD ou (—) YPM a 27°C. Σ DO 600nm = soma de nove leituras de absorvância (600nm) por poço em cada intervalo de tempo. As curvas representam a média de quatro repetições.

Figura 5 - Crescimento das leveduras (—) *B. anomalus* WLP640, (—) *T. delbrueckii* WLP 603, (—) *S. cerevisiae* S-33 e (—) *S. cerevisiae* FT013C em mosto cervejeiro (Gravidade específica: 1,017) a 27°C. Σ DO 600nm = soma de nove leituras de absorbância (600nm) por poço em cada intervalo de tempo. As curvas representam a média de quatro repetições.

A levedura *B. anomalus* apresentou crescimento aproximadamente três vezes maior em YPD quando comparado ao YPM e quatro vezes maior em relação ao mosto (Figura 5). As 72 horas de leitura foram insuficientes para detectar o fim do crescimento dessa cepa em YPM. Em mosto cervejeiro, a leitura máxima foi de 1,87, a menor dentre os três meios avaliados (Tabela 4). Considerando que o mosto cervejeiro, além de ser um meio mais complexo em relação à composição nutricional, dispõe de certa concentração de componentes do lúpulo, que podem impactar o desenvolvimento da levedura, a limitação de crescimento observada no mosto pode ser decorrente da inibição por esses compostos, por algum inibidor produzido pelo metabolismo da própria levedura ou de alguma deficiência nutricional, uma vez que a composição e concentração dos diferentes açúcares e fontes de nitrogênio alteram o padrão de crescimento de leveduras (da Cruz, Cilli and Ernandes, 2002; Steensels *et al.*, 2015).

Tabela 4 – Valor máximo de ΣDO_{600nm} obtido pelas leveduras após 72 h de cultivo em diferentes meios

Levedura	YPD	YPM	Mosto
<i>B. anomalus</i> WLP640	7,58 a	2,37 b	1,87 c
<i>T. delbrueckii</i> WLP603	3,41 a	1,36 c	1,89 b
<i>S. cerevisiae</i> S-33	2,49 b	1,29 c	2,95 a
<i>S. cerevisiae</i> FT013C	1,96 b	1,40 c	3,10 a

Letras iguais na linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios de cultivo utilizados para a levedura, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A cepa de *T. delbrueckii* apresentou o maior crescimento em YPD, com a leitura máxima igual a 3,41 para esse meio (Tabela 4). Esse valor foi 2,5 vezes maior que o observado em YPM, de 1,36. A máxima leitura em mosto cervejeiro, de 1,89, foi semelhante àquela observada para *B. anomalus*. Contudo o padrão de crescimento foi diferente entre elas, de forma que a *T. delbrueckii* foi mais eficiente na multiplicação celular quando comparada à *B. anomalus*. A velocidade de crescimento, representada pelo incremento na leitura de DO_{600nm} por unidade de tempo, em YPD e mosto são semelhantes até 7 horas após a inoculação, quando o crescimento em mosto é reduzido e atinge a fase estacionária.

As leveduras *S. cerevisiae* apresentaram padrões de crescimento semelhantes em YPM. Em mosto cervejeiro, apesar das leituras máximas obtidas para as duas linhagens terem ficado próximas, 2,95 (S-33) e 3,10 (FT013C), o padrão das curvas foi um pouco distinto. A primeira apresentou maior velocidade de crescimento, atingindo a fase estacionária antes da FT013C. Em YPD, a S-33 apresentou maior capacidade e velocidade de crescimento em relação à outra cepa.

O maior crescimento das leveduras convencionais em mosto em relação às não-*Saccharomyces* revela que as primeiras dispõem de metabolismo mais eficiente para o crescimento celular em mosto cervejeiro. Tal constatação reforça o fato dessas linhagens de *S. cerevisiae* terem passado por um processo de domesticação para fermentações cervejeiras, uma vez que já são amplamente utilizadas na indústria da cerveja, diferente das não convencionais. A menor capacidade da *T. delbrueckii* crescer em mosto em relação às cepas cervejeiras está ligada, provavelmente, à incapacidade dessa cepa em consumir a maltose e maltotriose (item 5.2), ao passo

que o menor crescimento da *B. anomalus* pode estar relacionado aos fatores já citados anteriormente.

As observações de crescimento em YPD e YPM nos permite afirmar que há diferenças no padrão e na capacidade de crescimento das leveduras em glicose e maltose. Ambas leveduras não convencionais foram capazes de crescer em mosto cervejeiro, apesar das diferenças observadas, apontando a competência dessas para a condução do processo de fermentação de cervejas.

5.4 Tolerância ao etanol e compostos do lúpulo

O etanol e os compostos do lúpulo, acima de certas concentrações, são tóxicos para as leveduras (Hazelwood *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2007). Neste sentido foi avaliada a capacidade e o perfil de crescimento das leveduras em duas concentrações consideradas regular e alta, tanto de etanol (4 e 8%, v/v), como de compostos do lúpulo (40 e 80 mg.L⁻¹ de α -ácidos). Avaliou-se o efeito desses fatores de estresse isoladamente e em combinação.

Os resultados, apresentados na Figura 6, sugerem que as leveduras avaliadas foram impactadas pelas variáveis avaliadas, de forma que cada uma apresentou respostas diferentes para os diferentes tratamentos.

Figura 6 - Crescimento das leveduras (A) *B. anomalus* WLP640; (B) *T. delbrueckii* WLP603; (C) *S. cerevisiae* S-33 e (D) FT013C, nos meios contendo: (—) 4% etanol; (—) 8% etanol; (—) 40 mg/L de α -ácidos; (—) 80 mg/L de α -ácidos; (—) 4% etanol + 40 mg/L de α -ácidos; (—) 4% etanol + 80 mg/L de α -ácidos; (—) 8% etanol + 40 mg/L de α -ácidos; (—) 8% etanol + 80 mg/L de α -ácidos. $\Sigma DO 600nm$ = soma de nove leituras de absorbância (600nm) por poço em cada intervalo de tempo. As curvas representam a média de quatro repetições.

Tabela 5 - Valor máximo de DO_{600nm} obtido para as leveduras após 72 h de cultivo

	Etanol (% v/v)		α-ácido (ppm)		Etanol (% v/v) + α-ácido (ppm)			
	4%	8%	40	80	4% + 40	4% + 80	8% + 40	8% + 80
<i>B. anomalus</i> (WLP640)	2,38 ^a	2,69 ^a	1,24 ^{bc}	0,88 ^{bcd}	1,46 ^b	0,94 ^{bcd}	0,72 ^{cd}	0,26 ^d
<i>T. delbrueckii</i> (WLP603)	2,01 ^a	1,75 ^{ab}	1,41 ^{abc}	1,34 ^{abc}	1,05 ^{bc}	1,16 ^{bc}	0,78 ^c	0,75 ^c
<i>S. cerevisiae</i> (S-33)	1,23 ^a	1,39 ^a	1,02 ^a	1,10 ^a	1,06 ^a	1,27 ^a	1,71 ^a	1,60 ^a
<i>S. cerevisiae</i> (FT013C)	1,14 ^c	1,41 ^{bc}	1,18 ^c	1,33 ^{bc}	2,00 ^{ab}	2,44 ^a	1,93 ^{ab}	2,30 ^a

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa para o cultivo da levedura nas condições do experimento, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Os menores crescimentos populacionais foram observados para a levedura *B. anomalus* nas combinações de etanol e lúpulo, especialmente nas concentrações de 8% e 80 mg/L, 8% e 40 mg/L e 4% e 80 mg/L de etanol e α -ácidos, respectivamente (Tabela 5). Nota-se que todos os tratamentos contendo α -ácidos na concentração de 80 mg/L comprometeram substancialmente o crescimento dessa cepa quando comparados aos demais, apontando maior intolerância ao lúpulo em relação ao etanol. Essa observação reforça a hipótese levantada no item 5.2, do menor crescimento dessa cepa em mosto cervejeiro estar relacionado à inibição por compostos do lúpulo. As maiores leituras de densidade óptica, 2,34 e 2,69, foram obtidas após 72 horas nos tratamentos contendo 4 e 8% de etanol, respectivamente. Esses valores de DO_{600nm} são consistentes com a máxima leitura obtida na avaliação de crescimento em diferentes substratos para o meio YPM (item 5.3), o que evidencia que a levedura não foi afetada pelo etanol nas concentrações avaliadas. Houve crescimento intermediário nas condições de 4% de etanol + 40ppm de iso- α -ácidos e em 40ppm de iso- α -ácidos. Portanto, a cepa de *B. anomalus* avaliada, tolera melhor condições moderadas de lupulagem, principalmente, na produção de cervejas mais alcoólicas.

Assim como, para a *B. anomalus*, o desenvolvimento da *T. delbrueckii* foi mais comprometido pela combinação de etanol e lúpulo. Após 72 horas, é possível notar um padrão na redução das leituras de DO_{600nm} da linhagem de *T. delbrueckii* de forma que o etanol isoladamente teve menor impacto no crescimento, seguido dos compostos de lúpulo e, então, da combinação entre etanol e lúpulo. O menor crescimento observado após 24, 48 e 72 horas foi para o tratamento de 8% de etanol com 80 mg/L de α -ácidos. Ao passo que o maior crescimento registrado foi em 4% de etanol.

Ao contrário das leveduras não-*Saccharomyces*, as *S. cerevisiae* apresentaram padrão menos uniforme quanto aos diferentes grupos de tratamentos (etanol, lúpulo e em combinação). Contudo, fica evidente que o comportamento das leveduras convencionais na combinação de etanol e compostos do lúpulo foi diferente quando comparado às curvas de crescimento das não convencionais. A linhagem FT013C apresentou os maiores crescimentos com as combinações de lúpulo e álcool, embora a fase *lag* tenha sido estendida nesses tratamentos quando havia 8% de etanol. Com base nisso, pode-se afirmar que essa cepa se beneficiou dessa combinação. É possível que um composto ou combinação de compostos desse tratamento tenha

favorecido o estabelecimento do equilíbrio redox das células, como já relatado em leveduras que dispõem da atividade das enzimas cinamato descarboxilase (PAD) e vinilfenol redutase (VPR) quando em presença de alguns ácidos orgânicos (Curtin *et al.*, 2013; Larsson, Nilvebrant and Jönsson, 2001). Contudo, são necessárias pesquisas futuras para elucidar de forma clara as causas desse comportamento. A linhagem S-33 apresentou crescimentos maiores em 8% de álcool, nas combinações com lúpulo e isoladamente.

Portanto, existe diferença nas características de tolerância aos estresses avaliados entre as leveduras não-*Saccharomyces* e as convencionais. Conclui-se que as não convencionais toleram melhor condições moderadas de lupulagem, principalmente na produção de cervejas mais alcoólicas.

5.5 Avaliação da capacidade de formação de espuma

Conforme apresentado na Tabela 6, os resultados desta análise apontam que não houve diferença significativa na altura atingida pela espuma durante as fermentações por *B. anomalus* e *T. delbrueckii*. Sendo que a primeira não produziu espuma durante o período avaliado, apresentando diferença para as *Saccharomyces*. A formação de espuma pela *T. delbrueckii* não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à FT013C (*S. cerevisiae*) e à S-33 (*S. cerevisiae*), que exibiu a maior altura aferida (1,15 cm).

Tabela 6 - Altura média atingida pela espuma durante a fermentação de mosto cervejeiro com SG = 1,048

LEVEDURA	ALTURA (cm)
S-33 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,15 ± 0,51 a
FT013C (<i>S. cerevisiae</i>)	0,73 ± 0,17 a
WLP 603 (<i>T. delbrueckii</i>)	0,51 ± 0,15 ab
WLP 640 (<i>B. anomalus</i>)	0,00 ± 0,00 b

Letras iguais na coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Dados os inconvenientes que a formação excessiva de espuma durante a fermentação pode ocasionar e as desvantagens do uso de antiespumantes, as leveduras não convencionais se destacaram ao apresentarem altura de formação de espuma igual ou menor que cepas de *S. cerevisiae* regularmente utilizadas em

processos industriais de produção de cerveja. Essa é uma informação relevante para a aplicação prática, uma vez que o cervejeiro pode selecionar a cepa mais adequada ao seu processo, bem como adequar seu processo à cepa selecionada.

A quantidade e a estabilidade da espuma formada durante a fermentação dependem de diversos fatores. Dentre eles, das características da levedura, como a hidrofobicidade da parede celular (manoproteínas), velocidade de fermentação, atividade enzimática, padrão de utilização e excreção de peptídeos (Blasco, Viñas and Villa, 2011). Portanto, a diferença percebida entre as diferentes leveduras provavelmente tem relação com um ou mais desses fatores, demandando estudos futuros mais aprofundados para explicar a causa exata dessas diferenças.

5.6 Evolução da fermentação com base na perda de massa

O avanço da fermentação foi avaliado com base na perda de massa do sistema, ocasionada pelo desprendimento de CO_2 . Essa perda pode ser correlacionada com a evolução no consumo do substrato do meio (Powell, Quain and Smart, 2003).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Evolução da perda de peso do sistema de fermentação pelo desprendimento de CO_2 , durante fermentação de mosto cervejeiro pelas leveduras: (—) *B. anomalus* WLP640; (—) *T. delbrueckii* WLP 603; (—) *S. cerevisiae* S-33; (—) *S. cerevisiae* FT013C. As curvas representam a média de quatro repetições.

As leveduras não convencionais exibiram padrões semelhantes entre si na evolução da fermentação, com menos perda de massa quando comparadas às duas cepas de *S. cerevisiae*. Isso indica que houve menor liberação de dióxido de carbono em relação às convencionais.

A fase *lag*, aquela que antecede a fase exponencial da fermentação, foi um pouco mais longa para as não-*Saccharomyces* se contrastadas com as leveduras cervejeiras. Essa etapa durou em torno de 7 horas para as linhagens de *S. cerevisiae*, S-33 e FT013C, ao passo que durou aproximadamente 10 horas para as não convencionais. Observando a curva de evolução da fermentação (Figura 7), é possível notar também que a fase tumultuosa foi bastante diferente quando se compara as leveduras convencionais com as não convencionais. Nessa fase a S-33 foi a que apresentou maior velocidade de consumo de substrato, com maior redução de massa por unidade de tempo, até atingir o final da fermentação por volta de 30 horas após a inoculação. A FT013C apresenta uma curva menos inclinada durante a fase tumultuosa em relação à S-33, o que evidencia um padrão mais lento no consumo do substrato, finalizando essa fase aproximadamente 72 horas após ser inoculada. *B. anomalus* e *T. delbrueckii* exibiram curvas de consumo muito menos inclinadas e com pouca perda de massa do sistema, finalizando o consumo após 52 e 34 horas da inoculação, respectivamente. Reduziram a massa do sistema em 21% e 25%, na ordem, em relação à massa perdida durante a fermentação pela *S. cerevisiae*, FT013C.

O reduzido desempenho da *T. delbrueckii* deve estar relacionado à incapacidade dessa cepa em consumir maltose e maltotriose, os dois açúcares mais abundantes no mosto cervejeiro, como observado na análise de crescimento nas diferentes fontes de carbono (item 5.2). Apesar da *B. anomalus* ter se apresentado capaz de consumir diversos carboidratos (item 5.2), incluindo maltose e maltotriose, essa cepa também exibiu baixo desprendimento de CO₂. Uma possível razão para tal observação está relacionada à inibição do metabolismo dessa levedura pelo ácido acético produzido durante sua atividade metabólica, uma vez que dependendo da concentração, esse ácido tende a prejudicar o crescimento celular, a produção de etanol, a taxa de consumo da glicose e outros fatores importantes na fermentação em exemplares desse gênero (Uscanga *et al.*, 2007; Moktaduzzaman *et al.*, 2016).

Os padrões apresentados na presente análise foram semelhantes àqueles observados no crescimento celular em mosto cervejeiro (item 5.3).

Portanto, nas condições avaliadas, as leveduras não convencionais apresentaram curvas de desprendimento de CO₂ mais encolhidas, o que indica menor desempenho fermentativo quando comparadas às *Saccharomyces*. Tal característica não compromete a aplicação dessas leveduras para a produção de cerveja, apenas representa uma importante informação para a adoção de estratégias e tomadas de decisão na condução da fermentação.

5.7 Capacidade de floculação

A capacidade de floculação das leveduras é um parâmetro importante na aplicação prática de diferentes microrganismos em processos industriais de produção de cerveja. Portanto, esse foi um dos parâmetros avaliados, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.

O fenômeno da floculação consiste na agregação das células de levedura, formando aglomerados, fato que aumenta a tendência de sedimentação por consequência do aumento da massa. Contudo, a intensidade da sedimentação depende de outros fatores além da capacidade de floculação, como a densidade, viscosidade e temperatura do meio, por exemplo. A capacidade de floculação, por sua vez, depende da genética das leveduras e de fatores do meio, como a composição e concentração de açúcares e íons (Verstrepen *et al.*, 2003a). Logo, a comparação entre leveduras só pode ser realizada quando são avaliadas em uma solução padronizada e em condições controladas.

Tabela 7 - Média da capacidade de floculação (%) com base na sedimentação celular após 30 minutos de repouso

LEVEDURAS	FLOCULAÇÃO (%)
S-33 (<i>S. cerevisiae</i>)	82,45 a
FT013C (<i>S. cerevisiae</i>)	33,71 b
WLP 640 (<i>B. anomalus</i>)	32,80 b
WLP 603 (<i>T. delbrueckii</i>)	13,52 c

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A levedura *T. delbrueckii* foi a que apresentou a menor sedimentação, fenômeno que pode ser correlacionado à menor capacidade de floculação, com 13,52% de redução da ΣDO_{600nm} em relação ao tratamento controle, após 30 minutos

de repouso. Ao passo que a cepa de *B. anomalus* avaliada exibiu perfil de sedimentação semelhante à FT013C (*S. cerevisiae*), com 32,80% e 33,71%, respectivamente. A *S. cerevisiae*, S-33, foi a levedura que apresentou maior potencial de floculação, com 82,45% de sedimentação celular.

Geralmente, cepas cervejeiras apresentam floculação de 40% a 90%, ao passo que cepas não floculantes se situam na faixa entre 0% e 15% (Verstrepen *et al.*, 2003a). Os resultados obtidos são coerentes com as origens de cada uma dessas leveduras. Para as leveduras não convencionais, uma baixa capacidade de floculação é razoável, uma vez que não sofreram o mesmo processo de seleção que as linhagens cervejeiras convencionais. A FT013C é uma linhagem isolada do processo de produção de cerveja de trigo, na qual uma das principais características é a turbidez, decorrente, entre outros fatores, da levedura em suspensão, fato que pode explicar sua baixa capacidade de floculação. O maior potencial de floculação, 82,45%, foi da S-33, cepa indicada pelo próprio fabricante por ter uma taxa de sedimentação média (FERMENTIS, 2018).

Usualmente a floculação e sedimentação da levedura ao final da fermentação é desejável por facilitar a remoção dessas da cerveja pronta. Quando essa característica é desejável, o ideal é que ela ocorra apenas ao final da fermentação, uma vez que a floculação e sedimentação prematura pode resultar em fermentações lentas e/ou incompletas, aromas e sabores indesejáveis na bebida terminada e açúcares residuais, que podem favorecer problemas de contaminação e excesso de carbonatação (Vidgren and Londesborough, 2011). Ainda, mesmo nos cenários em que se deseja obter uma cerveja límpida, as leveduras que apresentam baixa floculação podem ser usadas, pois atualmente existem diversas técnicas, processos e equipamentos disponíveis aos cervejeiros que permitem a remoção da levedura presente na cerveja (Soares, 2011). Contudo, vale a pena lembrar que existem casos em que o cervejeiro deseja que as leveduras estejam presentes no produto terminado.

Portanto, apesar de ser um fator importante, a capacidade de floculação não é um fator determinante para a produção de cerveja. O cervejeiro deve conhecer as particularidades do microrganismo que irá utilizar para adequar o processo às suas características.

5.8 Teste qualitativo de produção de sulfeto de hidrogênio

As leveduras foram avaliadas quanto ao potencial de produção de sulfeto de hidrogênio. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

No meio de cultivo em que o teste foi realizado o bismuto serviu como um indicador da formação de sulfeto, de forma que o segundo reagiu com o primeiro produzindo coloração marrom. A formação de colônias com tonalidades mais escuras, é indicativo da maior capacidade da levedura em reduzir sulfito a sulfeto, precursor do sulfeto de hidrogênio, pela ação da sulfito redutase (Linderholm *et al.*, 2008). Portanto, este teste indica o nível basal de atividade dessa enzima, apontando o potencial de produção de H₂S.

Figura 8 - Coloração obtida pelas colônias de leveduras cultivadas em meio BiGGY ágar. À esquerda estão os controles positivo e negativo. À direita estão as leveduras de interesse. Tons mais escuros evidenciam maior potencial de produção de H₂S: (-) Ausente; (+) Baixa; (++) Média; (+++) Alta.

A levedura *B. anomalus* apresentou colônias com coloração mais escura, com intensa produção de sulfeto, indicando alto potencial de produção de H₂S, seguida da *T. delbrueckii* e da S-33, que apresentaram perfil semelhante, com potencial médio de produção de H₂S. As colônias da levedura FT013C permaneceram com tonalidade clara, evidenciando a ausência de formação de sulfeto suficiente para corar as colônias.

Apesar do indicativo de alto e médio potencial de produção de sulfeto de hidrogênio pela cepa de *B. anomalus* e *T. delbrueckii*, respectivamente, vale lembrar

que existe uma tendência de redução nos níveis desse composto ao final de fermentações conduzidas com leveduras cervejeiras (Oka *et al.*, 2008). Fato que destaca a importância de estudos futuros acerca do comportamento de *B. anomalus* e *T. delbrueckii* quanto à redução da concentração de H₂S nos estágios finais da fermentação.

5.9 Teste de esporulação

A capacidade de esporulação foi avaliada devido à importância desse atributo no manejo das leveduras.

A esporulação (reprodução sexuada) é favorecida em condições de escassez de alimento (Gibson *et al.*, 2010). Logo, essa característica deve ser levada em conta, especialmente, durante propagações e em situações de reciclo de culturas em sucessivas fermentações (reutilização). O ciclo sexuada provoca recombinações genéticas na população, que pode perder suas características originais, culminando em fermentações imprevisíveis devido a mudanças no comportamento das leveduras (fenótipo). Portanto, essa é uma situação que os cervejeiros querem evitar, a fim de manter o máximo controle sobre a fermentação. Contudo, nem todas as cepas apresentam a mesma facilidade de se reproduzir por meiose, sendo algumas incapazes, pois esse atributo depende da interação entre fatores genéticos e ambientais (Gerke *et al.*, 2010).

Apenas para *B. anomalus* não foi observada a formação de ascas, estruturas que contém os esporos, em nenhuma das duas condições avaliadas. Essa observação está em concordância com a classificação que o fabricante enquadrou esse microrganismo, uma vez que o laboratório comercializa essa cepa sob a denominação *Brettanomyces anomalus*, nomenclatura adotada para a fase assexuada desse gênero.

No caso da *T. delbrueckii* a esporulação foi detectada após 48 horas de inoculação das células no meio de esporulação, independente do meio pré-esporulação em que a levedura foi crescida (YPD ou mosto cervejeiro). Ambas as linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de esporular (Tabela 8). A FT013C apresentou maior facilidade em iniciar e completar a meiose nas condições avaliadas, uma vez que se observou ascas completamente formados após 24 horas de inoculação no meio de esporulação, independente do meio em que as células foram crescidas. A S-33 apresentou padrão diferente das outras leveduras de forma que,

quando propagada em mosto, entrou em meiose após 48 horas da inoculação no meio de acetato de potássio e, quando propagada em YPD, esporulou após 72 horas. Isso indica que o meio YPD forneceu uma condição nutricional que atrasou a esporulação em relação ao mosto cervejeiro. Como as condições de incubação foram as mesmas para os dois meios, a diferença observada pode ser explicada pelo metabolismo de açúcares e fontes de nitrogênio, pois sabe-se que para leveduras *Saccharomyces* iniciarem a meiose e esporulação é necessário ativar o metabolismo respiratório, a ausência de açúcares ou fontes de carbono fermentescíveis e de fontes de nitrogênio assimilável (Mitchell, 1994).

As imagens das células esporuladas estão apresentadas na Figura 9.

Tabela 8 - Teste de esporulação, expressos em relação à capacidade de esporular (positivo e negativo) e o tempo para a observação de células esporuladas (ascos)

MEIO	LEVEDURA	RESULTADO	TEMPO (h)
YPD	WLP640	NEGATIVO	---
	WLP603	POSITIVO	48
	S-33	POSITIVO	72
	FT013C	POSITIVO	24
MOSTO	WLP640	NEGATIVO	---
	WLP603	POSITIVO	48
	S-33	POSITIVO	48
	FT013C	POSITIVO	24

Figura 9 - Células das leveduras: (A) *T. delbrueckii* WLP 603, (B) *S. cerevisiae* S-33; (C) *S. cerevisiae* FT013C após indução da esporulação em solução de acetato de potássio. Os ascos são indicados pelas setas vermelhas e as células não esporuladas pelas setas amarelas. Imagens feitas por microscopia de contraste de fase.

6. CONCLUSÃO

As leveduras não convencionais, *Brettanomyces anomalus* e *Torulaspora delbrueckii*, avaliadas neste trabalho apresentam características fisiológicas compatíveis à aplicação em fermentações cervejeiras desde que sejam observadas determinadas condições como teor alcoólico e α -ácidos.

Apesar do menor crescimento populacional em comparação às leveduras *Saccharomyces*, as cepas não-*Saccharomyces* são capazes de tolerar etanol e compostos do lúpulo, demonstrando maior aptidão na produção de cervejas com menores cargas de lúpulo e menor teor alcoólico.

A levedura *T. delbrueckii* (cepa WLP 603) apresenta potencial para a produção de cervejas com reduzido teor alcoólico, cervejas mais encorpadas e adocicadas e inoculadas com outros microrganismos, por sua dificuldade em consumir maltose e maltotriose, açúcares mais abundantes no mosto cervejeiro. Além da produção de cervejas turvas, por apresentar baixa capacidade de floculação.

Essa linhagem produz espuma e apresenta potencial de produção de compostos sulfurosos durante a fermentação, com padrões semelhantes a uma cepa cervejeira.

A *B. anomalus* (cepa WLP 640) não esporula e nem forma espuma durante a fermentação. O elevado potencial de produção de compostos sulfurosos pode ser contornado com estratégias no processo de produção. Sua capacidade de floculação é baixa, semelhante a uma linhagem cervejeira que produz cervejas turvas.

Essa cepa é capaz de consumir a celobiose, revelando atividade da enzima β -glicosidase, que representa um grande potencial para a exploração de novas combinações de aromas.

O presente trabalho contribui com informações relevantes para a aplicação das leveduras não convencionais estudadas em processos controlados de fermentação para a produção de cervejas com novas características, além de apresentar um procedimento que possibilita avaliar a aplicabilidade de outras leveduras não-*Saccharomyces* para essa finalidade.

REFERÊNCIAS

- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P. and Bely, M. (2014) 'Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*', **PloS one**, 9(4), pp. e94246.
- Alloue-Boraud, W.A.M., N'Guessan, K. F., Hiligsmann, S., Djè, K. M. and Delvigne, F. (2015) Fermentation profile of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures on barley malt medium, **Journal of Food Science and Technology**, 52(8), pp. 5236-5242.
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M., Spencer-Martins, I., Leao, C. and Sousa, M. (2007) 'Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*', **Microbiology**, 153(3), pp. 898-904.
- Bamforth, C. and Kanauchi, M. (2004) 'Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast', **Journal of the Institute of Brewing**, 110(2), pp. 83-93.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2008) 'Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide', **International Journal of Food Microbiology**, 121(2), pp. 201-207.
- Barnett, J.A. (2004) 'A history of research on yeasts 8: taxonomy', **Yeast**, 21(14), pp. 1141-1193.
- Barnett, J.A. and Entian, K.D. (2005) 'A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism', **Yeast**, 22(11), pp. 835-894.
- Basso, L., Oliveira, A., Orelli, V., Campos, A., Gallo, C. and Amorim, H. (1993) 'Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem'. **Anais Congresso Nacional da STAB**, 246-250.
- Basso, R.F., Alcarde, A.R. and Portugal, C.B. (2016) 'Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?', **Food Research International**, 86, pp. 112-120.
- Beer judge certification program, BJCP (2015). '**Beer Style Guidelines**' Disponível em: <https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf>. Acesso em: 13 jun 2018.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubourdieu, D. (2008) 'Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation', **International Journal of Food Microbiology**, 122(3), pp. 312-320.
- Blasco, L., Viñas, M. and Villa, T. G. (2011) 'Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast', **International Microbiology**, 2011, vol. 14, num. 2, p. 61-71.
- Bokulich, N.A. and Bamforth, C.W. (2013) 'The Microbiology of Malting and Brewing', **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 77(2), pp. 157-172.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W. and Mills, D.A. (2012) 'Brewhouse-Resident Microbiota are Responsible for Multi-Stage Fermentation of American Coolship Ale', **PLoS one**, 7(4), pp. e35507.
- BRASIL (2009), 'Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009', Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>, Acesso em: 25 mar 2019.
- Brewers Association (2018) 'National beer sales and production data' **The New Brewer**. Disponível em: <<https://www.brewersassociation.org/statistics/national-beer-sales-production-data/>>. Acesso em: 08 jun 2018

- Budić-Leto, I., Zdunić, G., Banović, M., Tomić-Potrebuješ, I. and Lovrić, T. (2010) 'Fermentative Aroma Compounds and Sensory Descriptors of Traditional Croatian Dessert Wine Prošek from Plavac mali cv', **Food Technology and Biotechnology**, 48(4), pp. 530-537.
- Budroni, M., Zara, G., Ciani, M. and Comitini, F. (2017) 'Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts', **Brewing Technology: InTech**.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F. and Ciani, M. (2016) 'Torulaspora delbrueckii in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content', **Food microbiology**, 56, pp. 45-51.
- Canonico, L., Comitini, F. and Ciani, M. (2017) 'Torulaspora delbrueckii contribution in mixed brewing fermentations with different Saccharomyces cerevisiae strains', **International journal of food microbiology**, 259, pp. 7-13.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. and Romano, P. (2018) 'Conventional and non-conventional yeasts in beer production', **Fermentation**, 4(2), pp. 38.
- Colomer, M. S., Funch, B. and Forster, J. (2019) 'The raise of Brettanomyces yeast species for beer production', **Current opinion in biotechnology**, 56, pp. 30-35.
- Crauwels, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K., Verstrepen, K. and Lievens, B. (2015a) 'Brettanomyces bruxellensis, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry', **BrewingScience**, 68(9-10), pp. 110-121.
- Crauwels, S., Van Assche, A., de Jonge, R., Borneman, A., Verreth, C., De Samblanx, G., Marchal, K., Van de Peer, Y., Willems, K. and Verstrepen, K. (2015b) 'Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different Brettanomyces bruxellensis strains', **Applied microbiology and biotechnology**, 99(21), pp. 9123-9134.
- Curtin, C. D., Langhans, G., Henschke, P. A. and Grbin, P. R. (2013) 'Impact of Australian Dekkera bruxellensis strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma', **Food microbiology**, 36(2), pp. 241-247.
- da Cruz, S. H., Cilli, E. M. and Ernandes, J. R. (2002) 'Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation', **Journal of the Institute of Brewing**, 108(1), pp. 54-61.
- Daenen, L. (2008) 'Exploitation of the flavour potential of hop and sour cherry glycosides by Saccharomyces and Brettanomyces glycoside hydrolase activities', status: published.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F., Verachtert, H. and Derdelinckx, G. (2008a) 'Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in Saccharomyces and Brettanomyces brewing yeasts', **Journal of Applied Microbiology**, 104(2), pp. 478-488.
- Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H. and Derdelinckx, G. (2008b) 'Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a Brettanomyces strain on glycosides from sour cherry (Prunus cerasus L.) used in the production of special fruit beers', **FEMS Yeast Research**, 8(7), pp. 1103-1114.
- Dijken, H. (2002) 'The 21st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001) "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)"', **FEMS yeast research**, 1(4), pp. 337-338.

- Domizio, P., House, J., Joseph, C., Bisson, L. and Bamforth, C. (2016) '*Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer', **Journal of the Institute of Brewing**, 122(4), pp. 599-604.
- Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N. and Debourg, A. (2001) 'Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast', **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55(3), pp. 296-300.
- Esslinger, H. M. (2009) 'Handbook of brewing: processes, technology, markets', **John Wiley & Sons**.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., Garcia-Maiquez, E., Uruburu, F. and Querol, A. (2001) 'Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines', **Applied and environmental microbiology**, 67(5), pp. 2056-2061.
- Etchells, J., Costilow, R. and Bell, T. A. (1952) 'Identification of yeasts from commercial cucumber fermentations in northern brining areas', **Farlowia**, 4(2), pp. 249-64.
- FERMENTIS (2018) '**Technical Data Sheet - SafAle™ S-33**' Disponível em: <<https://fermentis.com/wp-content/uploads/2018/08/SafAle-S-33.pdf>>. Acesso em: 09 jan 2019
- Fredlund, E. (2004) Central carbon metabolism of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. Tese (Doutorado em Microbiologia), Swedish University of Agricultural Sciences.
- Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., Olstorp, M. N., Passoth, V. and Schnürer, J. (2004) 'Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*', **FEMS Microbiology Letters**, 238(1), pp. 133-137.
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S. and Tamai, Y. (1997) 'Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene', **Applied and Environmental Microbiology**, 63(3), pp. 910-915.
- García, M., Greetham, D., Wimalasena, T., Phister, T., Cabellos, J. and Arroyo, T. (2016) 'The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates', **Journal of applied microbiology**, 121(1), pp. 215-233.
- Gerke, J., Lorenz, K., Ramnarine, S. and Cohen, B. (2010) 'Gene–environment interactions at nucleotide resolution', **PLoS genetics**, 6(9), pp. e1001144.
- Gibson, B. R., Graham, N. S., Boulton, C. A., Box, W. G., Lawrence, S. J., Linforth, R. S., May, S. T. and Smart, K. A. (2010) 'Differential yeast gene transcription during brewery propagation', **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 68(1), pp. 21-29.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D. and Smart, K. A. (2007) 'Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling', **FEMS Microbiology Reviews**, 31(5), pp. 535-569.
- González, S. S., Barrio, E. and Querol, A. (2008) 'Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing', **Appl. Environ. Microbiol.**, 74(8), pp. 2314-2320.
- Hanl, L., Sommer, P. and Arneborg, N. (2005) 'The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*', **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67(1), pp. 113-118.

Hazelwood, L. A., Walsh, M. C., Pronk, J. T. and Daran, J.-M. (2010) 'Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- α -acids', **Applied and environmental microbiology**, 76(1), pp. 318-328.

He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J. and Chen, L. (2014) 'Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review', **Journal of the Institute of Brewing**, 120(3), pp. 157-163.

Hernandes, K. C. (2018) 'Avaliação do efeito do processamento da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma a partir da incorporação de uma camada extra de polidimetilsiloxano a uma fibra comercial de microextração em fase sólida'. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J. and Thevelein, J. M. (2018) 'Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations', **Food Microbiology**, 72, pp. 55-66.

King, A. and Richard Dickinson, J. (2000) 'Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*', **Yeast**, 16(6), pp. 499-506.

Kordialik-Bogacka, E. and Ambroziak, W. (2004) 'Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation', **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84(14), pp. 1960-1968.

Kotzekidou, P. (1997) 'Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates', **Food Microbiology**, 14(6), pp. 609-616.

Krogerus, K. and Gibson, B. R. (2013) '125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation', **Journal of the Institute of Brewing**, 119(3), pp. 86-97.

Kunze, W. (2010) 'Technology of brewing and malting (4th International English Edition)', **The research and teaching institute for brewing in Berlin (VLB) VLB's Publishing Department**, Berlin.

Lachance, M.-A. (1995) 'Yeast communities in a natural tequila fermentation', **Antonie van Leeuwenhoek**, 68(2), pp. 151-160.

Landaud, S., Helinck, S. and Bonnarne, P. (2008) 'Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food', **Applied microbiology and biotechnology**, 77(6), pp. 1191-1205.

Larsson, S., Nilvebrant, N.-O. and Jönsson, L. (2001) 'Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions', **Applied microbiology and biotechnology**, 57(1-2), pp. 167-174.

Lee, Y.-J., Choi, Y.-R., Lee, S.-Y., Park, J.-T., Shim, J.-H., Park, K.-H. and Kim, J.-W. (2011) 'Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits', **Mycobiology**, 39(1), pp. 33-39.

Lentz, M., Putzke, T., Hessler, R. and Luman, E. (2014) 'Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential', **Journal of the Institute of Brewing**, 120(4), pp. 559-564.

- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P. and Sampaio, J. P. (2011) 'Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast', **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(35), pp. 14539-14544.
- Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y. and Bisson, L. F. (2008) 'Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*', **Applied and environmental microbiology**, 74(5), pp. 1418-1427.
- Lodolo, E. J., Kock, J. L., Axcell, B. C. and Brooks, M. (2008) 'The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing', **FEMS yeast research**, 8(7), pp. 1018-1036.
- Loretan, T., Mostert, J. and Viljoen, B. (2003) 'Microbial flora associated with South African household kefir', **South African Journal of Science**, 99(1-2), pp. 92-94.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA (2018) 'Anuário da Cerveja no Brasil' Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/AnuariodacervejanoBrasil09.01.pdf>>. Acesso em: 10 jun 2018
- Meilgaard, M. (1975a) 'Flavour chemistry of beer: Part I: Flavour interaction between principal volatiles', **Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am**, 12, pp. 107-116.
- Meilgaard, M. (2001) 'Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review', **Journal of the Institute of Brewing**, 107(5), pp. 271-286.
- Meilgaard, M., Dalglish, C. and Clapperton, J. (1979) 'BEER FLAVOUR TERMINOLOGY 1', **Journal of the Institute of Brewing**, 85(1), pp. 38-42.
- Meilgaard, M. C. (1975b) 'Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles', **Tech. Quart. Master. Brew. Assoc. Am.**, 12, pp. 151-168.
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F. and Hutzler, M. (2016a) 'Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model', **Yeast**, 33(4), pp. 129-144.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S. and Hutzler, M. (2016b) 'Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications', **Journal of the Institute of Brewing**, 122(4), pp. 569-587.
- Mitchell, A. P. (1994) 'Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*', **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 58(1), pp. 56-70.
- Mitrakul, C., Henick-Kling, T. and Egli, C. (1999) 'Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods', **Food Microbiology**, 16(1), pp. 3-14.
- Moktaduzzaman, M., Galafassi, S., Vigentini, I., Foschino, R., Corte, L., Cardinali, G., Piškur, J. and Compagno, C. (2016) 'Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*', **Annals of Microbiology**, 66(1), pp. 351-359.
- Nordström, K. (1963) 'Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast: IV. metabolism of acetyl-coenzyme A', **Journal of the Institute of Brewing**, 69(2), pp. 142-153.
- N'Guessan, F. K., Denis, Y., Camara, F. and Djè, M. K. (2010) '*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer', **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26(4), pp. 693-699.

- Ogata, T., Iwashita, Y. and Kawada, T. (2017) 'Construction of a brewing yeast expressing the glucoamylase gene STA1 by mating', **Journal of the Institute of Brewing**, 123(1), pp. 66-69.
- Oka, K., Hayashi, T., Matsumoto, N. and Yanase, H. (2008) 'Decrease in hydrogen sulfide content during the final stage of beer fermentation due to involvement of yeast and not carbon dioxide gas purging', **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 106(3), pp. 253-257.
- Pacheco, A., Santos, J., Chaves, S., Almeida, J., Leão, C. and Sousa, M. J. (2012) 'The emerging role of the yeast *Torulaspora delbrueckii* in bread and wine production: using genetic manipulation to study molecular basis of physiological responses', **Structure and Function of Food Engineering: InTech**.
- Panagiotis, T., Anastasios, K., Stilianos, L. and Elias, N. (2013) 'Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing', **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, 2013(124), pp. 415-426.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H.-M. and De Vuyst, L. (2011) 'Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations', **Applied and Environmental Microbiology**, pp. AEM. 05523-11.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä. and Schnürer, J. (2006) 'Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*', **FEMS yeast research**, 6(1), pp. 3-13.
- Pires, E., Teixeira, J., Brányik, T. and Vicente, A. (2014) 'Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast', **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(5), pp. 1937-1949.
- Powell, C. D., Quain, D. E. and Smart, K. A. (2003) 'The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation', **FEMS Yeast Research**, 3(2), pp. 149-157.
- Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T. and Becker, T. (2013) 'Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression', **LWT-Food Science and Technology**, 51(2), pp. 423-432.
- Rautio, J. and Londesborough, J. (2003) 'Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort', **Journal of the Institute of Brewing**, 109(3), pp. 251-261.
- Ravasio, D., Carlin, S., Boekhout, T., Groenewald, M., Vrhovsek, U., Walther, A. and Wendland, J. (2018) 'Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts', **Fermentation**, 4(1), pp. 15.
- Regodón, J., Pérez, F., Valdés, M., De Miguel, C. and Ramirez, M. (1997) 'A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains', **Food Microbiology**, 14(3), pp. 247-254.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. and Bely, M. (2009) 'Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry', **International Journal of Food Microbiology**, 134(3), pp. 201-210.
- Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R. and Thevelein, J. M. (2006) 'The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity', **Journal of Biological Chemistry**, 281(7), pp. 4446-4456.

- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F. and Delvaux, F. R. (2009) 'Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds', **Food Chemistry**, 114(4), pp. 1206-1215.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A. and Barrio, E. (2011) 'Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*', **Applied and environmental microbiology**, 77(7), pp. 2292-2302.
- Sanchez, R. G., Solodovnikova, N. and Wendland, J. (2012) 'Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance', **Yeast**, 29(8), pp. 343-355.
- Sentheshanmuganathan, S. and Elsdén, S. (1958) 'The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*', **Biochemical Journal**, 69(2), pp. 210.
- Sinha, N. (2007) 'Handbook of food products manufacturing', **John Wiley & Sons**.
- Smith, B. D. and Divol, B. (2016) '*Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages', **Food microbiology**, 59, pp. 161-175.
- Soares, E. V. (2011) 'Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review', **Journal of applied microbiology**, 110(1), pp. 1-18.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.-M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. and Vandamme, P. (2014) 'The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer', **PLoS one**, 9(4), pp. e95384.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. and Verstrepen, K. J. (2015) '*Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations', **International journal of food microbiology**, 206, pp. 24-38.
- Steensels, J. and Verstrepen, K. J. (2014) 'Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations', **Annual Review of Microbiology**, Vol 68, 68, pp. 61-80.
- Swiegers, J. and Pretorius, I. (2007) 'Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast', **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74(5), pp. 954-960.
- The brewers of Europe (2017) '**Beer Statistics 2017**' Disponível em: <<https://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2017/Statistics-201712-001.pdf>>. Acesso em: 25 jun 2018.
- Uscanga, M. A., Abarca, B. E., Rodriguez, J. G. and Garcia, R. C. (2007) 'Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *Brettanomyces bruxellensis* in batch culture', **Journal of food process engineering**, 30(1), pp. 13-23.
- Uscanga, M. A., Délia, M.-L. and Strehaiano, P. (2003) '*Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production', **Applied microbiology and biotechnology**, 61(2), pp. 157-162.
- Valdez, A. V., Garcia, L. S., Kirchmayr, M., Rodríguez, P. R., Esquinca, A. G., Coria, R. and Mathis, A. G. (2011) 'Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana', **Antonie Van Leeuwenhoek**, 100(4), pp. 497-506.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. and Delvaux, F. R. (2008) 'Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts', **Food Chemistry**, 107(1), pp. 221-230.

- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G. and Verachtert, H. (2003) 'Bioflavoring and beer refermentation', **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62(2-3), pp. 140-150.
- Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Verachtert, H. and Delvaux, F. (2003a) 'Yeast flocculation: what brewers should know', **Applied microbiology and biotechnology**, 61(3), pp. 197-205.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. and Delvaux, F. R. (2003b) 'Flavor-active esters: adding fruitiness to beer', **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96(2), pp. 110-118.
- Vervoort, Y., Herrera-Malaver, B., Mertens, S., Guadalupe Medina, V., Duitama, J., Michiels, L., Derdelinckx, G., Voordeckers, K. and Verstrepen, K. J. (2016) 'Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring', **Journal of applied microbiology**, 121(3), pp. 721-733.
- Vidgren, V. and Londesborough, J. (2011) '125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing', **Journal of the Institute of Brewing**, 117(4), pp. 475-487.
- Wainwright, T. (1973) 'Diacetyl—a review: Part I—analytical and biochemical considerations: Part II—brewing experience', **Journal of the Institute of Brewing**, 79(6), pp. 451-470.
- White, C. and Zainasheff, J. (2010) 'Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation', **Brewing Elements Series, Brewers Publications**.
- Whiting, G. (1976) 'Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—A review', **Journal of the Institute of Brewing**, 82(2), pp. 84-92.
- Wingard, J. R., Merz, W. G. and Saral, R. (1979) '*Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients', **Annals of Internal Medicine**, 91(4), pp. 539-543.
- Woolfit, M., Rozpędowska, E., Piškur, J. and Wolfe, K. H. (2007) 'Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*', **Eukaryotic cell**, 6(4), pp. 721-733.
- Yakobson, C. 2010. 'Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the brewing industry'. **Master's thesis, Heriot-Watt University**. Disponível em: <<http://www.brettanomycesproject.com/dissertation>>. Acesso em: 23 jan 2019
- Yoshioka, K. and Hashimoto, N. (1981) 'Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast', **Agricultural and Biological Chemistry**, 45(10), pp. 2183-2190.
- Zastrow, C., Hollatz, C., De Araujo, P. and Stambuk, B. (2001) 'Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*', **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 27(1), pp. 34-38.
- Zastrow, C. R., Mattos, M. A., Hollatz, C. and Stambuk, B. U. (2000) 'Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*', **Biotechnology letters**, 22(6), pp. 455-459.

ANEXOS

Anexo A

Tabela 9 - Crescimento celular de *Brettanomyces anomalus* WLP640 em meio YPD, YPM e mosto cervejeiro

Tempo (h)	YPD		YPM		Mosto	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.02
2	0.05	0.03	0.03	0.02	0.05	0.02
3	0.09	0.03	0.06	0.02	0.10	0.02
4	0.15	0.03	0.09	0.03	0.16	0.02
5	0.24	0.03	0.14	0.03	0.26	0.02
6	0.36	0.03	0.19	0.04	0.38	0.03
7	0.51	0.03	0.25	0.04	0.52	0.03
8	0.69	0.03	0.32	0.04	0.66	0.03
9	0.89	0.03	0.39	0.05	0.82	0.04
10	1.14	0.03	0.44	0.04	0.96	0.04
11	1.41	0.04	0.50	0.05	1.08	0.04
12	1.74	0.05	0.55	0.05	1.19	0.04
13	2.11	0.05	0.60	0.05	1.27	0.04
14	2.50	0.06	0.65	0.05	1.34	0.04
15	2.91	0.07	0.69	0.06	1.39	0.04
16	3.34	0.07	0.74	0.06	1.44	0.04
17	3.77	0.08	0.77	0.06	1.48	0.04
18	4.19	0.08	0.81	0.06	1.51	0.04
19	4.60	0.09	0.86	0.07	1.54	0.04
20	4.99	0.09	0.90	0.07	1.57	0.04
21	5.40	0.10	0.93	0.07	1.58	0.04
22	5.79	0.10	0.96	0.07	1.61	0.04
23	6.17	0.10	1.00	0.07	1.63	0.04
24	6.43	0.09	1.03	0.08	1.65	0.04
25	6.58	0.08	1.07	0.08	1.66	0.04
26	6.64	0.07	1.10	0.08	1.68	0.04
27	6.66	0.07	1.13	0.09	1.69	0.03
28	6.70	0.07	1.17	0.09	1.71	0.03
29	6.72	0.07	1.20	0.10	1.72	0.03
30	6.76	0.07	1.23	0.10	1.73	0.03
31	6.81	0.06	1.27	0.11	1.75	0.03
32	6.83	0.06	1.30	0.12	1.75	0.03
33	6.86	0.06	1.33	0.12	1.76	0.03
34	6.89	0.05	1.36	0.13	1.77	0.02
35	6.93	0.05	1.40	0.14	1.78	0.03
36	6.96	0.04	1.43	0.15	1.80	0.02
37	6.99	0.04	1.46	0.16	1.80	0.02
38	7.02	0.04	1.50	0.17	1.81	0.02
39	7.05	0.04	1.53	0.18	1.83	0.02
40	7.08	0.03	1.57	0.18	1.83	0.02
41	7.10	0.04	1.59	0.19	1.83	0.02
42	7.13	0.03	1.62	0.20	1.84	0.02
43	7.15	0.03	1.66	0.21	1.84	0.02

44	7.19	0.03	1.68	0.22	1.84	0.02
45	7.22	0.03	1.71	0.23	1.85	0.02
46	7.23	0.03	1.74	0.24	1.86	0.02
47	7.25	0.05	1.78	0.24	1.86	0.02
48	7.26	0.07	1.81	0.25	1.86	0.02
49	7.29	0.08	1.83	0.26	1.86	0.02
50	7.30	0.08	1.86	0.27	1.87	0.02
51	7.32	0.10	1.89	0.28	1.87	0.02
52	7.34	0.10	1.92	0.29	1.87	0.02
53	7.36	0.11	1.95	0.30	1.87	0.02
54	7.40	0.11	1.97	0.31	1.87	0.02
55	7.41	0.13	2.00	0.32	1.87	0.02
56	7.41	0.13	2.02	0.32	1.86	0.02
57	7.44	0.14	2.05	0.34	1.87	0.02
58	7.44	0.15	2.07	0.35	1.87	0.02
59	7.44	0.20	2.10	0.36	1.87	0.02
60	7.41	0.28	2.13	0.36	1.87	0.02
61	7.41	0.31	2.15	0.37	1.87	0.02
62	7.41	0.33	2.17	0.37	1.87	0.02
63	7.40	0.44	2.19	0.38	1.86	0.02
64	7.37	0.47	2.21	0.39	1.86	0.02
65	7.35	0.56	2.24	0.40	1.87	0.02
66	7.33	0.64	2.26	0.41	1.87	0.02
67	7.31	0.69	2.28	0.41	1.86	0.02
68	7.32	0.68	2.30	0.42	1.86	0.02
69	7.24	0.86	2.32	0.43	1.86	0.02
70	7.17	1.03	2.34	0.44	1.86	0.02
71	7.15	1.08	2.36	0.45	1.86	0.02
72	7.11	1.17	2.37	0.44	1.86	0.02

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo B

Tabela 10 - Crescimento celular de *Torulaspora delbrueckii* WLP603 em YPD, YPM e mosto cervejeiro

Tempo (h)	YPD		YPM		Mosto	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.06	0.01	0.08	0.02	0.07	0.03
2	0.13	0.01	0.13	0.01	0.15	0.03
3	0.24	0.00	0.16	0.03	0.29	0.02
4	0.41	0.01	0.20	0.03	0.47	0.03
5	0.66	0.00	0.23	0.04	0.72	0.03
6	1.00	0.01	0.29	0.04	1.02	0.03
7	1.41	0.02	0.33	0.04	1.30	0.03
8	1.82	0.01	0.38	0.04	1.50	0.03
9	2.13	0.01	0.42	0.04	1.59	0.03
10	2.39	0.03	0.44	0.04	1.64	0.03
11	2.63	0.05	0.47	0.04	1.66	0.03
12	2.84	0.08	0.49	0.05	1.66	0.03
13	3.04	0.09	0.52	0.04	1.67	0.03
14	3.23	0.11	0.54	0.04	1.67	0.03
15	3.37	0.11	0.57	0.05	1.67	0.03
16	3.40	0.15	0.58	0.05	1.67	0.03
17	3.28	0.15	0.59	0.05	1.67	0.03
18	3.16	0.15	0.61	0.05	1.68	0.03
19	3.05	0.13	0.63	0.05	1.68	0.03
20	2.98	0.13	0.66	0.05	1.68	0.03
21	2.93	0.13	0.67	0.05	1.68	0.03
22	2.89	0.12	0.68	0.05	1.68	0.03
23	2.87	0.12	0.70	0.05	1.69	0.03
24	2.84	0.12	0.71	0.05	1.69	0.03
25	2.83	0.12	0.73	0.05	1.69	0.03
26	2.82	0.12	0.74	0.05	1.70	0.03
27	2.81	0.11	0.76	0.05	1.70	0.03
28	2.79	0.12	0.77	0.05	1.70	0.03
29	2.77	0.11	0.78	0.05	1.70	0.03
30	2.77	0.11	0.80	0.05	1.71	0.03
31	2.77	0.12	0.82	0.05	1.71	0.03
32	2.76	0.12	0.83	0.05	1.71	0.03
33	2.75	0.12	0.85	0.05	1.71	0.03
34	2.74	0.12	0.86	0.05	1.72	0.03
35	2.74	0.13	0.88	0.05	1.72	0.03
36	2.72	0.13	0.90	0.05	1.73	0.03
37	2.69	0.14	0.91	0.05	1.73	0.03
38	2.67	0.14	0.93	0.05	1.74	0.03
39	2.66	0.14	0.94	0.05	1.75	0.03
40	2.62	0.15	0.96	0.05	1.75	0.03
41	2.61	0.14	0.98	0.05	1.75	0.03
42	2.59	0.15	0.98	0.05	1.75	0.03
43	2.57	0.15	1.01	0.05	1.76	0.03
44	2.57	0.15	1.01	0.05	1.76	0.03
45	2.55	0.15	1.03	0.05	1.76	0.03

46	2.54	0.16	1.04	0.06	1.78	0.03
47	2.53	0.16	1.07	0.05	1.78	0.03
48	2.52	0.16	1.08	0.06	1.78	0.03
49	2.51	0.16	1.09	0.06	1.79	0.03
50	2.49	0.17	1.10	0.06	1.79	0.03
51	2.49	0.17	1.12	0.06	1.79	0.03
52	2.48	0.18	1.13	0.06	1.80	0.03
53	2.47	0.18	1.15	0.06	1.80	0.03
54	2.47	0.18	1.16	0.06	1.81	0.03
55	2.47	0.18	1.17	0.06	1.81	0.03
56	2.46	0.18	1.19	0.07	1.81	0.03
57	2.46	0.19	1.19	0.07	1.82	0.03
58	2.45	0.19	1.21	0.07	1.82	0.03
59	2.46	0.19	1.22	0.07	1.83	0.03
60	2.46	0.20	1.24	0.07	1.83	0.03
61	2.44	0.20	1.25	0.07	1.84	0.03
62	2.43	0.21	1.26	0.08	1.84	0.03
63	2.43	0.21	1.27	0.08	1.84	0.03
64	2.43	0.21	1.28	0.08	1.85	0.03
65	2.43	0.21	1.30	0.08	1.86	0.03
66	2.43	0.22	1.31	0.08	1.86	0.03
67	2.42	0.23	1.31	0.08	1.87	0.03
68	2.43	0.23	1.32	0.08	1.87	0.03
69	2.42	0.23	1.34	0.08	1.87	0.03
70	2.42	0.24	1.34	0.08	1.88	0.03
71	2.41	0.25	1.35	0.08	1.88	0.03
72	2.41	0.25	1.36	0.09	1.89	0.03

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo C

Tabela 11 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (S-33) em YPD, YPM e mosto cervejeiro

Tempo (h)	YPD		YPM		Mosto	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.02	0.01	-0.03	0.01	0.02	0.00
2	0.13	0.01	0.00	0.02	0.10	0.00
3	0.30	0.02	0.08	0.02	0.28	0.01
4	0.61	0.02	0.12	0.03	0.56	0.01
5	1.07	0.02	0.16	0.05	0.93	0.01
6	1.63	0.04	0.24	0.04	1.31	0.02
7	2.13	0.07	0.32	0.05	1.64	0.03
8	2.48	0.08	0.41	0.06	1.94	0.04
9	2.49	0.08	0.49	0.06	2.19	0.05
10	2.41	0.08	0.57	0.06	2.43	0.04
11	2.29	0.07	0.65	0.07	2.62	0.05
12	2.21	0.06	0.73	0.06	2.76	0.06
13	2.15	0.05	0.81	0.07	2.85	0.08
14	2.10	0.05	0.88	0.07	2.90	0.08
15	2.07	0.05	0.96	0.06	2.92	0.07
16	2.05	0.05	1.01	0.06	2.92	0.07
17	2.05	0.05	1.06	0.07	2.92	0.06
18	2.05	0.05	1.10	0.06	2.92	0.07
19	2.04	0.05	1.13	0.06	2.92	0.07
20	2.04	0.05	1.16	0.06	2.91	0.08
21	2.05	0.05	1.18	0.07	2.91	0.07
22	2.06	0.05	1.19	0.06	2.91	0.08
23	2.07	0.06	1.20	0.06	2.90	0.07
24	2.07	0.06	1.22	0.06	2.91	0.07
25	2.08	0.06	1.22	0.05	2.90	0.08
26	2.09	0.06	1.22	0.06	2.91	0.08
27	2.09	0.06	1.22	0.05	2.91	0.08
28	2.10	0.06	1.22	0.06	2.91	0.08
29	2.11	0.07	1.22	0.06	2.91	0.07
30	2.12	0.06	1.22	0.06	2.90	0.08
31	2.13	0.06	1.22	0.05	2.91	0.08
32	2.14	0.07	1.22	0.06	2.90	0.08
33	2.14	0.07	1.23	0.06	2.91	0.08
34	2.14	0.07	1.23	0.05	2.90	0.08
35	2.16	0.07	1.23	0.06	2.91	0.08
36	2.17	0.07	1.23	0.06	2.92	0.08
37	2.17	0.07	1.23	0.05	2.92	0.08
38	2.18	0.08	1.23	0.06	2.92	0.08
39	2.18	0.08	1.24	0.06	2.93	0.08
40	2.18	0.08	1.24	0.06	2.93	0.08
41	2.20	0.08	1.23	0.06	2.92	0.08
42	2.20	0.08	1.23	0.06	2.92	0.08
43	2.21	0.08	1.24	0.06	2.92	0.08
44	2.23	0.08	1.24	0.07	2.92	0.08
45	2.23	0.09	1.24	0.06	2.92	0.08

46	2.24	0.09	1.24	0.06	2.93	0.08
47	2.24	0.09	1.25	0.06	2.92	0.08
48	2.25	0.09	1.25	0.06	2.93	0.08
49	2.26	0.10	1.25	0.06	2.93	0.08
50	2.26	0.10	1.25	0.06	2.93	0.08
51	2.26	0.10	1.25	0.06	2.93	0.08
52	2.27	0.10	1.25	0.06	2.93	0.08
53	2.27	0.10	1.26	0.06	2.93	0.08
54	2.28	0.11	1.25	0.06	2.93	0.08
55	2.29	0.11	1.26	0.06	2.93	0.08
56	2.29	0.11	1.26	0.06	2.92	0.08
57	2.31	0.11	1.26	0.06	2.93	0.08
58	2.30	0.11	1.26	0.06	2.93	0.08
59	2.31	0.11	1.26	0.06	2.92	0.08
60	2.31	0.12	1.27	0.06	2.93	0.08
61	2.32	0.12	1.26	0.06	2.93	0.08
62	2.32	0.12	1.27	0.06	2.93	0.08
63	2.33	0.13	1.27	0.06	2.92	0.09
64	2.33	0.12	1.28	0.06	2.92	0.08
65	2.34	0.13	1.28	0.06	2.93	0.08
66	2.34	0.13	1.28	0.06	2.93	0.09
67	2.35	0.13	1.28	0.06	2.93	0.08
68	2.35	0.13	1.29	0.06	2.92	0.08
69	2.35	0.14	1.29	0.06	2.92	0.09
70	2.36	0.14	1.29	0.06	2.92	0.09
71	2.35	0.14	1.29	0.06	2.90	0.09
72	2.36	0.14	1.29	0.06	2.90	0.09

As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inóculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo D

Tabela 12 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* FT013C em YPD, YPM e mosto cervejeiro

Tempo (h)	YPD		YPM		Mosto	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	-0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02
2	0.00	0.02	-0.06	0.00	0.03	0.02
3	0.09	0.02	-0.10	0.01	0.14	0.03
4	0.26	0.02	-0.08	0.02	0.33	0.02
5	0.54	0.03	-0.05	0.01	0.58	0.03
6	0.87	0.04	0.00	0.02	0.88	0.03
7	1.07	0.03	0.06	0.02	1.18	0.05
8	1.17	0.02	0.16	0.02	1.44	0.05
9	1.25	0.02	0.26	0.02	1.66	0.06
10	1.28	0.04	0.36	0.02	1.84	0.07
11	1.30	0.04	0.45	0.03	1.97	0.07
12	1.35	0.03	0.54	0.03	2.07	0.07
13	1.41	0.03	0.63	0.03	2.15	0.07
14	1.46	0.03	0.71	0.03	2.20	0.08
15	1.50	0.02	0.79	0.04	2.25	0.08
16	1.53	0.02	0.87	0.05	2.30	0.08
17	1.57	0.02	0.93	0.05	2.33	0.07
18	1.59	0.02	1.00	0.05	2.36	0.07
19	1.60	0.02	1.05	0.05	2.39	0.07
20	1.61	0.02	1.10	0.05	2.41	0.07
21	1.63	0.02	1.13	0.05	2.44	0.07
22	1.64	0.02	1.16	0.05	2.47	0.07
23	1.64	0.02	1.18	0.04	2.49	0.06
24	1.65	0.01	1.21	0.04	2.52	0.06
25	1.67	0.01	1.22	0.04	2.54	0.06
26	1.67	0.02	1.23	0.04	2.58	0.06
27	1.68	0.01	1.25	0.04	2.60	0.05
28	1.68	0.02	1.25	0.04	2.62	0.05
29	1.69	0.02	1.26	0.04	2.65	0.05
30	1.70	0.01	1.27	0.04	2.68	0.05
31	1.71	0.01	1.28	0.04	2.70	0.05
32	1.71	0.01	1.28	0.04	2.72	0.05
33	1.71	0.02	1.29	0.04	2.74	0.05
34	1.72	0.01	1.29	0.04	2.76	0.05
35	1.73	0.02	1.30	0.04	2.79	0.05
36	1.74	0.02	1.30	0.04	2.82	0.05
37	1.75	0.02	1.31	0.04	2.84	0.06
38	1.75	0.01	1.31	0.04	2.85	0.06
39	1.76	0.02	1.32	0.04	2.87	0.06
40	1.76	0.02	1.32	0.04	2.88	0.06
41	1.78	0.02	1.32	0.04	2.89	0.06
42	1.78	0.02	1.32	0.04	2.91	0.07
43	1.78	0.02	1.33	0.04	2.92	0.07
44	1.80	0.02	1.33	0.04	2.92	0.08
45	1.81	0.02	1.33	0.04	2.93	0.08

46	1.81	0.02	1.33	0.04	2.95	0.08
47	1.81	0.02	1.34	0.04	2.95	0.08
48	1.82	0.02	1.35	0.03	2.96	0.08
49	1.83	0.02	1.35	0.03	2.97	0.08
50	1.83	0.02	1.34	0.04	2.98	0.08
51	1.84	0.02	1.34	0.04	2.99	0.08
52	1.85	0.02	1.34	0.03	2.99	0.08
53	1.85	0.02	1.36	0.04	3.00	0.08
54	1.86	0.02	1.35	0.04	3.01	0.08
55	1.87	0.02	1.36	0.04	3.02	0.08
56	1.87	0.02	1.36	0.04	3.01	0.08
57	1.88	0.02	1.36	0.03	3.02	0.08
58	1.89	0.02	1.36	0.03	3.02	0.07
59	1.89	0.02	1.36	0.03	3.03	0.07
60	1.90	0.02	1.37	0.04	3.03	0.07
61	1.90	0.02	1.37	0.04	3.05	0.07
62	1.91	0.02	1.37	0.04	3.05	0.07
63	1.91	0.03	1.37	0.04	3.05	0.07
64	1.92	0.03	1.38	0.04	3.05	0.07
65	1.92	0.03	1.38	0.03	3.06	0.07
66	1.93	0.03	1.38	0.04	3.06	0.08
67	1.94	0.03	1.39	0.04	3.06	0.08
68	1.95	0.03	1.39	0.04	3.06	0.08
69	1.95	0.03	1.39	0.03	3.07	0.09
70	1.96	0.03	1.39	0.04	3.07	0.09
71	1.96	0.04	1.39	0.03	3.07	0.09
72	1.96	0.04	1.40	0.04	3.08	0.11

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo E

Tabela 13 - Crescimento celular de *Brettanomyces anomalus* WLP640 em diferentes fontes de carbono.

Tempo (h)	Glicose		Frutose		Sacarose		Maltose		Maltotriose		Melibiose		Celobiose		Xilose	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.09	0.03	0.05	0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.06	0.01	0.03	0.06	0.03	0.02	0.06
2	0.11	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	-0.02	0.03	0.00	0.10	0.00	0.05	0.07	0.06	0.01	0.09
3	0.14	0.07	0.06	0.02	0.04	0.02	-0.01	0.04	0.01	0.13	-0.01	0.07	0.09	0.07	0.01	0.11
4	0.17	0.07	0.08	0.02	0.06	0.03	0.00	0.03	0.02	0.14	0.00	0.07	0.11	0.08	0.02	0.12
5	0.19	0.07	0.09	0.02	0.08	0.03	0.01	0.03	0.03	0.15	0.01	0.08	0.14	0.08	0.02	0.12
6	0.22	0.08	0.14	0.03	0.10	0.05	0.04	0.02	0.06	0.16	0.03	0.07	0.16	0.08	0.04	0.13
7	0.25	0.08	0.17	0.03	0.14	0.05	0.06	0.02	0.08	0.17	0.04	0.08	0.19	0.08	0.05	0.14
8	0.29	0.08	0.20	0.03	0.16	0.06	0.08	0.02	0.10	0.17	0.05	0.08	0.22	0.08	0.05	0.14
9	0.33	0.07	0.25	0.02	0.21	0.07	0.11	0.02	0.13	0.17	0.07	0.08	0.25	0.08	0.07	0.15
10	0.38	0.07	0.29	0.02	0.24	0.07	0.13	0.02	0.16	0.18	0.08	0.08	0.28	0.08	0.08	0.15
11	0.43	0.08	0.35	0.02	0.29	0.07	0.16	0.02	0.20	0.17	0.10	0.08	0.32	0.08	0.08	0.16
12	0.50	0.08	0.42	0.03	0.34	0.08	0.19	0.03	0.24	0.18	0.12	0.08	0.36	0.08	0.10	0.16
13	0.58	0.08	0.49	0.05	0.41	0.08	0.23	0.03	0.29	0.18	0.13	0.09	0.40	0.07	0.10	0.16
14	0.66	0.09	0.58	0.06	0.47	0.08	0.27	0.03	0.34	0.18	0.15	0.09	0.44	0.07	0.11	0.16
15	0.76	0.10	0.69	0.08	0.55	0.09	0.32	0.04	0.39	0.18	0.16	0.09	0.50	0.07	0.12	0.17
16	0.87	0.11	0.80	0.10	0.63	0.09	0.35	0.04	0.44	0.18	0.18	0.10	0.53	0.07	0.12	0.17
17	0.99	0.12	0.93	0.12	0.72	0.10	0.40	0.04	0.50	0.18	0.20	0.10	0.58	0.07	0.13	0.16
18	1.11	0.13	1.07	0.13	0.82	0.10	0.46	0.05	0.57	0.18	0.22	0.10	0.64	0.07	0.15	0.17
19	1.25	0.14	1.22	0.15	0.91	0.10	0.50	0.05	0.63	0.18	0.23	0.11	0.68	0.08	0.15	0.17
20	1.41	0.15	1.38	0.17	1.02	0.11	0.55	0.05	0.69	0.18	0.25	0.11	0.73	0.08	0.16	0.17
21	1.57	0.16	1.55	0.19	1.14	0.11	0.59	0.05	0.75	0.18	0.27	0.11	0.79	0.08	0.17	0.17
22	1.75	0.17	1.74	0.22	1.24	0.12	0.64	0.06	0.82	0.18	0.29	0.11	0.84	0.08	0.18	0.17
23	1.95	0.18	1.93	0.25	1.37	0.13	0.70	0.06	0.89	0.17	0.31	0.11	0.89	0.08	0.20	0.17
24	2.15	0.20	2.14	0.28	1.48	0.13	0.75	0.07	0.95	0.17	0.33	0.11	0.95	0.09	0.20	0.18
25	2.36	0.21	2.36	0.31	1.60	0.14	0.81	0.08	1.02	0.17	0.36	0.11	1.00	0.09	0.21	0.19
26	2.57	0.23	2.58	0.34	1.74	0.15	0.85	0.07	1.08	0.17	0.38	0.11	1.07	0.09	0.22	0.19

27	2.80	0.24	2.80	0.38	1.86	0.16	0.91	0.08	1.14	0.17	0.40	0.12	1.12	0.10	0.23	0.19
28	3.03	0.26	3.03	0.41	2.00	0.16	0.96	0.08	1.19	0.17	0.41	0.12	1.19	0.10	0.24	0.19
29	3.27	0.27	3.27	0.46	2.13	0.17	1.01	0.09	1.26	0.17	0.44	0.12	1.24	0.10	0.25	0.20
30	3.51	0.28	3.51	0.49	2.27	0.18	1.07	0.09	1.32	0.17	0.46	0.12	1.30	0.10	0.26	0.19
31	3.74	0.29	3.75	0.53	2.40	0.18	1.12	0.10	1.37	0.17	0.48	0.12	1.36	0.10	0.26	0.20
32	3.98	0.30	3.99	0.57	2.54	0.19	1.18	0.10	1.43	0.18	0.50	0.12	1.42	0.11	0.27	0.20
33	4.21	0.31	4.23	0.60	2.68	0.20	1.23	0.11	1.49	0.18	0.52	0.12	1.49	0.11	0.29	0.20
34	4.44	0.31	4.46	0.62	2.82	0.21	1.28	0.11	1.55	0.18	0.54	0.12	1.55	0.12	0.30	0.20
35	4.67	0.32	4.69	0.64	2.96	0.21	1.35	0.12	1.61	0.19	0.56	0.13	1.62	0.12	0.31	0.21
36	4.87	0.32	4.91	0.66	3.10	0.21	1.42	0.12	1.67	0.19	0.57	0.12	1.68	0.13	0.33	0.21
37	5.08	0.33	5.12	0.67	3.24	0.22	1.49	0.13	1.73	0.20	0.60	0.12	1.75	0.13	0.34	0.21
38	5.29	0.33	5.33	0.69	3.37	0.22	1.54	0.13	1.79	0.20	0.62	0.12	1.82	0.14	0.35	0.21
39	5.49	0.33	5.53	0.70	3.51	0.22	1.60	0.14	1.86	0.21	0.64	0.12	1.88	0.14	0.35	0.21
40	5.67	0.33	5.72	0.70	3.64	0.22	1.67	0.15	1.92	0.21	0.65	0.12	1.95	0.15	0.37	0.21
41	5.84	0.32	5.89	0.70	3.77	0.22	1.73	0.15	1.98	0.22	0.67	0.13	2.02	0.16	0.38	0.21
42	6.01	0.32	6.05	0.70	3.90	0.22	1.80	0.16	2.05	0.23	0.70	0.13	2.09	0.16	0.39	0.21
43	6.16	0.32	6.22	0.73	4.03	0.22	1.87	0.17	2.12	0.23	0.71	0.13	2.16	0.17	0.40	0.21
44	6.31	0.31	6.39	0.75	4.15	0.22	1.95	0.17	2.19	0.24	0.73	0.13	2.23	0.18	0.42	0.21
45	6.44	0.31	6.51	0.72	4.27	0.22	2.02	0.18	2.26	0.25	0.75	0.13	2.31	0.18	0.43	0.22
46	6.57	0.30	6.61	0.63	4.39	0.22	2.08	0.19	2.33	0.25	0.77	0.13	2.38	0.20	0.44	0.22
47	6.69	0.28	6.69	0.55	4.51	0.21	2.15	0.19	2.40	0.26	0.78	0.13	2.45	0.20	0.45	0.22
48	6.81	0.30	6.74	0.50	4.62	0.21	2.21	0.20	2.46	0.27	0.79	0.13	2.53	0.21	0.46	0.22
49	6.99	0.34	6.77	0.49	4.73	0.20	2.29	0.21	2.54	0.27	0.81	0.13	2.60	0.22	0.48	0.22
50	7.17	0.35	6.82	0.50	4.84	0.19	2.35	0.21	2.61	0.29	0.83	0.13	2.68	0.23	0.49	0.22
51	7.30	0.32	6.88	0.51	4.94	0.19	2.42	0.21	2.67	0.29	0.85	0.13	2.75	0.23	0.50	0.22
52	7.39	0.28	6.97	0.52	5.03	0.17	2.49	0.22	2.74	0.30	0.87	0.13	2.82	0.24	0.51	0.22
53	7.44	0.26	7.06	0.53	5.13	0.16	2.57	0.22	2.81	0.31	0.88	0.13	2.89	0.25	0.52	0.22
54	7.45	0.25	7.13	0.51	5.21	0.15	2.64	0.22	2.88	0.31	0.90	0.13	2.96	0.26	0.53	0.22
55	7.47	0.25	7.20	0.51	5.30	0.14	2.71	0.22	2.95	0.32	0.91	0.13	3.03	0.26	0.54	0.22
56	7.48	0.25	7.25	0.50	5.38	0.13	2.79	0.22	3.03	0.33	0.94	0.13	3.10	0.27	0.55	0.23
57	7.49	0.25	7.29	0.49	5.45	0.12	2.86	0.21	3.11	0.33	0.94	0.13	3.17	0.28	0.56	0.23
58	7.50	0.25	7.33	0.48	5.53	0.11	2.94	0.20	3.18	0.34	0.96	0.12	3.24	0.29	0.58	0.23
59	7.52	0.24	7.35	0.47	5.60	0.11	3.02	0.18	3.25	0.34	0.98	0.12	3.31	0.29	0.58	0.23

60	7.53	0.25	7.38	0.47	5.66	0.10	3.09	0.18	3.33	0.35	0.98	0.13	3.37	0.30	0.59	0.23
61	7.53	0.24	7.40	0.47	5.71	0.10	3.18	0.16	3.41	0.35	1.00	0.12	3.44	0.31	0.61	0.23
62	7.56	0.24	7.41	0.47	5.77	0.09	3.26	0.16	3.49	0.35	1.01	0.13	3.50	0.31	0.61	0.23
63	7.57	0.23	7.42	0.48	5.84	0.09	3.34	0.16	3.57	0.37	1.03	0.13	3.57	0.31	0.62	0.23
64	7.59	0.22	7.42	0.49	5.89	0.08	3.42	0.15	3.64	0.37	1.05	0.12	3.63	0.32	0.64	0.23
65	7.61	0.21	7.43	0.49	5.94	0.08	3.50	0.15	3.72	0.36	1.06	0.12	3.71	0.32	0.64	0.23
66	7.62	0.21	7.44	0.49	5.99	0.08	3.58	0.15	3.79	0.37	1.08	0.12	3.77	0.32	0.65	0.24
67	7.63	0.22	7.45	0.50	6.04	0.08	3.65	0.15	3.87	0.36	1.09	0.12	3.83	0.33	0.66	0.23
68	7.64	0.21	7.46	0.51	6.08	0.09	3.74	0.15	3.95	0.37	1.11	0.11	3.89	0.33	0.67	0.24
69	7.65	0.21	7.48	0.50	6.12	0.09	3.82	0.16	4.01	0.37	1.12	0.12	3.96	0.34	0.68	0.24
70	7.66	0.22	7.48	0.51	6.15	0.09	3.91	0.16	4.10	0.38	1.14	0.13	4.02	0.34	0.70	0.24
71	7.67	0.21	7.49	0.51	6.19	0.09	3.98	0.16	4.18	0.39	1.15	0.12	4.08	0.34	0.71	0.24
72	7.67	0.21	7.49	0.52	6.23	0.09	4.06	0.17	4.25	0.39	1.17	0.12	4.16	0.32	0.72	0.24

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado

Tabela 14 - Crescimento celular de *Torulaspora delbrueckii* WLP603 em diferentes fontes de carbono

Tempo (h)	Glicose		Frutose		Sacarose		Maltose		Maltotriose		Melibiose		Celobiose		Xilose	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.15	0.05	0.11	0.04	0.07	0.05	0.09	0.04	0.13	0.05	0.11	0.04	0.10	0.03	0.08	0.03
2	0.23	0.07	0.20	0.05	0.13	0.06	0.08	0.03	0.15	0.04	0.12	0.03	0.11	0.04	0.08	0.02
3	0.35	0.11	0.31	0.06	0.23	0.07	0.08	0.04	0.16	0.05	0.11	0.04	0.13	0.05	0.08	0.03
4	0.53	0.16	0.48	0.07	0.40	0.08	0.09	0.05	0.19	0.06	0.10	0.06	0.14	0.05	0.07	0.03
5	0.79	0.19	0.72	0.08	0.62	0.09	0.09	0.06	0.21	0.07	0.10	0.07	0.16	0.06	0.08	0.04
6	1.14	0.21	1.06	0.09	0.94	0.10	0.10	0.07	0.22	0.08	0.10	0.09	0.16	0.06	0.07	0.04
7	1.60	0.21	1.50	0.09	1.37	0.10	0.12	0.07	0.24	0.09	0.10	0.10	0.18	0.06	0.08	0.05
8	2.15	0.23	2.01	0.10	1.93	0.13	0.12	0.07	0.26	0.09	0.09	0.10	0.19	0.06	0.08	0.05
9	2.75	0.23	2.64	0.09	2.62	0.14	0.14	0.07	0.29	0.11	0.10	0.11	0.20	0.06	0.10	0.05
10	3.37	0.22	3.28	0.11	3.32	0.14	0.14	0.08	0.32	0.12	0.09	0.12	0.21	0.06	0.11	0.06
11	3.96	0.23	3.90	0.14	3.94	0.15	0.15	0.08	0.34	0.13	0.10	0.13	0.21	0.07	0.11	0.06
12	4.47	0.24	4.46	0.17	4.40	0.18	0.15	0.08	0.36	0.13	0.11	0.13	0.23	0.07	0.13	0.05
13	4.88	0.24	4.90	0.19	4.73	0.20	0.15	0.09	0.38	0.13	0.11	0.13	0.23	0.08	0.14	0.06
14	5.20	0.24	5.26	0.20	4.94	0.22	0.16	0.09	0.39	0.14	0.12	0.14	0.24	0.08	0.15	0.06
15	5.43	0.24	5.53	0.21	5.06	0.24	0.16	0.09	0.40	0.15	0.12	0.15	0.26	0.09	0.16	0.07
16	5.55	0.23	5.72	0.22	5.10	0.25	0.15	0.10	0.40	0.15	0.13	0.16	0.26	0.09	0.17	0.06
17	5.54	0.24	5.84	0.23	5.08	0.25	0.16	0.11	0.41	0.16	0.14	0.16	0.28	0.09	0.19	0.06
18	5.40	0.29	5.91	0.25	5.05	0.25	0.16	0.11	0.41	0.17	0.15	0.17	0.29	0.10	0.21	0.07
19	5.24	0.32	5.94	0.26	5.03	0.25	0.15	0.12	0.41	0.18	0.14	0.18	0.30	0.11	0.22	0.07
20	5.14	0.34	5.91	0.28	5.02	0.25	0.16	0.12	0.42	0.19	0.15	0.18	0.31	0.11	0.23	0.07
21	5.07	0.33	5.88	0.28	5.01	0.24	0.14	0.13	0.42	0.19	0.15	0.19	0.32	0.11	0.25	0.07
22	5.01	0.31	5.84	0.30	5.00	0.24	0.15	0.13	0.43	0.19	0.17	0.19	0.34	0.11	0.26	0.07
23	4.97	0.29	5.81	0.31	4.99	0.24	0.15	0.13	0.43	0.20	0.16	0.21	0.35	0.12	0.28	0.08
24	4.94	0.28	5.78	0.32	4.99	0.25	0.16	0.14	0.45	0.20	0.17	0.22	0.37	0.12	0.30	0.09
25	4.91	0.27	5.75	0.35	4.98	0.25	0.17	0.15	0.46	0.21	0.18	0.23	0.38	0.13	0.32	0.09

26	4.89	0.27	5.72	0.37	4.99	0.25	0.16	0.15	0.47	0.21	0.18	0.24	0.40	0.13	0.33	0.10
27	4.87	0.27	5.68	0.40	4.98	0.25	0.18	0.15	0.49	0.21	0.20	0.24	0.42	0.13	0.36	0.10
28	4.85	0.27	5.65	0.42	4.99	0.25	0.17	0.15	0.49	0.21	0.19	0.24	0.43	0.13	0.38	0.11
29	4.83	0.27	5.64	0.44	4.99	0.25	0.18	0.15	0.52	0.21	0.21	0.25	0.45	0.14	0.40	0.11
30	4.82	0.26	5.62	0.45	4.99	0.25	0.20	0.15	0.53	0.21	0.22	0.25	0.47	0.14	0.42	0.11
31	4.80	0.27	5.60	0.46	5.00	0.25	0.20	0.16	0.54	0.21	0.22	0.25	0.48	0.14	0.44	0.11
32	4.80	0.27	5.58	0.46	5.01	0.25	0.21	0.16	0.56	0.21	0.23	0.26	0.50	0.14	0.47	0.11
33	4.78	0.26	5.56	0.47	5.01	0.25	0.23	0.16	0.58	0.21	0.25	0.25	0.52	0.14	0.49	0.11
34	4.77	0.26	5.54	0.48	5.02	0.25	0.23	0.16	0.60	0.22	0.26	0.26	0.53	0.15	0.51	0.12
35	4.76	0.26	5.51	0.49	5.02	0.26	0.25	0.17	0.61	0.22	0.26	0.27	0.55	0.15	0.54	0.12
36	4.75	0.26	5.50	0.50	5.03	0.26	0.28	0.17	0.63	0.21	0.27	0.26	0.56	0.15	0.57	0.12
37	4.74	0.26	5.47	0.52	5.04	0.26	0.29	0.17	0.65	0.21	0.28	0.27	0.58	0.15	0.59	0.12
38	4.73	0.27	5.45	0.53	5.05	0.26	0.30	0.17	0.66	0.22	0.29	0.27	0.60	0.16	0.61	0.12
39	4.72	0.26	5.43	0.53	5.06	0.26	0.31	0.17	0.68	0.22	0.30	0.27	0.61	0.16	0.62	0.12
40	4.71	0.27	5.40	0.53	5.06	0.26	0.33	0.18	0.69	0.21	0.32	0.27	0.62	0.16	0.65	0.12
41	4.70	0.27	5.39	0.53	5.08	0.26	0.35	0.18	0.71	0.22	0.33	0.28	0.64	0.16	0.67	0.11
42	4.69	0.27	5.38	0.53	5.09	0.26	0.36	0.18	0.73	0.22	0.35	0.27	0.66	0.16	0.70	0.11
43	4.68	0.28	5.36	0.53	5.10	0.26	0.38	0.19	0.74	0.22	0.36	0.28	0.67	0.17	0.72	0.11
44	4.68	0.28	5.34	0.53	5.11	0.26	0.40	0.19	0.75	0.22	0.37	0.29	0.68	0.17	0.74	0.11
45	4.67	0.28	5.33	0.53	5.12	0.27	0.41	0.20	0.77	0.23	0.38	0.29	0.70	0.17	0.77	0.12
46	4.65	0.28	5.31	0.53	5.13	0.27	0.42	0.20	0.78	0.22	0.40	0.29	0.71	0.17	0.79	0.11
47	4.65	0.29	5.31	0.53	5.14	0.27	0.43	0.21	0.80	0.23	0.41	0.29	0.72	0.18	0.81	0.12
48	4.64	0.29	5.30	0.52	5.15	0.27	0.45	0.20	0.81	0.22	0.41	0.29	0.74	0.18	0.83	0.12
49	4.62	0.30	5.29	0.52	5.16	0.27	0.46	0.21	0.82	0.22	0.43	0.29	0.76	0.18	0.86	0.12
50	4.62	0.31	5.29	0.52	5.17	0.27	0.48	0.21	0.83	0.23	0.44	0.29	0.77	0.18	0.89	0.12
51	4.61	0.31	5.28	0.52	5.19	0.27	0.49	0.22	0.84	0.23	0.45	0.30	0.79	0.19	0.91	0.11
52	4.60	0.31	5.28	0.50	5.20	0.28	0.50	0.22	0.85	0.23	0.47	0.30	0.80	0.18	0.93	0.11
53	4.60	0.31	5.27	0.50	5.21	0.28	0.51	0.23	0.85	0.23	0.48	0.30	0.81	0.19	0.95	0.12
54	4.58	0.32	5.25	0.48	5.22	0.28	0.52	0.23	0.87	0.23	0.50	0.30	0.82	0.19	0.98	0.12
55	4.58	0.33	5.24	0.47	5.24	0.28	0.54	0.23	0.87	0.22	0.51	0.30	0.84	0.19	1.00	0.12
56	4.57	0.33	5.24	0.45	5.25	0.29	0.54	0.24	0.88	0.23	0.52	0.30	0.84	0.19	1.03	0.12
57	4.56	0.33	5.22	0.42	5.26	0.28	0.56	0.24	0.90	0.23	0.53	0.30	0.86	0.19	1.05	0.12
58	4.56	0.33	5.22	0.42	5.27	0.29	0.57	0.24	0.91	0.22	0.55	0.30	0.87	0.19	1.08	0.12

59	4.55	0.34	5.21	0.40	5.29	0.29	0.58	0.25	0.92	0.23	0.56	0.30	0.88	0.19	1.11	0.12
60	4.54	0.34	5.21	0.39	5.30	0.29	0.59	0.25	0.94	0.23	0.57	0.31	0.89	0.19	1.13	0.12
61	4.52	0.35	5.20	0.38	5.30	0.29	0.60	0.25	0.95	0.23	0.59	0.31	0.90	0.19	1.16	0.12
62	4.52	0.35	5.20	0.37	5.31	0.29	0.61	0.26	0.96	0.23	0.60	0.31	0.91	0.20	1.18	0.12
63	4.50	0.35	5.19	0.36	5.32	0.29	0.63	0.27	0.97	0.23	0.61	0.31	0.92	0.20	1.20	0.13
64	4.48	0.36	5.18	0.36	5.33	0.29	0.63	0.27	0.98	0.23	0.62	0.31	0.93	0.20	1.23	0.13
65	4.47	0.36	5.17	0.36	5.34	0.29	0.63	0.27	0.99	0.23	0.63	0.31	0.95	0.20	1.25	0.13
66	4.44	0.37	5.18	0.36	5.35	0.29	0.65	0.28	0.99	0.23	0.65	0.31	0.95	0.20	1.27	0.13
67	4.43	0.38	5.16	0.35	5.36	0.29	0.66	0.28	1.01	0.23	0.66	0.31	0.97	0.20	1.30	0.14
68	4.41	0.38	5.15	0.36	5.37	0.29	0.66	0.28	1.02	0.23	0.67	0.32	0.97	0.20	1.32	0.14
69	4.38	0.39	5.15	0.36	5.38	0.29	0.69	0.28	1.02	0.23	0.68	0.31	0.99	0.20	1.35	0.14
70	4.37	0.39	5.15	0.36	5.38	0.29	0.69	0.29	1.04	0.24	0.70	0.32	0.99	0.20	1.38	0.14
71	4.34	0.40	5.13	0.37	5.39	0.30	0.70	0.29	1.05	0.23	0.71	0.31	1.00	0.20	1.40	0.14
72	4.32	0.41	5.12	0.38	5.40	0.30	0.71	0.29	1.06	0.23	0.73	0.31	1.02	0.20	1.43	0.15

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo G

Tabela 15 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (S-33) em diferentes fontes de carbono

Tempo (h)	S-33 - <i>S. cerevisiae</i>															
	Glicose		Frutose		Sacarose		Maltose		Maltotriose		Melibiose		Celobiose		Xilose	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.15	0.06	0.09	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.06	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.01	0.03
2	0.29	0.06	0.18	0.05	0.14	0.04	0.11	0.03	0.08	0.04	0.02	0.04	0.04	0.04	0.00	0.04
3	0.49	0.09	0.34	0.03	0.31	0.04	0.23	0.03	0.13	0.03	0.02	0.04	0.07	0.05	0.00	0.04
4	0.75	0.13	0.59	0.02	0.56	0.05	0.39	0.03	0.17	0.02	0.03	0.05	0.09	0.05	0.00	0.05
5	1.14	0.16	0.92	0.03	0.90	0.06	0.62	0.04	0.22	0.03	0.03	0.05	0.11	0.06	0.01	0.05
6	1.65	0.17	1.37	0.02	1.35	0.06	0.89	0.04	0.24	0.04	0.03	0.05	0.11	0.07	0.01	0.05
7	2.27	0.17	1.92	0.03	1.94	0.08	1.24	0.05	0.29	0.05	0.04	0.06	0.13	0.06	0.03	0.05
8	2.99	0.16	2.57	0.05	2.61	0.09	1.66	0.06	0.34	0.07	0.04	0.06	0.14	0.06	0.02	0.05
9	3.68	0.14	3.26	0.06	3.29	0.09	2.13	0.07	0.39	0.06	0.05	0.07	0.16	0.08	0.04	0.07
10	4.33	0.12	3.91	0.08	3.88	0.08	2.66	0.07	0.46	0.06	0.05	0.07	0.18	0.08	0.05	0.06
11	4.84	0.10	4.46	0.09	4.38	0.08	3.19	0.06	0.51	0.06	0.05	0.07	0.19	0.08	0.05	0.07
12	5.31	0.08	4.95	0.10	4.85	0.09	3.70	0.06	0.56	0.07	0.07	0.07	0.21	0.09	0.07	0.07
13	5.64	0.06	5.27	0.09	5.20	0.10	4.16	0.05	0.62	0.07	0.08	0.07	0.23	0.09	0.08	0.07
14	5.76	0.05	5.49	0.09	5.41	0.10	4.56	0.05	0.67	0.08	0.09	0.08	0.25	0.09	0.08	0.07
15	5.76	0.05	5.64	0.09	5.53	0.10	4.88	0.06	0.72	0.09	0.09	0.08	0.27	0.10	0.09	0.08
16	5.73	0.05	5.74	0.09	5.62	0.11	5.07	0.08	0.77	0.09	0.10	0.08	0.28	0.10	0.10	0.07
17	5.73	0.06	5.81	0.10	5.70	0.11	5.15	0.11	0.81	0.10	0.12	0.09	0.30	0.10	0.11	0.08
18	5.74	0.06	5.84	0.09	5.76	0.11	5.15	0.13	0.85	0.11	0.13	0.09	0.31	0.11	0.12	0.07
19	5.74	0.06	5.85	0.10	5.80	0.11	5.12	0.13	0.88	0.11	0.13	0.09	0.33	0.11	0.13	0.08
20	5.75	0.07	5.85	0.10	5.84	0.11	5.10	0.12	0.92	0.11	0.14	0.10	0.34	0.12	0.14	0.08
21	5.76	0.07	5.85	0.11	5.86	0.12	5.08	0.12	0.95	0.12	0.16	0.10	0.36	0.12	0.16	0.08
22	5.78	0.08	5.86	0.11	5.88	0.13	5.07	0.12	0.98	0.12	0.17	0.11	0.39	0.13	0.17	0.08
23	5.79	0.08	5.86	0.11	5.90	0.12	5.07	0.12	1.00	0.13	0.18	0.11	0.40	0.13	0.18	0.09
24	5.82	0.08	5.87	0.11	5.91	0.12	5.06	0.12	1.03	0.13	0.19	0.10	0.42	0.14	0.19	0.08
25	5.83	0.08	5.88	0.11	5.93	0.13	5.06	0.12	1.05	0.13	0.20	0.11	0.42	0.14	0.20	0.08

26	5.85	0.09	5.89	0.11	5.95	0.13	5.05	0.12	1.06	0.13	0.22	0.12	0.45	0.15	0.21	0.09
27	5.87	0.09	5.89	0.11	5.95	0.13	5.06	0.12	1.09	0.14	0.22	0.12	0.46	0.15	0.23	0.09
28	5.89	0.09	5.89	0.11	5.96	0.13	5.05	0.12	1.10	0.14	0.23	0.12	0.48	0.15	0.25	0.09
29	5.88	0.14	5.90	0.11	5.97	0.13	5.05	0.12	1.12	0.14	0.25	0.12	0.49	0.16	0.26	0.10
30	5.90	0.14	5.91	0.11	5.97	0.13	5.05	0.12	1.14	0.14	0.26	0.12	0.51	0.16	0.27	0.10
31	5.92	0.14	5.91	0.11	5.98	0.13	5.05	0.12	1.16	0.14	0.27	0.12	0.53	0.16	0.29	0.10
32	5.95	0.15	5.92	0.11	5.99	0.13	5.06	0.12	1.17	0.14	0.29	0.12	0.55	0.17	0.30	0.10
33	5.96	0.15	5.92	0.11	5.99	0.13	5.05	0.12	1.18	0.15	0.30	0.13	0.56	0.17	0.32	0.10
34	5.99	0.16	5.93	0.11	6.00	0.14	5.05	0.12	1.20	0.15	0.31	0.13	0.57	0.18	0.33	0.11
35	6.01	0.17	5.93	0.10	6.01	0.13	5.06	0.12	1.22	0.15	0.32	0.13	0.58	0.17	0.35	0.11
36	6.02	0.17	5.94	0.10	6.01	0.14	5.07	0.12	1.23	0.15	0.34	0.13	0.60	0.17	0.36	0.11
37	6.03	0.18	5.94	0.10	6.03	0.14	5.08	0.12	1.24	0.15	0.35	0.14	0.61	0.18	0.38	0.11
38	6.06	0.18	5.95	0.10	6.03	0.14	5.08	0.12	1.26	0.15	0.36	0.13	0.63	0.18	0.39	0.12
39	6.08	0.18	5.95	0.10	6.04	0.14	5.08	0.12	1.28	0.15	0.38	0.13	0.65	0.18	0.40	0.12
40	6.09	0.19	5.97	0.10	6.05	0.14	5.09	0.12	1.28	0.16	0.39	0.14	0.65	0.19	0.41	0.12
41	6.10	0.19	5.97	0.10	6.07	0.14	5.10	0.12	1.29	0.16	0.40	0.14	0.66	0.18	0.42	0.13
42	6.12	0.19	5.98	0.10	6.07	0.14	5.11	0.12	1.30	0.16	0.42	0.14	0.68	0.19	0.43	0.13
43	6.12	0.19	5.99	0.10	6.09	0.14	5.11	0.12	1.31	0.15	0.43	0.14	0.69	0.19	0.44	0.13
44	6.14	0.19	6.00	0.10	6.10	0.14	5.13	0.13	1.32	0.16	0.43	0.15	0.70	0.19	0.45	0.13
45	6.16	0.19	6.01	0.10	6.11	0.14	5.14	0.13	1.34	0.16	0.45	0.14	0.71	0.19	0.47	0.13
46	6.15	0.19	6.01	0.10	6.11	0.15	5.13	0.12	1.34	0.16	0.46	0.15	0.72	0.19	0.48	0.13
47	6.17	0.18	6.02	0.09	6.13	0.15	5.14	0.12	1.35	0.15	0.47	0.15	0.73	0.19	0.49	0.13
48	6.18	0.18	6.03	0.09	6.14	0.14	5.14	0.12	1.36	0.15	0.48	0.15	0.75	0.19	0.50	0.14
49	6.18	0.18	6.04	0.09	6.15	0.15	5.15	0.12	1.37	0.16	0.50	0.15	0.76	0.20	0.52	0.14
50	6.19	0.17	6.05	0.09	6.16	0.15	5.15	0.12	1.38	0.16	0.51	0.15	0.76	0.20	0.52	0.14
51	6.20	0.17	6.06	0.09	6.16	0.15	5.15	0.12	1.39	0.15	0.52	0.15	0.78	0.20	0.54	0.14
52	6.20	0.17	6.07	0.09	6.18	0.15	5.16	0.13	1.38	0.16	0.53	0.15	0.78	0.20	0.54	0.15
53	6.21	0.16	6.08	0.09	6.18	0.15	5.16	0.12	1.38	0.16	0.54	0.15	0.80	0.21	0.55	0.15
54	6.20	0.15	6.08	0.09	6.19	0.15	5.17	0.12	1.39	0.16	0.55	0.15	0.80	0.20	0.57	0.15
55	6.21	0.15	6.09	0.09	6.20	0.16	5.17	0.13	1.39	0.16	0.57	0.15	0.82	0.20	0.57	0.15
56	6.22	0.15	6.10	0.08	6.20	0.16	5.17	0.13	1.40	0.16	0.58	0.15	0.82	0.21	0.58	0.16
57	6.22	0.14	6.10	0.08	6.21	0.15	5.18	0.13	1.42	0.16	0.59	0.15	0.84	0.20	0.60	0.16
58	6.23	0.14	6.12	0.08	6.22	0.16	5.18	0.13	1.42	0.16	0.60	0.15	0.84	0.20	0.61	0.17

59	6.23	0.13	6.12	0.08	6.23	0.16	5.18	0.12	1.43	0.16	0.61	0.15	0.86	0.21	0.62	0.17
60	6.23	0.13	6.12	0.08	6.23	0.16	5.19	0.13	1.44	0.16	0.62	0.15	0.87	0.21	0.64	0.18
61	6.24	0.13	6.13	0.08	6.23	0.16	5.19	0.13	1.44	0.16	0.63	0.15	0.88	0.21	0.65	0.18
62	6.25	0.12	6.14	0.08	6.24	0.16	5.20	0.13	1.45	0.16	0.64	0.15	0.89	0.21	0.66	0.18
63	6.24	0.12	6.14	0.08	6.24	0.16	5.21	0.13	1.47	0.16	0.65	0.15	0.90	0.21	0.67	0.19
64	6.24	0.12	6.15	0.08	6.25	0.16	5.21	0.13	1.46	0.16	0.66	0.14	0.91	0.21	0.68	0.19
65	6.25	0.11	6.15	0.07	6.25	0.16	5.20	0.13	1.48	0.16	0.67	0.14	0.93	0.21	0.69	0.19
66	6.25	0.11	6.16	0.08	6.26	0.16	5.21	0.13	1.48	0.16	0.69	0.15	0.93	0.22	0.69	0.20
67	6.25	0.11	6.17	0.08	6.26	0.16	5.21	0.13	1.49	0.16	0.69	0.14	0.94	0.21	0.71	0.20
68	6.25	0.10	6.17	0.07	6.26	0.16	5.21	0.13	1.50	0.16	0.70	0.14	0.95	0.21	0.72	0.21
69	6.25	0.10	6.19	0.07	6.27	0.16	5.24	0.13	1.49	0.15	0.71	0.14	0.96	0.21	0.74	0.21
70	6.25	0.10	6.19	0.07	6.26	0.16	5.23	0.13	1.51	0.15	0.73	0.14	0.97	0.21	0.75	0.21
71	6.25	0.09	6.20	0.07	6.27	0.16	5.23	0.13	1.52	0.15	0.74	0.15	0.98	0.22	0.76	0.22
72	6.25	0.09	6.21	0.07	6.27	0.16	5.24	0.13	1.52	0.15	0.75	0.14	0.99	0.22	0.77	0.23

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Tabela 16 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (FT013C) em diferentes fontes de carbono

Tempo (h)	FT013C - <i>S. cerevisiae</i>															
	Glicose		Frutose		Sacaros		Maltose		Maltotriose		Melibiose		Celobiose		Xilose	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.15	0.04	0.09	0.04	0.07	0.02	0.07	0.03	0.11	0.04	0.05	0.02	0.06	0.02	0.06	0.03
2	0.28	0.05	0.17	0.03	0.17	0.02	0.13	0.03	0.15	0.04	0.07	0.02	0.10	0.01	0.08	0.03
3	0.43	0.08	0.29	0.03	0.29	0.01	0.21	0.04	0.19	0.04	0.07	0.02	0.13	0.01	0.08	0.04
4	0.66	0.12	0.46	0.02	0.47	0.02	0.32	0.05	0.22	0.05	0.06	0.03	0.15	0.02	0.09	0.04
5	0.97	0.13	0.72	0.04	0.75	0.03	0.49	0.06	0.27	0.05	0.07	0.03	0.18	0.02	0.11	0.04
6	1.41	0.13	1.08	0.07	1.11	0.02	0.66	0.06	0.30	0.05	0.09	0.03	0.19	0.02	0.12	0.04
7	1.91	0.13	1.54	0.11	1.58	0.04	0.87	0.09	0.33	0.06	0.09	0.04	0.21	0.02	0.14	0.05
8	2.34	0.11	2.10	0.10	2.10	0.05	1.15	0.10	0.39	0.06	0.11	0.04	0.23	0.02	0.15	0.05
9	2.70	0.09	2.53	0.13	2.60	0.04	1.46	0.11	0.44	0.07	0.12	0.05	0.26	0.03	0.17	0.06
10	3.03	0.07	2.90	0.17	3.02	0.04	1.80	0.10	0.51	0.06	0.13	0.06	0.27	0.04	0.19	0.06
11	3.33	0.04	3.21	0.19	3.41	0.05	2.19	0.09	0.56	0.06	0.15	0.06	0.29	0.05	0.20	0.07
12	3.62	0.04	3.49	0.23	3.74	0.06	2.50	0.09	0.62	0.07	0.17	0.07	0.32	0.05	0.22	0.07
13	3.84	0.04	3.70	0.25	4.00	0.07	2.75	0.09	0.67	0.08	0.17	0.08	0.33	0.05	0.24	0.07
14	4.02	0.04	3.88	0.28	4.20	0.08	2.95	0.08	0.71	0.09	0.18	0.08	0.35	0.06	0.25	0.07
15	4.14	0.06	4.03	0.29	4.34	0.08	3.12	0.07	0.76	0.10	0.19	0.09	0.37	0.06	0.26	0.08
16	4.20	0.08	4.15	0.30	4.45	0.09	3.24	0.07	0.80	0.11	0.20	0.09	0.38	0.07	0.27	0.08
17	4.20	0.09	4.25	0.31	4.53	0.09	3.33	0.06	0.84	0.12	0.21	0.10	0.40	0.08	0.29	0.09
18	4.18	0.10	4.33	0.32	4.60	0.09	3.40	0.06	0.89	0.12	0.23	0.10	0.43	0.08	0.31	0.09
19	4.15	0.10	4.41	0.34	4.66	0.10	3.42	0.06	0.92	0.13	0.23	0.12	0.44	0.09	0.33	0.10
20	4.12	0.10	4.47	0.35	4.71	0.11	3.43	0.05	0.97	0.14	0.23	0.13	0.46	0.09	0.34	0.10
21	4.10	0.10	4.51	0.36	4.77	0.12	3.42	0.04	1.00	0.14	0.25	0.13	0.49	0.10	0.36	0.11
22	4.08	0.10	4.55	0.36	4.81	0.12	3.40	0.04	1.04	0.14	0.27	0.14	0.52	0.11	0.37	0.12
23	4.08	0.10	4.56	0.36	4.86	0.12	3.40	0.04	1.08	0.14	0.28	0.15	0.53	0.12	0.40	0.12
24	4.08	0.11	4.57	0.35	4.88	0.12	3.39	0.04	1.12	0.14	0.30	0.16	0.56	0.11	0.41	0.12
25	4.06	0.12	4.57	0.35	4.91	0.12	3.39	0.05	1.16	0.14	0.32	0.18	0.57	0.12	0.43	0.13

26	4.05	0.13	4.55	0.35	4.94	0.13	3.37	0.05	1.20	0.14	0.34	0.18	0.61	0.12	0.45	0.13
27	4.05	0.13	4.54	0.35	4.94	0.13	3.36	0.05	1.24	0.14	0.36	0.19	0.62	0.13	0.47	0.14
28	4.02	0.15	4.52	0.35	4.95	0.13	3.35	0.05	1.27	0.14	0.38	0.20	0.66	0.13	0.50	0.14
29	4.02	0.15	4.52	0.35	4.97	0.12	3.34	0.05	1.31	0.14	0.41	0.21	0.67	0.13	0.51	0.14
30	4.00	0.16	4.51	0.35	4.97	0.13	3.33	0.06	1.34	0.14	0.42	0.23	0.69	0.14	0.53	0.15
31	3.99	0.17	4.50	0.35	4.98	0.13	3.31	0.05	1.38	0.14	0.45	0.24	0.71	0.14	0.55	0.15
32	3.97	0.18	4.49	0.35	4.99	0.13	3.32	0.05	1.41	0.14	0.48	0.24	0.74	0.15	0.57	0.16
33	3.96	0.19	4.49	0.35	4.99	0.13	3.30	0.05	1.45	0.14	0.50	0.25	0.75	0.14	0.59	0.16
34	3.95	0.20	4.48	0.35	4.99	0.13	3.29	0.05	1.49	0.14	0.53	0.25	0.77	0.14	0.61	0.16
35	3.94	0.21	4.48	0.35	4.99	0.13	3.29	0.05	1.52	0.14	0.55	0.25	0.80	0.15	0.64	0.16
36	3.92	0.22	4.48	0.35	5.00	0.13	3.30	0.05	1.56	0.14	0.57	0.26	0.82	0.15	0.66	0.16
37	3.90	0.23	4.46	0.35	5.00	0.13	3.29	0.05	1.59	0.13	0.59	0.26	0.83	0.15	0.68	0.16
38	3.88	0.24	4.46	0.36	5.00	0.14	3.28	0.04	1.63	0.14	0.62	0.26	0.86	0.15	0.70	0.17
39	3.86	0.25	4.45	0.36	5.01	0.14	3.28	0.04	1.67	0.14	0.64	0.26	0.88	0.15	0.71	0.17
40	3.84	0.26	4.44	0.36	5.00	0.14	3.28	0.04	1.69	0.13	0.66	0.26	0.89	0.15	0.73	0.16
41	3.82	0.27	4.44	0.35	5.01	0.13	3.28	0.04	1.73	0.13	0.68	0.26	0.90	0.15	0.74	0.17
42	3.79	0.28	4.43	0.36	5.00	0.13	3.28	0.04	1.76	0.13	0.70	0.25	0.92	0.15	0.77	0.16
43	3.77	0.29	4.42	0.36	5.00	0.13	3.27	0.04	1.79	0.12	0.72	0.26	0.93	0.15	0.78	0.16
44	3.75	0.31	4.41	0.36	5.00	0.13	3.27	0.04	1.83	0.12	0.74	0.26	0.95	0.15	0.80	0.16
45	3.73	0.32	4.40	0.36	4.99	0.13	3.27	0.04	1.86	0.12	0.76	0.26	0.97	0.15	0.82	0.16
46	3.70	0.33	4.39	0.36	4.99	0.13	3.26	0.05	1.88	0.12	0.77	0.26	0.97	0.15	0.83	0.16
47	3.68	0.35	4.38	0.36	4.99	0.13	3.26	0.05	1.92	0.12	0.79	0.25	0.99	0.15	0.85	0.16
48	3.66	0.35	4.37	0.37	4.99	0.13	3.25	0.05	1.95	0.12	0.80	0.26	1.00	0.15	0.85	0.16
49	3.64	0.37	4.36	0.37	4.99	0.13	3.25	0.05	1.98	0.12	0.81	0.26	1.01	0.15	0.87	0.16
50	3.62	0.38	4.35	0.37	4.98	0.13	3.24	0.04	2.01	0.12	0.84	0.26	1.03	0.15	0.89	0.16
51	3.60	0.39	4.34	0.36	4.98	0.13	3.24	0.05	2.04	0.12	0.85	0.26	1.05	0.15	0.91	0.16
52	3.58	0.41	4.34	0.37	4.99	0.13	3.23	0.05	2.06	0.11	0.86	0.26	1.05	0.15	0.91	0.16
53	3.57	0.42	4.32	0.37	4.99	0.13	3.23	0.04	2.08	0.12	0.88	0.26	1.07	0.16	0.93	0.16
54	3.54	0.43	4.31	0.37	4.99	0.14	3.22	0.04	2.11	0.11	0.89	0.26	1.07	0.15	0.94	0.16
55	3.52	0.45	4.30	0.36	4.99	0.13	3.22	0.05	2.13	0.11	0.91	0.26	1.09	0.15	0.95	0.16
56	3.51	0.46	4.30	0.36	4.99	0.13	3.21	0.05	2.16	0.11	0.93	0.26	1.10	0.16	0.96	0.15
57	3.49	0.47	4.28	0.37	4.98	0.13	3.22	0.05	2.19	0.10	0.93	0.26	1.11	0.16	0.97	0.16
58	3.47	0.49	4.27	0.37	4.98	0.13	3.21	0.05	2.21	0.10	0.95	0.26	1.12	0.16	0.98	0.16

59	3.46	0.51	4.26	0.37	4.98	0.13	3.21	0.04	2.24	0.10	0.96	0.26	1.14	0.16	0.99	0.16
60	3.44	0.52	4.25	0.36	4.98	0.13	3.20	0.05	2.27	0.10	0.97	0.26	1.14	0.16	1.00	0.15
61	3.42	0.53	4.25	0.37	4.99	0.13	3.21	0.05	2.29	0.10	0.98	0.25	1.15	0.16	1.01	0.15
62	3.41	0.55	4.23	0.37	4.98	0.14	3.20	0.05	2.32	0.09	0.99	0.26	1.17	0.16	1.02	0.15
63	3.39	0.56	4.22	0.37	4.97	0.13	3.20	0.05	2.34	0.09	1.01	0.25	1.18	0.16	1.03	0.15
64	3.37	0.58	4.21	0.37	4.98	0.13	3.19	0.05	2.36	0.09	1.02	0.25	1.18	0.16	1.03	0.15
65	3.35	0.59	4.19	0.37	4.97	0.13	3.18	0.05	2.39	0.09	1.03	0.25	1.20	0.16	1.04	0.15
66	3.33	0.61	4.19	0.38	4.97	0.13	3.18	0.05	2.41	0.09	1.05	0.25	1.20	0.16	1.05	0.15
67	3.32	0.62	4.17	0.38	4.97	0.13	3.18	0.05	2.43	0.09	1.06	0.25	1.22	0.16	1.05	0.15
68	3.30	0.63	4.17	0.38	4.97	0.13	3.18	0.05	2.46	0.08	1.07	0.25	1.22	0.16	1.06	0.15
69	3.28	0.65	4.17	0.38	4.96	0.13	3.20	0.05	2.47	0.08	1.08	0.25	1.24	0.16	1.08	0.15
70	3.27	0.66	4.16	0.38	4.96	0.13	3.19	0.05	2.51	0.08	1.10	0.24	1.25	0.16	1.09	0.15
71	3.25	0.68	4.16	0.39	4.96	0.13	3.18	0.05	2.54	0.08	1.11	0.25	1.25	0.16	1.10	0.15
72	3.23	0.69	4.15	0.39	4.95	0.12	3.18	0.05	2.55	0.08	1.12	0.25	1.27	0.17	1.11	0.15

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo I

Tabela 17 - Crescimento celular de *Brettanomyces anomalus* em meios contendo etanol e/ou lúpulo

Tempo (h)	WLP640 - <i>B. anomalus</i>															
	4% etanol		8% etanol		40ppm α -ácido		80ppm α -ácido		4% etanol + 40ppm α -ácido		4% etanol + 80ppm α -ácido		8% etanol + 40ppm α -ácido		8% etanol + 80ppm α -ácido	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.04	0.01	-0.02	0.10	0.03	0.06
2	0.06	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.06	0.01	-0.03	0.11	0.05	0.08
3	0.06	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.00	0.03	0.00	0.01	0.08	0.01	-0.03	0.11	0.05	0.10
4	0.06	0.02	0.05	0.02	0.03	0.03	0.00	0.03	0.00	0.01	0.10	0.01	-0.02	0.11	0.05	0.11
5	0.07	0.03	0.05	0.01	0.02	0.03	-0.01	0.03	-0.01	0.01	0.11	0.01	-0.02	0.12	0.06	0.13
6	0.09	0.03	0.05	0.01	0.03	0.03	-0.01	0.04	0.00	0.01	0.11	0.01	-0.02	0.11	0.06	0.13
7	0.10	0.04	0.06	0.01	0.04	0.03	-0.01	0.03	-0.01	0.01	0.12	0.01	-0.02	0.12	0.06	0.14
8	0.14	0.04	0.07	0.01	0.04	0.04	0.00	0.04	0.00	0.01	0.12	0.01	-0.01	0.12	0.07	0.14
9	0.17	0.06	0.08	0.02	0.06	0.04	-0.01	0.04	0.01	0.02	0.12	0.01	0.00	0.11	0.07	0.14
10	0.21	0.06	0.11	0.02	0.07	0.04	0.00	0.04	0.01	0.02	0.11	0.01	0.00	0.12	0.07	0.14
11	0.26	0.07	0.12	0.01	0.08	0.04	0.00	0.04	0.02	0.02	0.12	0.01	0.00	0.12	0.08	0.14
12	0.32	0.07	0.14	0.01	0.11	0.06	0.00	0.04	0.03	0.02	0.11	0.00	0.00	0.12	0.07	0.14
13	0.37	0.08	0.17	0.02	0.13	0.06	0.00	0.04	0.04	0.02	0.12	0.00	0.01	0.12	0.08	0.14
14	0.43	0.09	0.20	0.02	0.15	0.07	0.01	0.04	0.06	0.03	0.12	0.01	0.00	0.12	0.08	0.14
15	0.48	0.10	0.23	0.03	0.18	0.08	0.02	0.04	0.08	0.03	0.12	0.01	0.00	0.12	0.08	0.14
16	0.53	0.10	0.27	0.04	0.22	0.09	0.02	0.05	0.10	0.03	0.12	0.01	0.00	0.12	0.09	0.14
17	0.57	0.10	0.31	0.04	0.25	0.11	0.02	0.05	0.13	0.04	0.12	0.01	0.01	0.12	0.09	0.14
18	0.61	0.11	0.36	0.06	0.29	0.13	0.03	0.05	0.17	0.03	0.12	0.01	0.01	0.12	0.09	0.14
19	0.65	0.12	0.40	0.07	0.32	0.14	0.04	0.05	0.20	0.03	0.12	0.01	0.01	0.12	0.10	0.14
20	0.68	0.13	0.44	0.08	0.36	0.16	0.04	0.06	0.24	0.03	0.12	0.01	0.01	0.12	0.09	0.14
21	0.72	0.14	0.49	0.09	0.38	0.17	0.06	0.07	0.28	0.03	0.13	0.01	0.02	0.12	0.10	0.14
22	0.75	0.15	0.53	0.10	0.41	0.18	0.06	0.07	0.32	0.03	0.13	0.02	0.02	0.12	0.10	0.14
23	0.79	0.16	0.57	0.10	0.43	0.19	0.07	0.08	0.36	0.03	0.13	0.02	0.02	0.12	0.11	0.14
24	0.81	0.17	0.62	0.11	0.45	0.20	0.08	0.08	0.39	0.03	0.13	0.02	0.02	0.12	0.11	0.14

25	0.85	0.18	0.66	0.12	0.47	0.21	0.10	0.09	0.42	0.03	0.14	0.02	0.02	0.12	0.11	0.14
26	0.88	0.20	0.70	0.13	0.49	0.22	0.11	0.10	0.46	0.03	0.15	0.03	0.02	0.12	0.11	0.14
27	0.91	0.21	0.75	0.13	0.51	0.22	0.13	0.12	0.48	0.03	0.16	0.03	0.03	0.11	0.12	0.14
28	0.94	0.22	0.78	0.15	0.52	0.23	0.14	0.12	0.51	0.04	0.17	0.04	0.03	0.12	0.12	0.15
29	0.98	0.24	0.82	0.16	0.55	0.24	0.16	0.13	0.54	0.04	0.18	0.05	0.03	0.12	0.12	0.15
30	1.01	0.25	0.86	0.17	0.56	0.25	0.17	0.15	0.56	0.04	0.19	0.06	0.04	0.12	0.12	0.15
31	1.04	0.27	0.90	0.18	0.58	0.26	0.19	0.16	0.58	0.05	0.19	0.07	0.04	0.12	0.12	0.15
32	1.08	0.28	0.93	0.19	0.59	0.26	0.22	0.17	0.60	0.05	0.22	0.08	0.05	0.12	0.13	0.14
33	1.11	0.28	0.97	0.20	0.61	0.27	0.23	0.19	0.62	0.05	0.23	0.10	0.05	0.12	0.13	0.15
34	1.15	0.30	1.00	0.21	0.63	0.28	0.26	0.20	0.65	0.06	0.25	0.12	0.06	0.12	0.13	0.15
35	1.18	0.32	1.04	0.22	0.64	0.29	0.28	0.21	0.66	0.06	0.27	0.14	0.06	0.12	0.13	0.15
36	1.20	0.36	1.07	0.22	0.66	0.29	0.30	0.22	0.69	0.06	0.29	0.15	0.07	0.12	0.13	0.15
37	1.22	0.40	1.10	0.24	0.68	0.30	0.31	0.23	0.71	0.07	0.31	0.17	0.08	0.12	0.13	0.15
38	1.25	0.41	1.14	0.25	0.70	0.31	0.34	0.24	0.72	0.07	0.33	0.19	0.09	0.13	0.13	0.15
39	1.29	0.43	1.18	0.26	0.71	0.31	0.36	0.24	0.75	0.07	0.36	0.20	0.10	0.13	0.14	0.15
40	1.32	0.45	1.22	0.27	0.73	0.32	0.38	0.25	0.77	0.08	0.38	0.21	0.11	0.13	0.14	0.15
41	1.35	0.46	1.25	0.29	0.75	0.33	0.39	0.25	0.78	0.08	0.39	0.22	0.12	0.14	0.14	0.15
42	1.40	0.47	1.29	0.30	0.76	0.34	0.41	0.25	0.81	0.09	0.40	0.23	0.13	0.15	0.14	0.15
43	1.43	0.49	1.33	0.32	0.78	0.35	0.43	0.26	0.83	0.09	0.43	0.24	0.15	0.15	0.14	0.15
44	1.47	0.47	1.37	0.33	0.79	0.36	0.45	0.26	0.85	0.09	0.45	0.25	0.16	0.16	0.14	0.15
45	1.52	0.47	1.42	0.35	0.80	0.36	0.47	0.25	0.87	0.10	0.47	0.25	0.18	0.17	0.15	0.15
46	1.55	0.50	1.46	0.36	0.82	0.37	0.49	0.26	0.89	0.10	0.49	0.26	0.19	0.17	0.14	0.16
47	1.59	0.48	1.50	0.38	0.83	0.38	0.51	0.25	0.91	0.10	0.50	0.27	0.21	0.18	0.15	0.15
48	1.63	0.49	1.54	0.39	0.85	0.39	0.54	0.26	0.93	0.10	0.53	0.28	0.23	0.19	0.15	0.16
49	1.69	0.49	1.58	0.41	0.87	0.40	0.56	0.26	0.95	0.11	0.55	0.29	0.26	0.20	0.16	0.16
50	1.72	0.50	1.63	0.43	0.88	0.40	0.58	0.26	0.97	0.11	0.56	0.30	0.28	0.21	0.16	0.16
51	1.77	0.49	1.67	0.45	0.91	0.41	0.60	0.27	0.99	0.12	0.58	0.30	0.30	0.22	0.16	0.16
52	1.80	0.51	1.72	0.47	0.92	0.41	0.62	0.27	1.01	0.12	0.60	0.31	0.33	0.23	0.16	0.16
53	1.83	0.51	1.76	0.49	0.93	0.42	0.63	0.28	1.03	0.12	0.61	0.31	0.34	0.24	0.16	0.16
54	1.87	0.52	1.81	0.51	0.95	0.43	0.65	0.28	1.05	0.13	0.63	0.32	0.37	0.25	0.16	0.16
55	1.92	0.51	1.85	0.53	0.97	0.44	0.67	0.29	1.08	0.13	0.64	0.33	0.39	0.25	0.17	0.16
56	1.95	0.52	1.90	0.55	0.98	0.46	0.68	0.30	1.09	0.14	0.66	0.33	0.41	0.26	0.17	0.15
57	1.99	0.54	1.96	0.57	1.00	0.46	0.69	0.31	1.12	0.15	0.67	0.33	0.44	0.26	0.18	0.16

58	2.02	0.55	2.00	0.58	1.01	0.47	0.71	0.31	1.14	0.15	0.69	0.34	0.45	0.27	0.18	0.16
59	2.06	0.56	2.05	0.60	1.03	0.47	0.72	0.32	1.16	0.15	0.70	0.34	0.48	0.27	0.18	0.16
60	2.10	0.57	2.10	0.62	1.04	0.48	0.74	0.33	1.19	0.16	0.72	0.35	0.50	0.27	0.19	0.16
61	2.13	0.60	2.15	0.64	1.06	0.49	0.74	0.33	1.21	0.17	0.73	0.35	0.51	0.27	0.19	0.16
62	2.14	0.62	2.20	0.65	1.07	0.49	0.76	0.34	1.23	0.17	0.75	0.35	0.54	0.28	0.19	0.16
63	2.15	0.66	2.25	0.67	1.09	0.50	0.77	0.35	1.26	0.18	0.76	0.36	0.56	0.28	0.20	0.16
64	2.20	0.65	2.30	0.68	1.10	0.51	0.78	0.35	1.28	0.19	0.78	0.36	0.57	0.28	0.20	0.16
65	2.23	0.68	2.35	0.70	1.12	0.52	0.79	0.36	1.30	0.19	0.79	0.35	0.59	0.28	0.21	0.15
66	2.21	0.73	2.40	0.71	1.13	0.53	0.80	0.36	1.33	0.20	0.82	0.35	0.62	0.29	0.21	0.15
67	2.25	0.74	2.45	0.72	1.15	0.53	0.81	0.36	1.35	0.20	0.84	0.35	0.63	0.29	0.22	0.15
68	2.25	0.78	2.50	0.74	1.16	0.54	0.82	0.37	1.38	0.20	0.85	0.35	0.65	0.29	0.22	0.15
69	2.29	0.79	2.55	0.75	1.18	0.54	0.84	0.38	1.40	0.21	0.88	0.35	0.67	0.29	0.24	0.15
70	2.30	0.83	2.59	0.76	1.20	0.55	0.86	0.38	1.42	0.21	0.89	0.34	0.68	0.30	0.24	0.15
71	2.26	0.90	2.64	0.78	1.22	0.55	0.87	0.39	1.44	0.22	0.92	0.34	0.70	0.30	0.25	0.15
72	2.34	0.87	2.69	0.79	1.24	0.56	0.88	0.40	1.46	0.22	0.94	0.34	0.72	0.31	0.26	0.15

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Tabela 18 - Crescimento celular de *Torulaspora delbrueckii* em meios contendo etanol e/ou lúpulo

Tempo (h)	WLP603 - <i>T. delbrueckii</i>															
	4% etanol		8% etanol		40ppm α-ácido		80ppm α-ácido		4% etanol + 40ppm α-ácido		4% etanol + 80ppm α-ácido		8% etanol + 40ppm α-ácido		8% etanol + 80ppm α-ácido	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.06	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01	0.07	0.01	0.03	0.02	0.05	0.04
2	0.11	0.01	0.05	0.03	0.07	0.04	0.06	0.02	0.06	0.01	0.13	0.01	0.05	0.03	0.08	0.04
3	0.17	0.01	0.09	0.03	0.13	0.04	0.13	0.02	0.10	0.01	0.20	0.02	0.06	0.03	0.09	0.04
4	0.22	0.01	0.12	0.04	0.19	0.05	0.19	0.02	0.15	0.02	0.26	0.02	0.07	0.02	0.09	0.05
5	0.30	0.02	0.14	0.04	0.26	0.05	0.26	0.02	0.20	0.03	0.32	0.03	0.08	0.03	0.10	0.05
6	0.40	0.02	0.18	0.04	0.33	0.02	0.32	0.04	0.25	0.03	0.37	0.03	0.10	0.03	0.09	0.05
7	0.50	0.01	0.23	0.04	0.41	0.02	0.40	0.04	0.31	0.04	0.43	0.03	0.12	0.03	0.10	0.05
8	0.61	0.02	0.28	0.04	0.46	0.02	0.47	0.06	0.38	0.05	0.48	0.03	0.13	0.03	0.11	0.06
9	0.72	0.02	0.35	0.04	0.53	0.03	0.53	0.07	0.45	0.06	0.55	0.03	0.17	0.02	0.12	0.06
10	0.80	0.03	0.43	0.05	0.58	0.03	0.59	0.08	0.51	0.06	0.60	0.03	0.18	0.03	0.12	0.06
11	0.88	0.03	0.50	0.07	0.62	0.03	0.64	0.08	0.57	0.07	0.66	0.04	0.21	0.02	0.14	0.06
12	0.95	0.04	0.58	0.09	0.66	0.04	0.67	0.08	0.61	0.07	0.71	0.04	0.23	0.03	0.13	0.06
13	1.00	0.04	0.65	0.10	0.70	0.04	0.71	0.09	0.65	0.06	0.76	0.05	0.26	0.03	0.15	0.07
14	1.06	0.04	0.72	0.12	0.72	0.03	0.74	0.09	0.68	0.07	0.79	0.05	0.29	0.03	0.16	0.07
15	1.10	0.04	0.78	0.13	0.75	0.04	0.77	0.10	0.70	0.06	0.81	0.05	0.31	0.04	0.17	0.07
16	1.14	0.05	0.83	0.14	0.77	0.04	0.79	0.09	0.72	0.07	0.84	0.05	0.34	0.04	0.19	0.07
17	1.18	0.04	0.89	0.15	0.79	0.04	0.80	0.10	0.73	0.06	0.86	0.06	0.38	0.05	0.20	0.08
18	1.21	0.04	0.93	0.16	0.81	0.03	0.82	0.09	0.75	0.06	0.87	0.06	0.40	0.05	0.22	0.08
19	1.25	0.04	0.97	0.16	0.82	0.04	0.84	0.09	0.76	0.07	0.89	0.07	0.43	0.06	0.24	0.08
20	1.28	0.05	1.00	0.17	0.84	0.03	0.85	0.10	0.77	0.07	0.89	0.07	0.46	0.06	0.25	0.08
21	1.31	0.05	1.03	0.17	0.86	0.04	0.87	0.10	0.78	0.07	0.91	0.07	0.49	0.07	0.27	0.08
22	1.34	0.05	1.06	0.18	0.87	0.04	0.88	0.11	0.78	0.07	0.91	0.08	0.50	0.07	0.29	0.09
23	1.36	0.05	1.08	0.18	0.88	0.04	0.89	0.10	0.79	0.07	0.92	0.08	0.52	0.07	0.31	0.09
24	1.39	0.05	1.11	0.19	0.89	0.04	0.91	0.11	0.80	0.07	0.93	0.08	0.54	0.08	0.34	0.10

25	1.42	0.05	1.13	0.19	0.91	0.04	0.92	0.12	0.80	0.07	0.93	0.08	0.56	0.08	0.35	0.10
26	1.44	0.05	1.15	0.20	0.93	0.04	0.94	0.12	0.81	0.07	0.94	0.09	0.57	0.08	0.37	0.11
27	1.46	0.06	1.17	0.20	0.93	0.05	0.95	0.12	0.81	0.08	0.95	0.09	0.59	0.09	0.38	0.11
28	1.49	0.05	1.19	0.21	0.95	0.04	0.96	0.12	0.82	0.08	0.95	0.09	0.59	0.08	0.40	0.11
29	1.51	0.06	1.20	0.21	0.96	0.05	0.97	0.13	0.82	0.08	0.95	0.10	0.60	0.08	0.42	0.11
30	1.53	0.06	1.22	0.22	0.97	0.05	0.98	0.13	0.83	0.08	0.96	0.10	0.62	0.09	0.44	0.11
31	1.56	0.06	1.24	0.22	0.99	0.05	0.99	0.13	0.84	0.09	0.96	0.10	0.62	0.08	0.45	0.11
32	1.57	0.06	1.25	0.23	1.00	0.05	1.01	0.14	0.84	0.09	0.97	0.10	0.63	0.08	0.47	0.12
33	1.59	0.06	1.27	0.23	1.01	0.06	1.01	0.14	0.84	0.09	0.97	0.10	0.63	0.08	0.48	0.12
34	1.61	0.06	1.28	0.24	1.03	0.06	1.03	0.14	0.85	0.09	0.98	0.10	0.64	0.08	0.50	0.12
35	1.63	0.06	1.30	0.24	1.03	0.06	1.03	0.14	0.85	0.09	0.98	0.10	0.64	0.08	0.51	0.12
36	1.65	0.06	1.31	0.24	1.05	0.06	1.05	0.15	0.86	0.09	0.99	0.10	0.65	0.07	0.52	0.12
37	1.66	0.06	1.33	0.26	1.06	0.06	1.05	0.14	0.86	0.10	0.99	0.10	0.65	0.07	0.53	0.12
38	1.68	0.06	1.34	0.26	1.08	0.06	1.06	0.15	0.87	0.10	0.99	0.10	0.66	0.07	0.54	0.11
39	1.69	0.06	1.36	0.27	1.09	0.06	1.07	0.15	0.87	0.10	1.00	0.10	0.66	0.07	0.55	0.11
40	1.70	0.06	1.37	0.27	1.10	0.07	1.08	0.15	0.88	0.10	1.01	0.11	0.66	0.07	0.55	0.11
41	1.71	0.06	1.38	0.27	1.11	0.07	1.08	0.15	0.88	0.10	1.01	0.11	0.67	0.07	0.57	0.11
42	1.73	0.06	1.40	0.27	1.12	0.07	1.10	0.16	0.88	0.10	1.01	0.11	0.67	0.07	0.57	0.11
43	1.74	0.05	1.41	0.28	1.13	0.07	1.11	0.16	0.89	0.11	1.01	0.10	0.68	0.07	0.58	0.11
44	1.75	0.06	1.42	0.29	1.14	0.07	1.12	0.16	0.89	0.11	1.02	0.10	0.68	0.08	0.58	0.11
45	1.76	0.06	1.44	0.29	1.15	0.07	1.13	0.16	0.90	0.11	1.02	0.11	0.69	0.08	0.60	0.11
46	1.77	0.05	1.45	0.29	1.16	0.07	1.14	0.16	0.91	0.11	1.03	0.11	0.69	0.08	0.60	0.11
47	1.78	0.06	1.46	0.30	1.17	0.07	1.14	0.17	0.91	0.11	1.03	0.11	0.70	0.08	0.61	0.11
48	1.79	0.06	1.48	0.30	1.18	0.07	1.15	0.17	0.91	0.11	1.04	0.11	0.70	0.08	0.62	0.11
49	1.80	0.05	1.49	0.31	1.20	0.06	1.17	0.16	0.92	0.12	1.05	0.11	0.71	0.08	0.63	0.11
50	1.81	0.05	1.50	0.31	1.20	0.07	1.18	0.16	0.93	0.11	1.05	0.11	0.70	0.07	0.64	0.11
51	1.82	0.05	1.51	0.31	1.21	0.06	1.18	0.16	0.93	0.12	1.05	0.10	0.70	0.07	0.64	0.11
52	1.83	0.05	1.53	0.31	1.22	0.06	1.19	0.17	0.93	0.12	1.06	0.11	0.71	0.07	0.65	0.11
53	1.83	0.04	1.53	0.32	1.23	0.06	1.20	0.17	0.94	0.12	1.06	0.11	0.71	0.07	0.65	0.11
54	1.85	0.04	1.54	0.32	1.25	0.06	1.21	0.17	0.95	0.12	1.07	0.11	0.72	0.08	0.65	0.11
55	1.85	0.04	1.55	0.33	1.25	0.06	1.22	0.17	0.95	0.12	1.07	0.11	0.73	0.08	0.66	0.11
56	1.85	0.03	1.56	0.33	1.27	0.06	1.23	0.16	0.95	0.13	1.08	0.11	0.73	0.08	0.67	0.11
57	1.87	0.03	1.58	0.34	1.27	0.06	1.24	0.16	0.96	0.13	1.08	0.12	0.74	0.08	0.68	0.11

58	1.87	0.03	1.58	0.34	1.28	0.05	1.24	0.17	0.97	0.13	1.09	0.11	0.74	0.08	0.69	0.11
59	1.88	0.03	1.59	0.34	1.29	0.05	1.24	0.17	0.97	0.13	1.09	0.11	0.74	0.08	0.69	0.11
60	1.89	0.03	1.60	0.35	1.30	0.05	1.26	0.17	0.98	0.13	1.10	0.11	0.74	0.08	0.70	0.11
61	1.90	0.03	1.62	0.35	1.31	0.05	1.26	0.17	0.98	0.14	1.10	0.11	0.74	0.08	0.70	0.12
62	1.91	0.03	1.62	0.35	1.32	0.05	1.27	0.17	0.99	0.13	1.10	0.11	0.74	0.08	0.70	0.11
63	1.93	0.03	1.64	0.36	1.33	0.05	1.28	0.17	0.99	0.14	1.11	0.11	0.75	0.08	0.71	0.12
64	1.93	0.03	1.65	0.36	1.33	0.06	1.28	0.17	1.00	0.14	1.12	0.11	0.75	0.08	0.71	0.11
65	1.94	0.03	1.66	0.36	1.35	0.06	1.29	0.17	1.01	0.14	1.12	0.11	0.75	0.07	0.72	0.11
66	1.96	0.04	1.68	0.37	1.36	0.05	1.30	0.17	1.01	0.14	1.12	0.11	0.76	0.08	0.72	0.11
67	1.96	0.04	1.69	0.37	1.37	0.06	1.31	0.17	1.02	0.14	1.13	0.11	0.76	0.07	0.72	0.12
68	1.97	0.04	1.70	0.38	1.37	0.05	1.30	0.17	1.03	0.14	1.13	0.11	0.76	0.07	0.73	0.11
69	1.98	0.05	1.71	0.38	1.38	0.06	1.32	0.17	1.04	0.14	1.14	0.11	0.76	0.08	0.74	0.11
70	1.99	0.05	1.73	0.39	1.40	0.05	1.33	0.18	1.04	0.14	1.15	0.11	0.77	0.07	0.74	0.12
71	1.99	0.05	1.74	0.39	1.40	0.06	1.34	0.17	1.05	0.14	1.15	0.11	0.77	0.08	0.75	0.12
72	2.01	0.05	1.75	0.40	1.41	0.06	1.34	0.17	1.05	0.14	1.16	0.11	0.78	0.08	0.75	0.12

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Anexo L

Tabela 19 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (S-33) em meios contendo etanol e/ou lúpulo

Tempo (h)	S-33 - <i>S. cerevisiae</i>															
	4% etanol		8% etanol		40ppm α -ácido		80ppm α -ácido		4% etanol + 40ppm α -ácido		4% etanol + 80ppm α -ácido		8% etanol + 40ppm α -ácido		8% etanol + 80ppm α -ácido	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.06	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.03	0.06	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04
2	0.09	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.10	0.02	0.03	0.03	0.07	0.04
3	0.14	0.02	0.05	0.02	0.08	0.01	0.08	0.02	0.04	0.02	0.15	0.02	0.04	0.03	0.08	0.05
4	0.21	0.03	0.10	0.03	0.11	0.02	0.13	0.04	0.08	0.03	0.23	0.02	0.06	0.03	0.09	0.04
5	0.33	0.03	0.15	0.04	0.15	0.01	0.15	0.03	0.12	0.04	0.29	0.02	0.07	0.03	0.11	0.05
6	0.44	0.07	0.23	0.06	0.20	0.00	0.20	0.04	0.17	0.07	0.35	0.05	0.11	0.03	0.12	0.05
7	0.53	0.11	0.32	0.08	0.27	0.01	0.26	0.06	0.22	0.08	0.42	0.09	0.16	0.03	0.14	0.05
8	0.58	0.11	0.40	0.10	0.33	0.02	0.32	0.07	0.29	0.10	0.48	0.11	0.20	0.04	0.18	0.06
9	0.62	0.09	0.47	0.10	0.39	0.03	0.39	0.07	0.35	0.11	0.56	0.14	0.27	0.06	0.22	0.07
10	0.69	0.11	0.53	0.11	0.46	0.05	0.46	0.09	0.41	0.13	0.62	0.17	0.31	0.09	0.26	0.08
11	0.76	0.11	0.61	0.12	0.53	0.06	0.55	0.09	0.48	0.13	0.70	0.19	0.37	0.12	0.31	0.10
12	0.83	0.11	0.68	0.13	0.59	0.08	0.62	0.10	0.55	0.14	0.77	0.21	0.44	0.15	0.36	0.12
13	0.88	0.12	0.75	0.14	0.66	0.09	0.69	0.11	0.61	0.16	0.84	0.23	0.51	0.19	0.40	0.16
14	0.94	0.13	0.83	0.15	0.71	0.10	0.77	0.12	0.67	0.16	0.90	0.24	0.58	0.24	0.45	0.20
15	0.99	0.13	0.90	0.15	0.76	0.11	0.83	0.12	0.73	0.16	0.96	0.24	0.67	0.29	0.50	0.24
16	1.03	0.13	0.97	0.15	0.80	0.12	0.88	0.12	0.78	0.16	1.01	0.24	0.77	0.34	0.57	0.29
17	1.07	0.13	1.04	0.16	0.84	0.12	0.92	0.13	0.82	0.16	1.06	0.24	0.87	0.41	0.64	0.34
18	1.10	0.13	1.10	0.16	0.88	0.12	0.95	0.13	0.86	0.16	1.09	0.23	0.98	0.47	0.72	0.39
19	1.13	0.13	1.14	0.16	0.90	0.13	0.97	0.14	0.90	0.15	1.12	0.22	1.09	0.54	0.81	0.44
20	1.15	0.13	1.19	0.17	0.92	0.13	1.00	0.14	0.92	0.15	1.15	0.21	1.21	0.60	0.89	0.51
21	1.17	0.13	1.22	0.18	0.93	0.13	1.03	0.13	0.95	0.15	1.17	0.21	1.32	0.66	0.99	0.57
22	1.18	0.12	1.25	0.18	0.95	0.12	1.04	0.13	0.97	0.14	1.20	0.20	1.42	0.71	1.08	0.63
23	1.19	0.13	1.27	0.18	0.96	0.13	1.04	0.14	0.99	0.14	1.21	0.20	1.49	0.75	1.16	0.68
24	1.19	0.13	1.28	0.19	0.97	0.13	1.06	0.14	1.00	0.14	1.22	0.20	1.55	0.77	1.24	0.71

25	1.20	0.13	1.30	0.20	0.98	0.12	1.06	0.14	1.01	0.14	1.23	0.20	1.59	0.77	1.29	0.73
26	1.19	0.13	1.31	0.20	0.98	0.13	1.07	0.14	1.02	0.13	1.24	0.19	1.62	0.76	1.33	0.72
27	1.19	0.13	1.32	0.20	0.98	0.12	1.07	0.13	1.02	0.13	1.25	0.19	1.62	0.76	1.36	0.71
28	1.20	0.13	1.33	0.20	0.98	0.12	1.07	0.13	1.03	0.13	1.25	0.18	1.63	0.74	1.38	0.69
29	1.20	0.13	1.33	0.21	0.99	0.12	1.08	0.14	1.04	0.13	1.25	0.18	1.64	0.73	1.40	0.66
30	1.20	0.13	1.34	0.21	0.99	0.12	1.07	0.14	1.04	0.13	1.26	0.18	1.65	0.71	1.42	0.64
31	1.20	0.13	1.34	0.20	0.99	0.12	1.08	0.14	1.04	0.12	1.26	0.18	1.64	0.70	1.43	0.61
32	1.20	0.14	1.34	0.21	0.99	0.12	1.08	0.14	1.04	0.13	1.26	0.18	1.64	0.69	1.44	0.59
33	1.20	0.14	1.35	0.21	0.99	0.13	1.07	0.14	1.04	0.13	1.26	0.18	1.65	0.68	1.45	0.56
34	1.20	0.14	1.35	0.21	1.00	0.13	1.09	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.65	0.67	1.47	0.55
35	1.20	0.14	1.35	0.21	0.99	0.12	1.08	0.14	1.04	0.13	1.26	0.17	1.65	0.66	1.47	0.53
36	1.20	0.14	1.35	0.21	1.00	0.12	1.08	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.64	0.66	1.48	0.52
37	1.20	0.14	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.14	1.05	0.12	1.27	0.17	1.65	0.64	1.48	0.50
38	1.19	0.14	1.35	0.22	1.00	0.12	1.08	0.15	1.05	0.13	1.26	0.18	1.65	0.65	1.49	0.49
39	1.19	0.14	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.64	0.64	1.50	0.48
40	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.16	1.05	0.14	1.26	0.18	1.64	0.64	1.50	0.48
41	1.19	0.14	1.35	0.21	1.00	0.13	1.07	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.64	0.64	1.51	0.46
42	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.16	1.04	0.13	1.25	0.17	1.64	0.63	1.51	0.46
43	1.20	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.64	0.63	1.51	0.46
44	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.07	0.15	1.04	0.13	1.26	0.18	1.63	0.63	1.51	0.45
45	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.16	1.04	0.14	1.26	0.18	1.63	0.63	1.52	0.45
46	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.15	1.04	0.14	1.25	0.18	1.63	0.63	1.51	0.45
47	1.19	0.15	1.35	0.21	0.99	0.13	1.08	0.16	1.04	0.13	1.26	0.18	1.63	0.63	1.52	0.44
48	1.19	0.15	1.36	0.22	0.99	0.13	1.07	0.16	1.04	0.14	1.26	0.18	1.63	0.63	1.52	0.44
49	1.19	0.15	1.36	0.21	1.00	0.13	1.08	0.16	1.04	0.14	1.25	0.18	1.63	0.62	1.52	0.44
50	1.19	0.15	1.36	0.21	0.99	0.13	1.08	0.16	1.05	0.14	1.26	0.18	1.63	0.62	1.53	0.44
51	1.19	0.16	1.36	0.21	1.00	0.13	1.08	0.15	1.05	0.13	1.26	0.18	1.62	0.62	1.52	0.44
52	1.19	0.16	1.36	0.22	0.99	0.14	1.08	0.15	1.05	0.14	1.26	0.19	1.63	0.62	1.53	0.44
53	1.19	0.16	1.36	0.22	1.00	0.14	1.09	0.16	1.04	0.14	1.25	0.19	1.62	0.62	153	0.44
54	1.20	0.16	1.36	0.22	1.00	0.14	1.09	0.16	1.04	0.14	1.26	0.18	1.62	0.61	1.53	0.43
55	1.19	0.16	1.36	0.22	1.00	0.14	1.08	0.16	1.05	0.13	1.26	0.18	1.62	0.61	1.53	0.43
56	1.19	0.16	1.37	0.22	1.00	0.14	1.08	0.16	1.04	0.14	1.26	0.18	1.62	0.61	1.53	0.43
57	1.19	0.16	1.37	0.22	1.00	0.14	1.08	0.16	1.04	0.14	1.26	0.19	1.62	0.61	1.53	0.43

58	1.19	0.16	1.37	0.22	1.00	0.14	1.08	0.16	1.05	0.14	1.26	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
59	1.20	0.17	1.37	0.22	1.00	0.14	1.08	0.17	1.05	0.14	1.26	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
60	1.19	0.16	1.37	0.22	1.00	0.14	1.09	0.17	1.05	0.14	1.25	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
61	1.20	0.17	1.38	0.21	1.00	0.14	1.08	0.16	1.04	0.14	1.25	0.19	1.62	0.61	1.54	0.42
62	1.20	0.16	1.37	0.22	1.00	0.14	1.09	0.17	1.04	0.14	1.25	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
63	1.20	0.17	1.37	0.22	1.01	0.14	1.08	0.17	1.04	0.14	1.25	0.19	1.62	0.60	1.55	0.42
64	1.20	0.17	1.38	0.21	1.00	0.14	1.08	0.17	1.04	0.14	1.25	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
65	1.19	0.17	1.37	0.22	1.01	0.14	1.08	0.17	1.05	0.14	1.25	0.19	1.62	0.61	1.54	0.43
66	1.20	0.17	1.38	0.22	1.01	0.14	1.08	0.17	1.05	0.14	1.25	0.20	1.63	0.61	1.54	0.43
67	1.19	0.17	1.38	0.22	1.01	0.14	1.08	0.18	1.04	0.14	1.25	0.20	1.63	0.61	1.55	0.43
68	1.20	0.17	1.38	0.22	1.01	0.14	1.07	0.17	1.05	0.14	1.25	0.19	1.63	0.61	1.55	0.43
69	1.20	0.17	1.38	0.22	1.00	0.14	1.08	0.18	1.06	0.15	1.25	0.20	1.63	0.61	1.55	0.43
70	1.20	0.18	1.38	0.22	1.01	0.15	1.08	0.17	1.05	0.14	1.25	0.20	1.62	0.61	1.56	0.42
71	1.20	0.18	1.38	0.22	1.01	0.15	1.08	0.18	1.05	0.15	1.25	0.20	1.63	0.60	1.55	0.42
72	1.20	0.17	1.39	0.22	1.01	0.15	1.08	0.18	1.05	0.15	1.24	0.20	1.63	0.61	1.55	0.43

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.

Tabela 20 - Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (FT013C) em meios contendo etanol e/ou lúpulo

Tempo (h)	FT013C - <i>S. cerevisiae</i>															
	4% etanol		8% etanol		40ppm α -ácido		80ppm α -ácido		4% etanol + 40ppm α -ácido		4% etanol + 80ppm α -ácido		8% etanol + 40ppm α -ácido		8% etanol + 80ppm α -ácido	
	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão	Media	Desvio padrão
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.06	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.06	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04
2	0.06	0.04	0.02	0.06	0.04	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.10	0.06	0.04	0.04	0.07	0.04
3	0.08	0.03	0.02	0.05	0.05	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03	0.13	0.06	0.02	0.05	0.07	0.05
4	0.10	0.04	0.02	0.04	0.08	0.01	0.05	0.04	0.03	0.03	0.16	0.05	0.02	0.04	0.06	0.05
5	0.15	0.04	0.03	0.04	0.12	0.01	0.10	0.05	0.07	0.03	0.21	0.06	0.03	0.05	0.08	0.05
6	0.20	0.05	0.06	0.04	0.17	0.01	0.15	0.04	0.11	0.03	0.25	0.05	0.04	0.05	0.07	0.05
7	0.25	0.06	0.09	0.03	0.23	0.02	0.22	0.04	0.18	0.04	0.32	0.06	0.06	0.04	0.08	0.05
8	0.32	0.08	0.12	0.03	0.31	0.04	0.31	0.06	0.27	0.04	0.39	0.06	0.07	0.05	0.10	0.05
9	0.38	0.11	0.15	0.05	0.40	0.05	0.40	0.07	0.38	0.05	0.48	0.06	0.10	0.05	0.11	0.05
10	0.46	0.14	0.21	0.08	0.48	0.06	0.51	0.07	0.51	0.07	0.59	0.07	0.11	0.05	0.12	0.05
11	0.54	0.16	0.28	0.12	0.57	0.07	0.62	0.08	0.67	0.08	0.72	0.07	0.15	0.07	0.15	0.06
12	0.62	0.18	0.35	0.17	0.66	0.07	0.72	0.08	0.85	0.09	0.86	0.08	0.18	0.07	0.17	0.06
13	0.69	0.21	0.44	0.22	0.74	0.08	0.83	0.09	1.05	0.11	1.02	0.09	0.22	0.09	0.20	0.07
14	0.76	0.22	0.54	0.28	0.81	0.08	0.93	0.09	1.28	0.13	1.21	0.11	0.26	0.10	0.24	0.08
15	0.82	0.23	0.64	0.34	0.88	0.08	1.02	0.09	1.50	0.14	1.41	0.12	0.31	0.12	0.28	0.10
16	0.87	0.23	0.74	0.38	0.94	0.08	1.11	0.09	1.70	0.15	1.64	0.13	0.37	0.13	0.34	0.12
17	0.91	0.23	0.83	0.42	0.99	0.08	1.16	0.10	1.84	0.17	1.87	0.16	0.44	0.16	0.40	0.17
18	0.95	0.21	0.91	0.44	1.03	0.07	1.21	0.09	1.93	0.17	2.08	0.17	0.52	0.18	0.49	0.22
19	0.99	0.20	0.96	0.45	1.06	0.07	1.24	0.09	1.97	0.17	2.24	0.17	0.60	0.22	0.60	0.29
20	1.01	0.20	1.02	0.44	1.09	0.07	1.26	0.09	1.98	0.17	2.33	0.18	0.71	0.25	0.72	0.38
21	1.04	0.19	1.06	0.43	1.11	0.07	1.28	0.09	1.99	0.17	2.39	0.17	0.83	0.29	0.87	0.47
22	1.06	0.17	1.10	0.41	1.13	0.07	1.30	0.09	1.99	0.17	2.42	0.16	0.96	0.32	1.02	0.57
23	1.08	0.17	1.13	0.39	1.13	0.06	1.29	0.08	1.99	0.17	2.43	0.16	1.09	0.36	1.19	0.65
24	1.09	0.17	1.16	0.36	1.14	0.07	1.31	0.09	1.98	0.17	2.44	0.16	1.23	0.39	1.36	0.71

25	1.09	0.16	1.19	0.34	1.15	0.07	1.31	0.09	1.97	0.17	2.44	0.17	1.36	0.39	1.50	0.73
26	1.09	0.16	1.21	0.32	1.15	0.06	1.31	0.08	1.96	0.17	2.43	0.16	1.48	0.39	1.63	0.72
27	1.10	0.16	1.23	0.29	1.14	0.06	1.30	0.09	1.96	0.17	2.43	0.16	1.58	0.36	1.74	0.68
28	1.11	0.15	1.25	0.27	1.15	0.06	1.31	0.09	1.95	0.17	2.43	0.15	1.66	0.33	1.84	0.63
29	1.11	0.15	1.26	0.25	1.15	0.06	1.32	0.08	1.95	0.17	2.42	0.15	1.73	0.30	1.93	0.57
30	1.12	0.15	1.28	0.24	1.15	0.07	1.31	0.08	1.94	0.17	2.42	0.15	1.78	0.27	1.99	0.51
31	1.12	0.14	1.29	0.22	1.16	0.06	1.31	0.08	1.94	0.16	2.41	0.15	1.81	0.24	2.05	0.47
32	1.12	0.14	1.30	0.21	1.15	0.06	1.31	0.08	1.93	0.16	2.41	0.15	1.83	0.22	2.09	0.43
33	1.12	0.15	1.31	0.21	1.15	0.06	1.30	0.08	1.93	0.17	2.40	0.16	1.85	0.21	2.11	0.41
34	1.12	0.15	1.31	0.20	1.16	0.06	1.32	0.08	1.92	0.16	2.40	0.15	1.87	0.20	2.13	0.39
35	1.12	0.14	1.32	0.19	1.15	0.06	1.31	0.08	1.92	0.16	2.39	0.15	1.87	0.20	2.15	0.38
36	1.11	0.15	1.32	0.18	1.16	0.06	1.31	0.08	1.92	0.17	2.39	0.15	1.88	0.19	2.16	0.37
37	1.11	0.14	1.32	0.17	1.15	0.06	1.30	0.08	1.91	0.16	2.39	0.15	1.89	0.19	2.17	0.37
38	1.11	0.14	1.32	0.16	1.16	0.06	1.31	0.08	1.91	0.17	2.38	0.15	1.89	0.19	2.17	0.37
39	1.11	0.14	1.33	0.16	1.15	0.06	1.31	0.07	1.91	0.16	2.38	0.15	1.89	0.18	2.18	0.36
40	1.10	0.14	1.33	0.15	1.15	0.06	1.30	0.07	1.90	0.17	2.38	0.16	1.90	0.18	2.19	0.36
41	1.10	0.14	1.33	0.15	1.15	0.07	1.30	0.07	1.89	0.16	2.37	0.15	1.90	0.17	2.19	0.35
42	1.10	0.14	1.34	0.14	1.15	0.06	1.31	0.07	1.90	0.16	2.37	0.15	1.90	0.18	2.20	0.36
43	1.10	0.14	1.34	0.14	1.15	0.06	1.30	0.07	1.89	0.16	2.37	0.15	1.90	0.18	2.20	0.36
44	1.09	0.14	1.34	0.14	1.14	0.06	1.30	0.07	1.89	0.17	2.37	0.15	1.90	0.18	2.20	0.36
45	1.08	0.15	1.34	0.13	1.14	0.07	1.30	0.06	1.89	0.17	2.36	0.16	1.91	0.17	2.21	0.36
46	1.08	0.14	1.34	0.13	1.14	0.07	1.30	0.07	1.88	0.16	2.36	0.15	1.91	0.17	2.21	0.36
47	1.07	0.15	1.34	0.12	1.14	0.07	1.30	0.06	1.88	0.17	2.35	0.16	1.90	0.17	2.21	0.36
48	1.06	0.15	1.35	0.12	1.14	0.07	1.30	0.06	1.87	0.17	2.36	0.16	1.91	0.17	2.22	0.36
49	1.06	0.14	1.35	0.11	1.14	0.07	1.30	0.06	1.87	0.16	2.35	0.15	1.91	0.17	2.22	0.36
50	1.06	0.15	1.35	0.11	1.14	0.08	1.29	0.06	1.87	0.16	2.35	0.16	1.91	0.17	2.23	0.36
51	1.05	0.14	1.35	0.10	1.14	0.08	1.29	0.05	1.87	0.16	2.35	0.16	1.90	0.17	2.23	0.36
52	1.05	0.15	1.36	0.11	1.14	0.08	1.30	0.06	1.87	0.17	2.35	0.16	1.91	0.17	2.23	0.36
53	1.05	0.16	1.35	0.10	1.14	0.09	1.30	0.06	1.87	0.17	2.35	0.16	1.91	0.17	2.24	0.37
54	1.06	0.16	.35	0.11	1.15	0.08	1.30	0.06	1.87	0.16	2.35	0.16	1.91	0.17	2.24	0.37
55	1.05	0.16	1.35	0.10	1.14	0.09	1.29	0.06	1.86	0.16	2.34	0.15	1.91	0.17	2.25	0.37
56	1.04	0.16	1.35	0.10	1.14	0.09	1.29	0.05	1.85	0.16	2.34	0.15	1.91	0.16	2.25	0.37
57	1.04	0.16	1.36	0.09	1.14	0.09	1.29	0.05	1.86	0.16	2.34	0.15	1.91	0.16	2.25	0.38

58	1.03	0.16	1.35	0.09	1.14	0.09	1.29	0.05	1.86	0.16	2.34	0.15	1.91	0.16	2.25	0.37
59	1.03	0.17	1.35	0.09	1.14	0.09	1.28	0.05	1.86	0.17	2.34	0.16	1.92	0.17	2.25	0.37
60	1.02	0.17	1.35	0.09	1.14	0.09	1.29	0.05	1.85	0.17	2.33	0.15	1.92	0.16	2.26	0.38
61	1.02	0.17	1.35	0.08	1.14	0.09	1.28	0.05	1.85	0.16	2.33	0.15	1.92	0.17	2.26	0.38
62	1.02	0.18	1.35	0.08	1.14	0.10	1.29	0.04	1.85	0.16	2.33	0.16	1.92	0.17	2.27	0.38
63	1.02	0.18	1.35	0.08	1.14	0.10	1.29	0.04	1.85	0.16	2.33	0.15	1.92	0.16	2.27	0.38
64	1.02	0.18	1.35	0.07	1.13	0.10	1.28	0.04	1.85	0.17	2.33	0.16	1.92	0.17	2.27	0.38
65	1.01	0.18	1.35	0.07	1.13	0.10	1.28	0.05	1.84	0.17	2.32	0.16	1.92	0.17	2.28	0.38
66	1.02	0.18	1.35	0.07	1.13	0.11	1.27	0.04	1.85	0.17	2.33	0.16	1.93	0.17	2.28	0.38
67	1.02	0.18	1.35	0.07	1.12	0.11	1.27	0.05	1.84	0.17	2.32	0.16	1.93	0.17	2.28	0.38
68	1.03	0.18	1.35	0.07	1.12	0.11	1.27	0.05	1.84	0.17	2.32	0.16	1.93	0.17	2.29	0.38
69	1.03	0.18	1.35	0.06	1.12	0.12	1.27	0.05	1.84	0.17	2.32	0.15	1.92	0.16	2.29	0.38
70	1.03	0.18	1.35	0.06	1.12	0.12	1.27	0.06	1.84	0.17	2.32	0.16	1.92	0.16	2.30	0.38
71	1.03	0.17	1.35	0.06	1.12	0.12	1.27	0.05	1.83	0.17	2.32	0.16	1.93	0.16	2.28	0.36
72	1.03	0.17	1.35	0.06	1.12	0.12	1.26	0.05	1.84	0.16	2.32	0.15	1.93	0.17	2.29	0.37

Obs. As nove leituras de cada poço foram somadas e da média de 4 repetições foi descontada a média das leituras do controle (duas repetições). No tratamento controle, a suspensão de células foi substituída por solução salina. Além disso, para cada tratamento descontou-se a média da primeira leitura (tempo zero) dos demais valores obtidos em cada intervalo de tempo com a finalidade de padronizar as leituras em relação ao inoculo inicial. O desvio padrão das leituras em cada intervalo de tempo também é apresentado.