

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**HAYSSA CAROLINI ALAMAR NUNES**

**LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS ISOLADAS A PARTIR DE**  
**COLMEIA DE ABELHAS SEM FERRÃO E SEU POTENCIAL**  
**FERMENTATIVO VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

**Manaus - AM**  
**2021**

HAYSSA CAROLINI ALAMAR NUNES

**LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS ISOLADAS A PARTIR DE  
COLMEIA DE ABELHAS SEM FERRÃO E SEU POTENCIAL  
FERMENTATIVO VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Tese apresentado ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS GUSTAVO NUNES DA SILVA

COORIENTADOR: PROF. DR MARTIN HASSELMANN

Manaus - AM  
2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N972l Nunes, Hayssa Carolini Alamar  
Leveduras não convencionais isoladas a partir de colmeia de abelhas sem ferrão e seu potencial fermentativo visando a produção de cerveja. / Hayssa Carolini Alamar Nunes . 2021  
118 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva  
Coorientador: Martin Hasselmann  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cerveja sem álcool. 2. Leveduras não-convencionais. 3. Leveduras não-Saccharomyces. 4. Compostos aromáticos. 5. cofermentação. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

HAYSSA CAROLINI ALAMAR NUNES

**LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS ISOLADAS A PARTIR DE  
COLMEIA DE ABELHAS SEM FERRÃO E SEU POTENCIAL  
FERMENTATIVO VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Tese apresentado ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor

Aprovada em 17 de Dezembro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gabriela Müller  
Proprietária da empresa Levteck Tecnologia Viva

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Bárbara Elisabeth Teixeira Costa  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Enide Luciana Belmont Montefusco  
Faculdade Estácio do Amazonas

Prof. Dr. Edson Júnior do Carmo  
Universidade Federal do Amazonas

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, meu orientador, por toda a ajuda e orientação no decorrer do meu doutorado assim como todo o suporte durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Martin Hasselmann e sua equipe pelo recebimento, acolhimento e todo o suporte que eles me deram na minha estadia em Stuttgart, Alemanha.

A toda a equipe do laboratório de Biologia molecular da UFAM que sempre me deram tudo o suporte que precisei assim como me proporcionaram muitos momentos felizes, principalmente a Luciana, Lorena e Suziane.

A minha família que sempre acreditou em mim e sempre esteve comigo nos momentos que mais precisei.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia pela minha formação e por proporcionarem a estrutura e suporte necessários para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro, o que possibilitou minha dedicação à realização dessa pesquisa.

Ao programa PROCAD/AMAZÔNIA pela bolsa de doutorado sanduiche que me ajudou muito com o andamento desse projeto de doutorado e agregou muito no meu crescimento profissional.

Agradeço imensamente a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse projeto que tanto significa para minha formação.

## RESUMO

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais utilizada em processos fermentativos. Todavia, há um crescente uso de leveduras não convencionais, devido a seu potencial na produção de *composto aromático* em cultura simples ou em cofermentação e na produção de bebidas de baixo teor alcoólico. Um local propício para a prospecção dessas leveduras seria o pólen de abelhas sem ferrão estocados em seus ninhos (colmeias), o qual passa por um processo fermentativo realizado por bactérias e leveduras. Desta forma, isolou-se e selecionou-se leveduras do pólen de quatro espécies de abelhas sem ferrão com potencial para uso em fermentação simples ou cofermentação de maltose visando a produção de cervejas diferenciadas ou de baixo teor alcóolico. O isolamento das leveduras foi realizado utilizando três diferentes meios de cultura e a seleção dos isolados foi realizada por meio de testes qualitativos de potencial fermentativo de maltose, de floculação e a resistência a alta concentração de maltose e glicose. Os isolados com melhores resultados foram submetidos a identificação molecular usando os pares de *primers* ITS1/ ITS4 e LR0R/LR6. Alguns isolados foram submetidos a fermentações simples e cofermentações a 12°C e 20°C, nas quais foram verificadas a viabilidade celular, o consumo de açúcares redutores e o teor alcoólico. Posteriormente foi verificada a influência da temperatura, concentração inicial de leveduras e do mosto por meio de dois planejamentos composto central rotacional, nos quais foram verificadas as mesmas variáveis respostas que nas fermentações testes. Foram isolados dez morfotipos e dezesseis isolados (alguns com morfotipos duplicados) foram submetidos aos testes qualitativos. Desses isolados sete foram submetidos a identificação molecular (10C, 13H, 6G, 50M, 4I, 53C e 27K) e resultaram em três diferentes espécies (*Hanseniaspora opuntiae*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kodamaea ohmeri*). As *H. opuntiae* e *W. anomalus* foram submetidas as fermentações e cofermentações, nas quais observou-se que essas espécies em fermentação simples em ambas as temperaturas apresentaram melhores resultados referente a viabilidade celular do que as *Saccharomyces*. Contudo, apresentaram menor consumo de açúcares e teor alcoólico que essas *Saccharomyces*. O melhor consumo de açúcares dessas duas espécies foi observado na menor temperatura. As cofermentações indicaram que as espécies de *Saccharomyces* impactaram viabilidade celular em ambas as espécies contudo resultaram em um aumento no consumo de açúcares e no teor alcoólico, principalmente na maior temperatura. A baixa produção de álcool em fermentação simples foi confirmada pelos DCCRs, nos quais a *W. anomalus* apresentou a maior produção (1,60%), a qual pode ser aumentada, segundo os DCCRs, usando maior temperatura e concentração inicial de mosto. Portanto, esses principais resultados indicam dois possíveis usos para a *H.opuntiae* e a *W. anomalus*, o seu uso na produção de bebidas com baixo teor alcoólico, ou seu uso em cofermentações para o aumento dos compostos aromáticos quantificados no DCCR1 da *H.opuntiae* e apresentou aromas doces e florais.

Palavras-chave: Cerveja sem álcool; leveduras não-convencionais; leveduras não-*Saccharomyces*; Compostos aromáticos; cofermentação.

## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* is the most widely used yeast species in fermentation processes. However, there is an increasing use of non-conventional yeasts, due to their potential in the production of flavors in simple culture or in co-fermentation and in the production of low-alcohol beverages. A favorable place for prospecting these yeasts would be the pollen of stingless bees stored in their nests (hives), which undergoes a fermentation process carried out by bacteria and yeasts. Thus, pollen yeasts from four species of stingless bees with potential for use in simple fermentation or co-fermentation of maltose were isolated and selected for the production of differentiated or low-alcohol beers. Yeast isolation was carried out using three different culture media and the selection of isolates was carried out through qualitative tests of maltose fermentation potential, flocculation and resistance to high concentrations of maltose and glucose. The best performing isolates were submitted to molecular identification using the ITS1/ITS4 and LR0R/LR6 primer pairs. Some isolates were submitted to simple fermentation and co-fermentation at 12°C and 20°C, in which the cell viability, consumption of reducing sugars and alcohol content were verified. Subsequently, the influence of temperature, initial concentration of yeasts and must was verified by using two rotational central composite planning, in which the same variable responses as in the test fermentations were verified. Ten morphotypes were isolated and sixteen isolates (some with duplicate morphotypes) were submitted to qualitative tests. Of these isolates, seven were submitted to molecular identification (10C, 13H, 6G, 50M, 4I, 53C and 27K) and resulted in three different species (*Hanseniaspora opuntiae*, *Wickerhamomyces anomalus* and *Kodamaea ohmeri*). *H. opuntiae* and *W. anomalus* were submitted to fermentation and co-fermentation, in which it was observed that these species in simple fermentation at both temperatures showed better results regarding cell viability than *Saccharomyces*. However, they had lower consumption of sugars and alcohol content than these *Saccharomyces*. The best consumption of sugars from these two species was observed at the lowest temperature. The co-fermentations indicated that *Saccharomyces* species impacted the cell viability in both species, but resulted in an increase in sugar consumption and alcohol content, especially at higher temperature. The low alcohol production in simple fermentation was confirmed by DCCRs, in which *W. anomalus* had the highest production (1.60%), which can be increased, according to DCCRs, using higher temperature and initial wort concentration. Therefore, these main results indicate two possible uses for *H. opuntiae* and *W. anomalus*, their use in the production of beverages with low alcohol content, or their use in cofermentations for flavor increase quantified in DCCR1 of *H. opuntiae* and presented sweet and floral aromas.

Keywords: Alcohol free beer; non-conventional yeasts; non-*Saccharomyces* yeasts; *flavours*; mixed fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas e detalhes do que foi feito e obtido nessas etapas em cada estudo desenvolvido. ....	31
Figura 2 - Gel de agarose (1%) revelado com Gel red, contendo os amplicons obtidos com o pare de primer LR0R e LR6 .....	48
Figura 3 - Gel de agarose (1%) revelado com Gel red, contendo os amplicons obtidos com o pare de primer ITS1 e ITS4 .....	48
Figura 4 - Curvas padrão de crescimento dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> - 4I (A) e da espécie <i>W. anomalus</i> - 53C (B) em meio YPM sob agitação de 150 rpm a 30°C, destacando com pontos vermelhos o tempo de início da fase estacionaria de cada isolado. ....	52
Figura 5 - Comparação, segundo o teste de Tukey, da viabilidade celular entre os isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) e da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) e os controles positivos (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ) nas fermentações simples a 12°C e 20 °C.....	53
Figura 6 - Comparação, segundo o teste de Tukey, das concentrações de açúcares redutores entre os isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) e da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) e os controles positivos (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ) nas fermentações simples a 12°C e 20°C. ....	54
Figura 7 - Comparação, segundo o teste de Tukey, dos teores alcoólicos entre os isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I), da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) e os controles positivos (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ) nas fermentações simples a 12°C e 20°C.....	54
Figura 8 - Comparação, segundo o teste de Tukey, da viabilidade celular entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C. ....	55
Figura 9 - Comparação, segundo o teste de Tukey, da concentração de açúcares redutores entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C. ....	56
Figura 10 - Comparação, segundo o teste de Tukey, do teor alcoólico entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C. ....	56

Figura 11 - Comparação segundo o teste de Tukey da viabilidade celular entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações tardias a 12°C e 20°C.....	57
Figura 12 - Comparação segundo o teste de Tukey da concentração de açúcares redutores entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações tardia a 12°C e 20°C.....	58
Figura 13 - Comparação, segundo o teste de Tukey, do teor alcoólico entre as co-culturas dos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i> com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie <i>W. anomalus</i> com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- <i>S. pastorianus</i> e C2- <i>S. cerevisiae</i> ), nas cofermentações tardia a 12°C e 20°C.....	59
Figura 14 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as viabilidades celular obtidas pelo isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	60
Figura 15 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as viabilidades celular obtidas pelo isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	60
Figura 16 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas pelo isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	61
Figura 17 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas pelo isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	61
Figura 18 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre os teores alcoólicos obtidos pelo isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	62
Figura 19 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre os teores alcoólicos obtidos pelo isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.....	62

Figura 20 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da fermentação simples do isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) a 12°C e 20°C. ....	63
Figura 21 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da fermentação simples do isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) a 12°C e 20°C. ....	64
Figura 22 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação simultânea da co-cultura do isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) com os controles positivos a 12°C e 20°C. ....	65
Figura 23 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação simultânea da co-cultura do isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) com os controles positivos a 12°C e 20°C. ....	65
Figura 24 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação tardia da co-cultura do isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) com os controles positivos a 12°C e 20°C. Os pontos vermelhos indicam o tempo 24 horas após a adição dos controles positivos. ....	67
Figura 25 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação tardia da co-cultura do isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) com os controles positivos a 12°C e 20°C. Os pontos vermelhos indicam o tempo 24 horas após a adição dos controles positivos. ....	67
Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR1 usando o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C), o qual relaciona a temperatura (C°) com a concentração inicial de leveduras (10 <sup>x</sup> ), usando seus valores codificados. ....	72
Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR1 usando o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I), o qual relaciona a temperatura (C°) com a concentração inicial de leveduras (10 <sup>x</sup> ), usando seus valores codificados. ....	76
Figura 28 - Diagramas de pareto demonstrando se o efeito das variáveis independentes ou sua interação apresentaram significância sobre os compostos aromáticos determinados com 168 horas de fermentação usando o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I). ....	77
Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 usando o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C), o qual relaciona a concentração inicial do mosto(°P) com a concentração inicial de leveduras (10 <sup>x</sup> ), usando seus valores codificados. ....	81
Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR2 usando o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C), o qual relaciona a concentração inicial do mosto(°P) com a concentração inicial de leveduras (10 <sup>x</sup> ), usando seus valores codificados. ....	83

Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o qual relaciona a concentração inicial do mosto(°P) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados..... 86

Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR2 usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o qual relaciona a concentração inicial do mosto(°P) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados. .... 88

Figura 33- Gráfico resultante da pesquisa realizada no site ScienceDirect para os títulos: Stingless bee, Stingless bee bacteria, Stingless bee yeast, cada uma das quatro espécies estudadas e a associação das mesmas com leveduras no período de 2015 até 2021 ..... 90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primeira matriz do delineamento central rotacional (DCCR) criada pelo programa Statística 7.0, usando a concentração inicial de levedura e a temperatura como variáveis independentes em seus valores reais e codificados (entre parênteses).....	38
Tabela 2 - Parâmetros usados para a quantificação de compostos aromáticos usando micro extração em fase sólida (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS) .....	40
Tabela 3 – Segunda matriz do delineamento central rotacional (DCCR2) criada pelo programa Statística, usando a concentração inicial de levedura e concentração inicial do mosto como variáveis independentes em seus valores reais e codificados (entre parênteses). .....	41
Tabela 4 – Características dos diferentes morfotipos obtidos a partir do isolamento dos pólen das quatro espécies de abelhas sem ferrão nos três diferentes meios de isolamento.....	43
Tabela 5 – Relação dos morfotipos obtidos e as respectivas espécies em que foram observados quando isolados a partir do pólen .....	44
Tabela 6 - Relação dos isolados selecionados para serem submetidos aos testes qualitativos e de resistência a alta concentrações de açúcares, e sua respectiva espécie e meio de isolamento .....	44
Tabela 7 - Resultados do teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose, relacionando os isolados testados com o tempo que exibiram as bolhas fermentativas e o tamanho das mesmas em seu respectivo meios pré inoculados.....	45
Tabela 8 - Resultados do teste de resistência a alta concentração de açúcares com o crescimento de cada isolado em meios contendo glicose (2% e 20%) e maltose (2% e 20%).	46
Tabela 9 - Resultados do teste qualitativo de floculação.....	47
Tabela 10 - Resultado obtido pelo banco de dado GenBank para a identificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS .....	50
Tabela 11 - Resultado obtido pelo banco de dado MycoBank para a identificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS .....	51
Tabela 12 - Médias de células obtidas a partir das curvas padrão realizadas com os isolados da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) e da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) em meio YPM sob agitação a 30°C. ....	53
Tabela 13 - Resultados do teste Tukey para a cofermentação tardia a 20 °C e 12°C comparando os tempos de fermentação para a co-cultura do isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) e a co-cultura do isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C).....	66

Tabela 14 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação sobre a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	68
Tabela 15 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtido pelo programa Statistica 7.0 para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	69
Tabela 16 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	69
Tabela 17 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	69
Tabela 18 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	70
Tabela 19 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR1.....	71
Tabela 20 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	73
Tabela 21 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	73
Tabela 22 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	74
Tabela 23 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	74
Tabela 24 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	75
Tabela 25 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR1.....	75
Tabela 26 - Dados obtidos da produção dos compostos aromáticos usando os ensaios do DCCR1 do isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I), o controle negativo (C1), os controles positivos S23 ( <i>S. pastorianus</i> ) e T58 ( <i>S. cerevisiae</i> ) com 168 horas de fermentação.....	78

Tabela 27 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2.....	79
Tabela 28 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2.....	79
Tabela 29 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2. ....	80
Tabela 30 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2. ....	80
Tabela 31 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2.....	82
Tabela 32 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C) no DCCR2.....	82
Tabela 33 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2. ....	84
Tabela 34 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2. ....	84
Tabela 35 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2. ....	85
Tabela 36 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2.....	85
Tabela 37 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2. ....	87
Tabela 38 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) no DCCR2. ....	87

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	graus Celcius
mM	M Milimolar
M	M Molar
nm	Nanômetro
mm	milimetro
µL	Microlitro
ng	nanograma
mL	mililitro
µg/mL	Microlitro por mililitro
µg/µL	Microlitro por microlitro
x g	Força centrifugal
p/v	Peso / volume
%	porcentagem
min	minuto
YPD	yeast extract, peptone, dextrose
YPM	yeast extract, peptone, maltose
YPR	yeast extract, peptone, raffinose
TE	Tris-HCl/EDTA
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromide
RNase	Ribonuclease
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
MgCl	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
ITS	Internal Transcribed Spacer
bp	Base pair
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
SDS	Sodium dodecyl sulfato
OD	Optical density
atm	pressão atmosférica
°P	Grau platô
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DCCR	Delineamento composto central rotacional
HS-SPME	micro extração em fase sólida
GC/MS	cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa
NaCl	Cloreto de sódio
m/z	Massa/carga

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
2.1	LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS – ONDE SÃO ENCONTRADAS.....	21
2.2	LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS E AS ABELHAS SEM FERRÃO.....	22
2.3	PRINCIPAIS APLICAÇÕES DAS LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS .....	24
2.4	PRODUÇÃO DE CERVEJA USANDO LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS. .	26
2.5	VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS E DE ETANOL. ....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>30</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1	ESTUDO 1 – ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS .....	32
4.1.1	Coleta do material.....	32
4.1.2	Isolamento e purificação.....	32
4.1.3	Teste qualitativo do potencial fermentativo de maltose .....	33
4.1.4	Teste de resistência a alta concentração de açúcares .....	33
4.1.5	Teste qualitativo do potencial de floculação.....	33
4.1.6	Extração de DNA.....	33
4.1.7	PCR.....	34
4.1.8	Purificação dos <i>amplicons</i> e preparo para o sequenciamento.....	35
4.1.9	Análise e identificação das sequências .....	35
4.1.10	Fermentações e cofermentações: produção de álcool.....	35
4.1.11	Quantificação de açúcares redutores.....	36
4.1.12	Quantificação do teor alcoólico .....	37
4.2	ESTUDO 2 – DCCR1.....	37

4.2.1	Influência de diferentes concentrações iniciais de levedura e temperaturas no processo fermentativo.....	38
4.2.2	Quantificação de compostos aromáticos relacionados a fermentação de cerveja.....	39
4.3	ESTUDO 3 - DCCR2 .....	40
4.3.1	Influência de diferentes concentrações iniciais de leveduras e concentrações iniciais de mosto no processo fermentativo. ....	40
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
5.1	ESTUDO 1 – ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO .....	43
5.1.1	Isolamentos e purificação dos isolados.....	43
5.1.2	Potencial fermentativo de maltose .....	44
5.1.3	Teste de resistência a alta concentração de açúcares .....	46
5.1.4	Teste qualitativo do potencial de floculação.....	46
5.1.5	Identificação molecular dos isolados .....	47
5.1.6	Fermentações e cofermentações .....	52
5.2	ESTUDO 2 – DCCR1.....	68
5.2.1	Resultados do DCCR1 para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C).....	68
5.2.2	Resultados do DCCR1 para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I) .....	72
5.3	ESTUDO 3 - DCCR2 .....	78
5.3.1	Resultados do DCCR2 para o isolado da espécie <i>W. anomalus</i> (53C).....	78
5.3.2	Resultados do DCRR2 para o isolado da espécie <i>H. opuntiae</i> (4I).....	83
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
6.1	ESTUDO 1 – ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO .....	89
6.1.1	Isolamento e purificação.....	89
6.1.2	Teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose.....	90
6.1.3	Teste de resistência a alta concentração de açúcares .....	91
6.1.4	Teste qualitativo do potencial de floculação.....	92
6.1.5	Identificação molecular dos isolados .....	93

6.1.6	Fermentações e cofermentações .....	94
6.2	ESTUDO 2 – DCCR1.....	97
6.2.1	Influência da temperatura e concentração inicial de levedura sobre as variáveis respostas.....	97
6.3	ESTUDO 3 – DCCR2.....	99
6.3.1	Influência da concentração inicial de levedura e da concentração do mosto sobre as variáveis respostas .....	99
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de leveduras é conhecido na indústria de fermentação há muitos anos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida e mais utilizada nesse setor industrial (BOTHA, 1993; BELLAVER et al., 2004). Todavia, um novo cenário vem se apresentando e crescendo rapidamente nesse setor fermentativo devido a mudança de hábito do consumidor. Nesse novo cenário as leveduras não convencionais, também conhecidas como não *Saccharomyces*, são utilizadas para a obtenção de vinhos, cervejas, cidras entre outras bebidas fermentadas com diferentes características aromáticas, devido a particularidade dessas leveduras em produzir diversos *composto aromático* (BASSO et al., 2016). Além disso, devido à sua baixa capacidade fermentativa elas são comumente associadas com a produção de bebidas fermentativas de baixo teor alcoólico, como as cervejas zero (YEO e LIU, 2014; BELLUT et al., 2018). Outra forma de utilização dessas leveduras não convencionais, já relatada na literatura, é empregá-las em cofermentação com a *Saccharomyces cerevisiae* para assim produzir uma bebida com maior teor alcoólico associada com aroma e sabor diferenciados devido a adição das leveduras não convencionais (LI et al., 2017; YE et al, 2014; ZHA et al., 2018). Em consequência a essas diferentes utilizações das leveduras não convencionais, a procura por uma cepa que possa ser empregada para um desses fins aumentou consideravelmente (LI et al., 2017). Nesse sentido muitos estudos estão sendo conduzidos buscando por essas leveduras, principalmente em locais de fermentação simultânea como, na fermentação das cervejas do tipo *Lambic*, em fermentações de frutas, no mel de *Apis mellífera*, entre outros (SPITAEELS et al., 2014, MATRAXIA et al., 2021).

Um outro local ideal para fazer essa procura é o pólen das abelhas sem ferrão, pois sabe-se que ocorre fermentação dentro dos seus potes de pólen, assim como a presença de diferentes leveduras com características diferenciadas (MENEZES et al., 2013; MENEZES et al., 2018). Alguns trabalhos voltados para o isolamento e identificação de leveduras em materiais de abelhas sem ferrão já foram desenvolvidos e serviram de base para demonstrar a existência desses microrganismos associados a essas abelhas (ROSA et al., 2003; MORAIS et al., 2013; CALAÇA, 2018; VILLEGAS-PLAZAS et al., 2018; NETO, 2017). Todavia, existem 250 espécies de abelhas sem ferrão conhecidas no Brasil e ainda existe uma lacuna no que referente a comunidade de leveduras presentes nos ninhos e produtos de algumas espécies de abelhas sem ferrão (PEDRO, 2014).

Desta forma, isolar uma nova levedura a partir da colmeia de abelhas sem ferrão e utilizá-la em fermentações, apresenta-se como um tema atrativo de pesquisa relacionado a processos biotecnológicos com potencial, uma vez que pode resultar em um produto diferenciado e quem potencial econômico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leveduras não convencionais – onde são encontradas.

As leveduras são fungos eucarióticos unicelulares com reprodução assexuada por brotamento ou fissão. Milhares de diferentes espécies já foram identificadas e provavelmente ainda existem muito mais espalhadas pela natureza (DUJON, 2010). Dentre essas leveduras, o ascomiceto do gênero *Saccharomyces* é o mais conhecido, principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que também é denominada como levedura convencional. Além dessas leveduras, existem as consideradas leveduras não convencionais que podem ser encontradas dentro do gênero *Saccharomyces* ou em outros gêneros, as quais são conhecidas como não-*Saccharomyces* (GIBSON et al., 2020). Essas leveduras não convencionais, assim como todas as leveduras, são normalmente encontradas espalhadas em todo o meio ambiente, contudo a maioria dos estudos envolvendo o uso dessas leveduras estão associados a ambientes fermentativos.

Muitos estudos associados ao isolamento dessas leveduras são frequentemente desenvolvidos no ambiente de produção de vinho ou exploram a própria uva utilizada no processo. Dentre esses estudos pode-se mencionar Albertin et al. (2016), os quais focaram no isolamento e identificação da levedura não convencional *Hanseniaspora uvarum* em ambientes de produção de vinho na França e na África do Sul (na uva e no próprio vinho) entre os anos de 2003 e 2014 e obtiveram 115 diferentes cepas dessa espécie, as quais se diferenciam dependendo do local e do ano de isolamento. Portanto, esse estudo permitiu estimar a diversidade e a relação genética entre essa espécie e o ambiente de produção de vinho. Neste mesmo ambiente industrial, o artigo de revisão de Belda et al. (2017) feito com base em diferentes estudos, cita as leveduras não convencionais *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Lachancea*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomycodes* como as principais produtoras dos aromas presentes nos vinhos de fermentações espontâneas e inoculados. O mesmo artigo faz menção a utilização de inoculação mista ou sequencial na fermentação do vinho utilizando as leveduras *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Pichia anomala*, *Candida stellata* e *Zygosaccharomyces fermentati* com a *Saccharomyces cerevisiae*. Também voltado para a produção de vinho, Yan et al. (2019) à procura de uma levedura produtora de *composto aromático* para aumentar o aroma do vinho chinses feito de arroz e lírio, isolou a levedura não convencional *Wickerhamomyces anomalus*

HN006 de *Zaopei* fermentado (um conjunto de grãos como sorgo, milho, trigo e arroz fermentados). Ainda com a produção de vinho, porém desta vez vinho de palma (*Bandji*), Ouoba et al. (2012) isolaram bactérias e leveduras a partir de amostras do vinho de palma de *Borassus akeassii* e realizaram a identificação das mesmas. Nesse estudo eles encontrando 44 leveduras divididas entre as espécies *S. cerevisiae* (27, 27%), *Arthroascus* (Ar.) *fermentans* (15,9%), *Issatchenkia orientalis* (11,36%), *Candida tropicalis* (11,36%), *Trichosporon* (T.) *asahii* (11,36%), *Candida pararugosa* (4,54%), *Hanseniaspora uvarum* (4,54%), *Kodamaea ohmeri* (2,27%), *Schizosaccharomyces pombe* (2,27%), *Trichosporon asteroides* (2,27%), *Trigonopsis* (Tr.) *variabilis* (2,27%), *Galactomyces geotrichum* (2,27%) e *Candida quercitrusa*.

No que diz respeito a outros ambientes, Valinhas (2016) em seu estudo buscou isolar leveduras de diferentes frutos em parcial decomposição, tais como, abacate, banana, batata, beterraba, inhame, maracujá, pimentão e tomate, além do bagaço de cana de açúcar e sorgo. A partir desses locais o autor isolou 202 colônias, das quais somente 2 foram selecionadas para a identificação molecular depois de passarem por uma seleção de capacidade de produzir gás a partir de D-xilose e corresponderam as espécies *Galactomyces geotrichum* e *Candida akabanensis*. Ainda trabalhando com fruta, Bastos et al. (2018) em seu isolamento de bactérias e leveduras a partir de sementes de cacau do sul da Bahia fermentadas espontaneamente em caixas de madeiras, observaram a presença das espécies *Pichia* sp., *P. kudriavzevii*, *P. manshurica* e *S. cerevisiae*. Seguindo nessa mesma linha, Ruiz-Moyano et al. (2016) em seu estudo de o isolamento e identificação de leveduras a partir de figos fresco e após 7 dias de armazenamento, obtiveram 58 isolados de leveduras pertencente as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma caribbica*, *Candida carpophila*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Hanseniaspora opuntiae*. Ainda nesta direção, González-Quijano et al. (2014), em seu estudo de isolamento de bactérias e leveduras em pimenta Jalapenõ fermentada proveniente do México, observaram a presença de duas espécies de leveduras não convencionais, *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* e *Kodamaea ohmeri*.

## 2.2 Leveduras não convencionais e as abelhas sem ferrão.

Além de estarem presentes nos ambientes citados anteriormente, as leveduras são ubíquas em ninhos de abelhas nativas sem ferrão e muitos estudos mencionam sua ocorrência e participação como fundamental, citando-as como microrganismos simbiotes que auxiliam no processamento e armazenagem de alimentos como pólen, néctar e mel, além de estarem

presentes no própolis, nas células de cria, larvas, entre outros (POZO et al., 2012; HERRERA et al., 2013; POZO et al., 2014; CAMARGO et al., 1992; LACHANCE et al., 2001; ROSA et al., 2003; SOUZA et al., 2009; THIAGO-CALAÇA, 2011; COSTA-NETO et al., 2016). Para demonstrar essa íntima relação entre as abelhas sem ferrão e as leveduras, alguns estudos podem ser citados. Um deles é o trabalho de Rosa et al. (2003), no qual os autores isolaram e identificaram leveduras obtidas a partir de diferentes partes dos ninhos e das abelhas adultas de três espécies de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* e *Friseomelitta varia*). Como resultado, os autores obtiveram 93 isolados da *T. angustula*, 47 da *M. quadrifasciata* e 12 da *F. varia*, dentre as quais observaram diferentes espécies do gênero *Candida* e a espécie *Starmerella meliponinorum*. Da mesma forma, Thiago-Calaça (2011) em seu estudo isolando leveduras a partir do mel e saburá de *Melipona quinquefasciata* identificou diferentes espécies do gênero *Candida* e *Starmerella*. Além das espécies *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia koreensis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Tetracladium sp*, entre outras. Trabalhando com adultos das espécies de abelhas sem ferrão, *Friseomelitta varia* (manoel-de-abreu), *Scaptotrigona aff. postica* (tubi-bravo), *Scaptotrigona polysticta* (tubi-manso), *Tetragonisca angustula angustula* (jataí), *Melipona compressipes manaosensis* (jupará) e *Melipona scutellaris* (uruçu nordestina) Neto (2017) isolou leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia* (Komagataella) e *Torulaspora* e *Starmerella*. Enquanto, Silva (2016) estudando o mel e pólen das espécies de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Nannotrigona testaceicornis* encontrou as espécies de leveduras *Starmerella meliponinorum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Papiliotrema flavescens* e *Candida apicola*.

Além dessas leveduras estarem presentes nesses ambientes, como demonstrado acima, elas são encontradas em contagens elevadas e sua intensa atividade metabólica é evidenciada e indica um potencial enzimático, do qual esses insetos sociais dependem para diferentes transformações no interior dos ninhos (TEIXEIRA et al., 2003). Uma dessas transformações ocorre no pólen, que é o principal componente objeto da fermentação no ninho, e caracterizado por ser rico em proteínas, lipídios, açúcares, vitaminas e minerais. Essas características o torna um ambiente seletivo, no qual estão presentes somente alguns grupos de leveduras, incorporadas ao pólen pelas abelhas (por inoculação passiva) para acelerar seu processamento e provavelmente ocasionando a biodisponibilização de nutrientes e a conservação do alimento (SOUZA et al., 2004; POZO et al., 2011; POZO et al., 2012; HERRERA et al., 2013; POZO et al., 2014; GILLIAM, 1979; MORAIS; CALAÇA; ROSA, 2013). No mel, por sua vez, normalmente existe menor abundância dessas leveduras, devido a presença de compostos

antimicrobianos e alta concentração de açúcar, em torno de 80% de glicose e frutose e 10% de outros carboidratos, como maltose e rafinose (SILVA, 2016; MONIKA et al., 2013; CARVALHO et al., 2005). Outros motivos, como alta acidez, baixo teor em proteína e a alta viscosidade, limitam a penetração de oxigênio atmosférico, tornando-o um ambiente particularmente inóspito para algumas leveduras (SINACORE et al., 2013; AYALA; GONZALEZ; ENGEL, 2013; BEGUM et al., 2015; CHUTTONG et al., 2015).

A quantidade de literatura que associa a microbiota de leveduras com as abelhas sem ferrão e seus produtos é considerada pequena pois existem muitas espécies dessas abelhas. Somente no Brasil são conhecidas em torno de 250 espécies de abelhas sem ferrão, o que indica que pode haver uma grande variedade de espécies de leveduras desconhecidas associadas aos processos fermentativos que ocorrem nos ninhos dessas abelhas (PEDRO, 2014). A partir das informações apresentadas acima, é possível dizer que produtos das abelhas sem ferrão e constituintes de seus ninhos (mel, pólen, alimento de cria, cera, entre outros) são uma fonte potencial de descoberta de novos micro-organismos fermentadores (BOGDANOV, 2010).

### **2.3 Principais aplicações das leveduras não convencionais**

Os estudos envolvendo as leveduras não convencionais se estendem além da parte de isolamento e identificação mencionada anteriormente. Em alguns casos o potencial desses microrganismos é explorado no setor de biocontrole e de fermentação. Um exemplo é o estudo de Giovati et al. (2018) que purificaram e caracterizaram uma toxina da *Wickerhamomyces anomalus* (WalF1) a qual testaram a atividade antimicrobiana contra cepas de *Candida albicans* e *C. glabrata* susceptíveis e resistentes a fluconazol. Como resultado a toxina caracterizada e purificada apresentou resultados positivos somente a 25°C contra uma cepa de *Candida albicans*. Nesta mesma linha de pesquisa, Contarino et al. (2019) usaram as leveduras não convencionais *Wickerhamomyces anomalus* (BS91), *Metschnikowia pulcherrima* (MPR3), *Aureobasidium pullulans* (PI1) e uma *Saccharomyces cerevisiae* (BCA61) com o propósito de investigar a produção de compostos voláteis orgânicos eficazes contra fungos patogênicos pós-colheita de frutos por essas leveduras. Os autores relataram que as quatro espécies produziram esses compostos, sendo os principais o álcool etílico e o acetato de etila. Seguindo com o uso dessas leveduras para biocontrole, Restuccia et al. (2020) em seu estudo usando *W. anomalus* e folhas de *Cynara cardunculus* para controlar de decadência pós-colheita de frutas cítricas causadas por alguns fungos observaram que essa levedura não convencional aumenta o potencial antifúngico da *C. cardunculus in vitro* principalmente em laranjas e limões.

No que se refere ao uso dessas leveduras na área alimentar pode-se citar o trabalho de Xie et al (2018), os quais investigaram a correlação entre a microbiota e os componentes voláteis responsáveis pelos sabores em diferentes *Sufu* chineses. Nesse estudo, os autores concluíram que a interação dos microrganismos nos *Sufu* resulta na produção de diferentes compostos voláteis que variam durante o processo fermentativo, assim como a microbiota. Em testes adicionais, nos quais adicionaram a mistura de *Pichia fermentans*, *Kodamaea ohmeri* e *Lactococcus lactis* como *starter* na fermentação da pasta de *sufu*, os autores observaram a diminuição no seu tempo de amadurecimento. Continuando na área alimentar, Aslankooshi et al. (2016) testaram diferentes leveduras na produção de pão e chegaram à conclusão que as espécies *Torulaspota delbrueckii* e *Saccharomyces bayanus* são leveduras indicadas para serem usadas na indústria de panificação por adicionar mais complexidade ao perfil sensorial do pão, principalmente sabores frutados e de nozes. Voltado para a produção de bebidas fermentadas Cañas et al. (2014) estudaram a influência da inoculação sequencial da *W. anomalus* e *S. cerevisiae* na qualidade do vinho tinto e chegaram à conclusão que o uso de levedura não convencional na inoculação sequencial aumenta a qualidade do aroma e do sabor do vinho. A *W. anomalus* usada no estudo apresentou um aumento de 23% no conteúdo de acetatos nos vinhos, sendo esses compostos voláteis responsáveis pelo aroma frutado dos vinhos. Ainda na indústria de vinho, Rêgo et al. (2020), na produção de vinho de caju usando as leveduras *T. delbrueckii* e *H. opuntiae* (isoladas de manga e caju) em co-cultivo com *S. cerevisiae* chegaram à conclusão de que o co-cultivo dessas leveduras com a *S. cerevisiae* ocasionaram uma alta produção de etanol a partir de glicose, sacarose e frutose do caju. Além do mais, esses co-cultivos foram responsáveis pela produção de compostos voláteis, resultando em aromas frutados, florais e adocicados (álcool fenético, ácido acético e decanoato de etila). Ainda na indústria de bebidas fermentadas, Ye et al. (2014) estudaram o efeito da cultura simultânea e sequencial da mistura de *W. anomalus* e *S. cerevisiae* na fermentação da cidra de maçã e concluíram que o uso da *W. anomalus* na fermentação do suco de maçã em no mínimo três dias é o suficiente para aumentar a qualidade da cidra produzida devido aos compostos voláteis produzidos. Ainda na indústria de bebidas fermentadas, Zha et al. (2018) trabalhando com o aumento de *composto aromático* do *Baijiu* chinês (licor) usando a cultura mista de *S. cerevisiae* e *W. anomalus* (isolado da destilaria) em diferentes proporções observou que essa combinação produziu mais etanol e acetato de etila, um dos compostos voláteis mais importante na produção de aroma no *Baijiu*.

Outra bebida fermentada na qual as leveduras não convencionais também são usadas é a cerveja, a qual será abordada no próximo tópico.

## 2.4 Produção de cerveja usando leveduras não convencionais.

A cerveja é uma bebida fermentada composta basicamente de água (90-95%), cereais maltados, lúpulo e levedura. Sua produção é constituída pelas etapas de mosturação, fervura do mosto, fermentação, maturação e preparação para engarrafamento (HARRISON e ALBANESE JR, 2019). Na etapa de fermentação, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus* são as leveduras mais utilizadas, e são responsáveis pela produção dos dois tipos de cervejas mais conhecidos, tipo *Ale* com fermentação entre 18 e 22 °C e tipo *Lager* com fermentação entre 8 e 15 °C (LIBKIND et al., 2011; HILL, 2015). Contudo, o aumento da procura por cervejas finas e com perfis aromáticos mais complexos, ocasionado pela mudança observada acerca do consumidor, levou os pesquisadores a explorar as leveduras denominadas de não convencionais (BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016; VARELA, 2016). Essa procura pelas leveduras não convencionais está diretamente associada à sua capacidade de produzir diferentes *composto aromático*, resultando assim, na produção de cervejas com diferentes sabores e aromas. Os compostos aromáticos mais procurados e estudados nesta área, por resultarem em aromas frutados e adocicados, são o acetato de feniletila, acetato de etila, acetato de isoamila e álcool isoamílico (GAMERO et al., 2016; VERSTREPEN et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2012; WHITE e ZAINASHEFF, 2010; YE et al., 2014). Além de serem exploradas pela sua capacidade de produção de *composto aromático*, as leveduras não convencionais têm sido utilizadas na produção de cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool, devido a sua baixa capacidade fermentativa (YEO e LIU 2014; BELLUT et al., 2018; BELLUT e ARENDT, 2019).

Como exemplos desses usos para as leveduras não convencionais pode-se mencionar De Francesco et al. (2015) os quais produziram cerveja de baixo teor alcoólico usando *Saccharomycodes ludwigii* e *Zygosaccharomyces rouxii* isoladas de diferentes locais e países. Os autores constataram que a maioria das cepas de *Z. rouxii* não são adequadas para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico por produzir mais de 1,2% de álcool. Em contrapartida a *S. ludwigii* foi apontada como uma ótima produtora desse tipo de bebida e de cervejas sem álcool, principalmente por produzir uma quantidade considerável de ésteres e álcool superiores, além de resultarem em cervejas mais doces e com um gosto de diacetil. Nesta mesma linha de pesquisa, encontra-se o estudo de Bellut et al. (2018) no qual produziram cerveja sem álcool usando leveduras não *Saccharomyces* isoladas do *Kombucha*. Para esse fim os autores usaram *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Torulaspota delbrueckii*,

*Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces kombuchaensis* obtidas do *kambucha* e concluíram que as cervejas sem álcool produzidas por essas espécies não diferenciam das cervejas sem álcool produzidas por levedura comercial. Dentre essas leveduras, a *Z. bailii* se destacou e foi citada como uma ótima alternativa para a produção desse tipo de bebida pelo fato de proporcionar um odor levemente adocicado e menor cheiro de mosto. Em uma perspectiva mais concreta temos a patente de Liu et al. (2011) que apresenta a *Candida shehatae* como produtora de cerveja sem álcool por produzir cerveja com menos de 0,5% de álcool a 14°C usando um mosto de 9°P. Além disso, a cerveja produzida ainda é caracterizada por possuir um aroma mais espesso e teores mais elevados de ésteres quase sem apresentar odor adocicado e de mosto.

A produção de cerveja por fermentação espontânea, como por exemplo as *American Coolship Ale* e as *Lambics*, é outra linha de pesquisa que comumente associa a produção de cerveja com o uso de leveduras não convencionais. Um exemplo nessa área, é o trabalho de Bokulich et al. (2012) que demonstrou que a microbiota presente na cervejaria é responsável pelos diferentes estágios da cerveja *American Coolship Ale*. Nesse estudo os autores constataram que além de bactérias as leveduras *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Pichia fermentans/kluuyveri*, *Cryptococcus keutzingii*, e *Rhodotorula mucilaginosa* estão presente nos primeiros dias de fermentação enquanto a *B. bruxellensis* começa a aparecer somente depois da 11ª semana de fermentação. Após 36 semanas a *B. bruxellensis* domina a fermentação com a presença mínima de *S. cerevisiae*. No final da fermentação (148 semanas) a *B. bruxellensis* domina totalmente, com uma minoria composta por *P. opuntiae*, *P. fermentans/ kluuyveri*, *C. keutzingii*, e *C. krusei*. Outro estudo direcionado a mesma linha de pesquisa foi desenvolvido por Spitaels et al. (2014), o qual demonstraram a diversidade microbiana presente na cerveja de fermentação espontânea *Lambic*. Nesse estudo os autores notaram nas primeiras horas a presença de *Debaryomyces hansenii* e *S. cerevisiae*, depois de uma semana essa última se manteve e surgiram a *S. pastorianus* e *Naumovia castellii*. Após 3 meses a *S. pastorianus* dominou a fermentação, contudo com 6 meses de fermentação somente a *D. bruxellensis* juntamente com outras duas espécies foram observadas. Após os 6 meses os autores constataram um aumento na diversidade de leveduras, o qual cresceu até o fim da fermentação (24 meses), apresentando oito diferentes espécies de leveduras não convencionais.

Uma terceira linha de pesquisa envolvendo a produção de cerveja e o uso de leveduras não convencionais é voltada para o uso de leveduras não convencionais em cofermentação com leveduras convencionais. Nesta área, pode-se mencionar o estudo de N'Guessan et al. (2010), os quais usaram a *S. cerevisiae* e a *C. tropicalis* como culturas *starter* na produção de *tchapalo*,

uma cerveja tradicional à base de sorgo. Nesse estudo os autores constataram que a cultura pura de cada espécie, assim como a cultura das mesmas influenciaram diferentemente na produção desta cerveja. Os autores apontaram a cultura de *C. tropicalis* + *S. cerevisiae* (2:1) como a melhor alternativa para a produção desta cerveja por apresentar maior concentração alcoólica. Os autores também citam a cultura pura de *C. tropicalis* como a maior produtora de ácidos orgânicos. Outro estudo nessa mesma área, é o de Bourbon-Melo et al. (2020) usando coculturas de *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora opuntiae* com *S. cerevisiae* para aumentarem o perfil aromático da cerveja. Os autores constataram que o cultivo simples das leveduras não convencionais não apresentou características ideais para a produção de cerveja sem álcool devido ao excesso de sabor adocicado e um aroma desequilibrado. Em contrapartida, o uso dessas leveduras em cofermentação com a *S. cerevisiae* apresentou características positivas no perfil aromático das cervejas, aumentando a abundância de acetato de etila. Além disso, a inoculação sequencial da *H. guilliermondii* aumentou as concentrações de acetato de etila e acetato de feniletila, produzindo cerveja com um aroma de mel. A partir desses resultados e de outras literaturas os autores ressaltam o uso de leveduras não convencionais para a produção de cervejas com perfil organolépticos diferenciados.

Algumas dessas espécies de leveduras não convencionais citadas anteriormente e usadas na produção de cervejas comerciais já podem ser encontradas no mercado brasileiro. Entre elas estão as cervejas dinamarquesa “*Mikkeller Brett APA2*” e “*Lost in Translation IPA3 Brett*”, produzida a partir da parceria da cervejaria brasileira Tupiniquim com a dinamarquesa *Evil Twin* e a trapista Orval, que emprega a prática de refermentação. Ambas utilizam as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* no seu processo de fermentação (BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016). Portanto, com base nesse cenário é perceptível que as leveduras não convencionais vêm chamando a atenção do setor cervejeiro e que existem pesquisas acerca desse tema, sendo ele promissor devido às novas demandas deste setor voltadas tanto para a produção de cervejas com perfis aromáticos diferenciados, como para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool.

## **2.5 Variáveis que influenciam a produção de compostos aromáticos e de etanol.**

Como foi possível perceber no tópico 2.4, a produção de compostos aromáticos é influenciada pela espécie de levedura utilizada no processo fermentativo. Contudo, esse não é o único fator que influencia a produção desses compostos. Além desse fator, as condições de envelhecimento da cerveja (na produção de cerveja de fermentação mais longa), o tempo de

armazenamento, a quantidade de ar que existe na garrafa, a temperatura de armazenamento, o tipo e a qualidade do malte, a cepa de levedura usada, a fonte e a concentração de carbono usada e parâmetros usados na fermentação, são alguns dos fatores que afetam a concentração e o tipo de composto aromático produzido. (SINGH, et al., 2008; BAMFORTH, 2010; CABALLERO et al., 2012; DACK et al., 2017; BETTENHAUSEN, 2018; RAVASIO et al., 2018). Por exemplo, a espécie de levedura não convencional *W. anomalus* normalmente é uma grande produtora de acetato de etila (RAVASIO et al., 2018). O uso dessa espécie em inoculação sequencial com a *S. cerevisiae* na produção de vinho aumenta em 23% a produção de acetatos e pode trazer aromas mais leves a essa bebida, como notas balsâmicas e aroma floral, enquanto o uso somente da *S. cerevisiae* resulta em aromas mais intensos, frutais e ácidos (CAÑAS et al., 2014). O uso de maiores concentrações de glicose normalmente resulta em maiores concentrações de acetato de isoamila e acetato de etila (SINGH, et al., 2008; SAERENS et al., 2010).

Alguns dos fatores citados anteriormente também interferem na produção de etanol, como por exemplo, a espécie e a cepa de levedura usada durante a fermentação, o tipo e a concentração de fonte de carbono usada e a temperatura usada. Além desses fatores, a concentração inicial de levedura também influencia na produção de etanol (BRENELLI et al., 2014; LEI et al., 2016). Por exemplo, concentrações maiores de açúcares, ou seja, mostos mais concentrados, tendem a produzir bebidas com teores alcoólicos mais altos (LEI et al., 2016). Assim como maiores concentrações iniciais de leveduras normalmente aumentam o poder de fermentação, melhorando a taxa de consumo de açúcares e conseqüentemente a produção de álcool (VERBELEN et al., 2008). A temperatura usada na fermentação também influencia o tempo e a produção de álcool, na qual por exemplo, cervejas do tipo *ale*, nas quais são usadas temperaturas mais altas de fermentação, normalmente fermentam com maior rapidez e produzem uma quantidade maior de álcool quando comparadas a cervejas do tipo *lager*, nas quais são usadas temperaturas de fermentações mais baixas (LIBKIND et al., 2011; HILL, 2015).

### 3 OBJETIVO GERAL

Realizar fermentações de extrato de malte utilizando leveduras isoladas de colmeia de abelhas sem-ferrão.

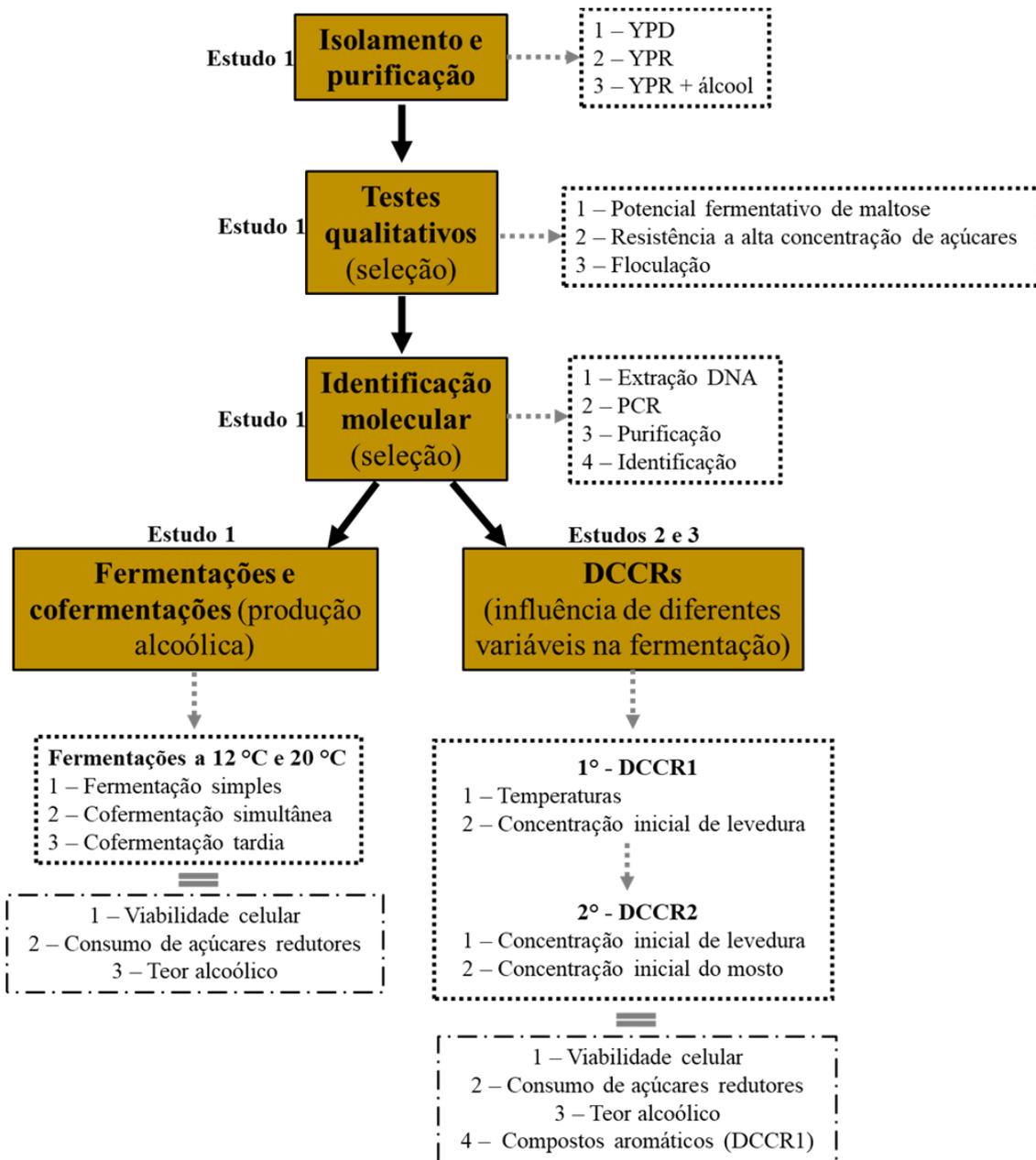
#### 3.1 Objetivos específicos

- A. Isolar leveduras do pólen de abelhas sem ferrão (*Melipona interrupta*, *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Frieseomelitta varia*);
- B. selecionar isolados visando a fermentação de cervejas;
- C. efetuar a identificação molecular dos isolados de interesse;
- D. verificar o potencial de produção de etanol dos isolados selecionados sob diferentes condições fermentativas;
- E. verificar a influência de diferentes temperaturas, concentrações iniciais de levedura e concentrações iniciais do mosto na fermentação;
- F. verificar a produção de compostos aromáticos de um isolado selecionado;
- G. apontar as melhores condições para a produção de bebidas com maiores e menores teores alcoólicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos específicos citados anteriormente, esta tese foi dividida em três diferentes estudos, nos quais as etapas e alguns detalhes das mesmas podem ser observadas no fluxograma abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas e detalhes do que foi feito e obtido nessas etapas em cada estudo desenvolvido.



#### 4.1 ESTUDO 1 – Isolamento, purificação e identificação molecular dos isolados

O estudo 1 foi realizado para alcançar os objetivos específicos A, B, C e D, sendo eles:

- A. Isolar leveduras do pólen de abelhas sem ferrão (*Melipona interrupta*, *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Frieseomelitta varia*);
- B. selecionar isolados visando a fermentação de cervejas;
- C. efetuar a identificação molecular dos isolados de interesse;
- D. verificar o potencial de produção de etanol dos isolados selecionados sob diferentes condições fermentativas.

##### 4.1.1 Coleta do material

A coleta do pólen das quatro espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona interrupta*, *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes* e *Frieseomelitta varia*) foi realizada no município de Iranduba na empresa Amazomel (Coordenadas 3°10'55.4"S 60°7'12.5"W). Para cada espécie foi selecionada uma colmeia, na qual foi coletado o pólen de três potes de pólen com auxílio de ponteiros e espátulas esterilizadas. As amostras foram armazenadas em caixa térmica e levadas a laboratório para a etapa de isolamento.

##### 4.1.2 Isolamento e purificação

O isolamento foi realizado em três etapas. Na primeira etapa, 1g de pólen de cada espécie foi adicionado à 5 mL de meio YPD líquido [extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ampicilina (100 µg/ µL)] e mantido sob agitação de 150 rpm por 48 horas à 30°C (MEIRELES, 2018 modificado).

Para a segunda etapa, 200 µL do meio YPD líquido com crescimento de microrganismo de cada espécie foram transferidos para 5 mL de meio YPR líquido [extrato de levedura 1%, peptona 2%, rafinose 2% e ampicilina (100 µg/ µL)] e mantido sob agitação de 150 rpm por 48 horas à 30°C.

Na última etapa, 200 µL do meio YPR líquido com crescimento de microrganismo de cada espécie foi transferido para 5 mL de meio YPR líquido + 8% de etanol e mantido por 48 horas à 30°C sob agitação de 150 rpm.

Em todas as etapas 1 mL dos meios cultivados foram transferidos para tubos de ensaios e submetidos a diluição seriada até a concentração de  $10^{-4}$  para posterior suspensão em meios

YPD ágar e YPR ágar [extrato de levedura 1%, peptona 2%, rafinose 2%, ampicilina (100 µg/µL) e ágar 1,8%]. Esses meios foram mantidos a 30°C por no máximo três dias. As colônias crescidas morfológicamente distintas foram selecionadas e transferidas para uma nova placa com meio YPD ou YPR para realizar sua purificação. Todos os processos foram realizados em triplicata.

#### 4.1.3 Teste qualitativo do potencial fermentativo de maltose

100 µL dos isolados foram inoculados em tubos de ensaio com rosca contendo 5 mL de meio YPM [extrato de levedura 1% (p/v) e peptona de carne 2% (p/v) e maltose 10% (p/v)] e tubos de Durham invertidos. Posteriormente, os mesmos foram incubados a 30°C, sem agitação por um período máximo de 14 dias. Os tubos foram analisados a cada 24 horas e a fermentação confirmada pela presença de bolhas de fermentação nos tubos de Durham sendo as mesmas medidas com o auxílio de paquímetro (Figueiredo et al., 2017 modificado). Esse teste foi realizado a partir de isolados previamente mantidos em meios YPD líquido e YPM líquidos.

#### 4.1.4 Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Os isolados foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo meio YPD ágar a 30°C durante o período máximo de 3 dias. Subsequentemente, esses isolados foram inoculados em meios de YPD ágar (glicose) e YPM ágar(maltose), ambos a 2 e 20% e mantidos a 30°C durante no máximo 3 dias para acompanhar o seu processo de crescimento.

#### 4.1.5 Teste qualitativo do potencial de floculação

O teste de floculação elaborado com base em Suzzi *et al.*, (1984) foi conduzido pela inoculação de 100 µL dos isolados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YPM líquido e incubados a 30°C por 48 horas. Após esse período, os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos por 24 horas sem nenhuma agitação a temperatura ambiente para a visualização da ocorrência dos processos de precipitação e floculação.

#### 4.1.6 Extração de DNA

Os isolados que apresentaram resultados interessantes nos testes qualitativos acima citados foram submetidos a extração de DNA segundo o protocolo de Rusterholz *et al.* (2015). Para tal, os isolados foram previamente cultivados em tubos falcons de 50 mL contendo 10 mL de meio YPM e mantidos por 2 dias a 30°C sob agitação de 150 rpm. 1 mL de cultura fresca foi centrifugada (17000 x g) à temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 100 µL de TE ao *pellet* precipitado para a diluição do mesmo. Os *pellets* diluídos foram transferidos para microtubos de criopreservação, nos quais foram adicionados *beats* e levados ao homogeneizador Fastprep-24 para a quebra da membrana. Em seguida, adicionou-se aos microtubos 525 µL do tampão de extração CTAB [100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % CTAB e 0,2 % β-mercaptoetanol], 15 µL Proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL RNase (10 mg/mL). Essa mistura foi agitada em vórtex e incubada por 90 minutos a 56 °C. Logo em seguida, foi adicionado 500 µL clorofórmio/álcool isoamílico (25:1) e a mistura foi centrifugada (12000 x g) por 10 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 450 µL de isopropanol e mantidos em gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas duas centrifugações de 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após a primeira centrifugação, adicionou-se 300 µL etanol 70% ao precipitado e após a segunda, o precipitado foi seco a 40°C e ressuspensão em 30 µL de água deionizada estéril. Por fim, o DNA foi quantificado em *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific*).

#### 4.1.7 PCR

Na PCR foram amplificadas duas diferentes regiões, a subunidade 28S do rDNA, usando os pares de primers LR0R e LR6, e a região ITS usando os pares de primers ITS1 e ITS4.

A amplificação pela PCR foi realizada a partir de uma mistura reacional de 25 µL contendo: 1 µL de DNA extraído (diluído); 2,5 µL de Tampão otimizador de *DreamTaq*; 2,5 µL dNTPs (2mM); 0,5 µL de cada iniciador (10 µM); 0,125 µL de *DreamTaq* Polimerase e 17,875 µL de água deionizada ultrapura. A amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler pro vapo.protect* (*Eppendorf*) aplicando o programa composto de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de: 94 °C 15s, 58 °C 15 s, 72 °C 30s e um ciclo transferase terminal a 72 °C por 1 min. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1 % no qual foram pipetados 5 µL dos *amplicons* em cada canaletas, tendo como referência o marcador 100 bp DNA *ladder* da

*Invitrogen*. Por fim foi realizada a coloração por *Gel Red 100x* e subsequentemente a fotodocumentação em transiluminador ultravioleta *InGenius LHR* (*Syngene*).

#### 4.1.8 Purificação dos *amplicons* e preparo para o sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit *MinElute PCR Purification* da *QIAGEN*, seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação o produto foi quantificado utilizando o *Qubit 2.0* (*Invitrogen*) e preparado para sequenciamento utilizando dois microtubos de 1,5 mL, um contendo 3  $\mu$ L de um dos iniciadores (10  $\mu$ m), ITS1 ou LR0R e outro contendo a mesma quantidade do outro iniciador, ITS4 ou LR6. Em ambos foi adicionado 12  $\mu$ L de DNA amplificado e purificado (100 ng/ $\mu$ L). O sequenciamento foi realizado pela empresa *Microsynth*. A partir dos resultados dos sequenciamentos dos *amplicons* obtidos pelo par de *primers* LR0R e LR6, alguns ou todos os *amplicons* dos mesmos isolados obtidos a partir do par de *primers* ITS1 e ITS4 foram submetidos ao sequenciamento.

#### 4.1.9 Análise e identificação das sequências

As sequências obtidas foram analisadas com o programa *Bioedit* e a identificação das sequências obtidas foi feita por comparação contra os bancos de dados (*GenBank* e *Mycobank*) o qual foi realizada através da ferramenta BLAST, configurada na opção BLASTn.

#### 4.1.10 Fermentações e cofermentações: produção de álcool

Os isolados submetidos às fermentações foram selecionados com base na sua identificação molecular e em literaturas a respeito de seu possível uso para fermentação. Primeiramente foi feita uma curva padrão de crescimento para cada isolado, adicionando 200 $\mu$ L de amostra em um Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio YPM a 30°C sob agitação de 150 rpm. A cada três horas foram retiradas amostras e feita a leitura em espectrofotômetro da O.D600 nm e a contagem de células com câmara de Neubauer até a fase estacionária de cada isolado. Todo o processo foi realizado em triplicata.

Para cada isolado, a produção de álcool foi realizada a partir de três diferentes tipos de fermentações em duas temperaturas distintas (12 °C e 20 °C): a fermentação simples, a cofermentação simultânea e a cofermentação tardia. As fermentações simples e as

cofermentações simultâneas foram conduzidas por 120 horas e a cofermentação tardia por 192 horas. Todas as fermentações acima citadas foram realizadas em triplicata.

Para realizar as fermentações acima, os isolados foram previamente cultivados em *Erlenmeyers* (500 mL) contendo 200 mL de meio YPM líquido e mantidos a 30°C sob agitação (150 rpm) até atingir o início da fase estacionária. Após este período, esse meio foi centrifugado (4000 rpm) a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspenso em água destilada autoclavada. Em seguida, as fermentações foram conduzidas em fermentômetros de 500 mL contendo 200 mL extrato de malte a 9°P autoclavado (1 Grau platô, significa que 1% da massa do mosto é composta por açúcares ou 1g de açúcar solubilizado em 100 gramas de mosto), nos quais foram adicionados  $5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> do respectivo isolado ou de controle positivo (Saflager S-23 da Fermentis para 12°C e SafAle T58 da Fermentis para 20°C) para as fermentações simples. No caso das cofermentações simultâneas foram adicionadas  $2,5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> do isolado e  $2,5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> do controle positivo no início da fermentação. Para as cofermentações tardias foram adicionadas  $2,5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> do isolado no início da fermentação e após 3 dias de fermentação foram adicionadas  $2,5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> do controle positivo. Todas as fermentações foram conduzidas juntamente com um controle negativo.

A cada 24 horas foi retirado 1 mL de meio para a contagem de células viáveis e mortas em câmara de *Neubauer* usando 10 µL desta amostra diluída com azul de metileno. A cada 48 horas foi retirada uma amostra extra, a qual foi centrifugada (14000 rpm) a 4 °C, por 5 minutos. A partir do sobrenadante foi realizada a análise de consumo de açúcares redutores. No final de cada fermentação foi quantificado o teor de etanol produzido.

#### 4.1.11 Quantificação de açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada de acordo com Miller (1959) modificado (CYSNEIROS et al., 2013). Para tal, uma mistura de 100 µL da amostra e 300 µL do reagente de DNS foi levada a banho em ebulição por 5 minutos e, em seguida, a banho de gelo. Posteriormente, a mistura foi diluída com 1,5 mL de água destilada e por fim foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm. Os resultados de absorbância foram convertidos em g de açúcar redutor/ L a partir da plotagem dos mesmos em uma curva padrão de glicose (0,0 a 2,0 g/L).

#### 4.1.12 Quantificação do teor alcoólico

Para quantificar o teor alcoólico das fermentações, foi medida a densidade relativa do meio de fermentação (extrato de malte) antes da inoculação dos isolados e no final das fermentações (a partir do sobrenadante) com auxílio de um picnômetro (GÜLUM et al., 2019). Para a medição das densidades as amostras foram aferidas a 20 °C por 30 minutos em banho maria e pesadas. A porcentagem de álcool foi calculada a partir da Equação 1.

$$\% \text{ álcool} = (\text{OG}-\text{FG}) * 131,25 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,

OG: gravidade original ou densidade inicial

FG: Gravidade final ou densidade final

## 4.2 ESTUDO 2 – DCCR1.

O estudo 2 foi realizado para alcançar os objetivos específicos E, F e G, sendo eles:

- E. verificar a influência de diferentes temperaturas, concentrações iniciais de levedura e concentrações iniciais do mosto;
- F. verificar a produção de compostos aromáticos de um isolado selecionado;
- G. apontar as melhores condições para a produção de bebidas com maiores e menores teores alcoólicos.

Esse estudo foi desenvolvido na Universidade de Hohenheim em Stuttgart, Alemanha com a parceria do professor doutor Martin Hasselmann assim como com o auxílio da equipe do mesmo. Essa parceria foi possibilitada graças a uma bolsa de doutorado sanduiche do PROCAD/Amazônia. É importante mencionar que esse estudo foi feito entre os anos de 2019 e 2020, período em que o mundo foi pego de surpresa pela pandemia ocasionada pelo COVID-19. Devido a esse infortuno os experimentos planejados inicialmente foram redesenhados para tentar alcançar os objetivos propostos para esse estudo. Um exemplo dessa mudança foi o uso de um delineamento composto central rotacional (DCCR) contendo duas variáveis independentes no lugar de um DCCR contendo três variáveis independente, pois o primeiro apresentou resultados insatisfatórios e não houve tempo hábil para realizar todas as

quantificações propostas usando um segundo DCCR com três variáveis independentes em decorrência do uso limitado e escalonado dos laboratórios.

#### 4.2.1 Influência de diferentes concentrações iniciais de levedura e temperaturas no processo fermentativo.

A fim de verificar o quanto a concentração inicial de leveduras e a temperatura influenciam nas variáveis respostas (teor de etanol, concentrações de células viáveis e células mortas e concentração final de açúcares redutores), foi desenvolvido um primeiro planejamento denominado delineamento composto central rotacional (DCCR) para cada um dos isolados selecionados. Esse delineamento contou com cinco diferentes concentrações de cada uma das variáveis em avaliação e resultou em uma matriz criada pelo programa *Statistica* com 12 ensaios (Tabela 1), dos quais dois, são repetições adicionais do ponto central. Esse tipo de planejamento experimental foi empregado pois o mesmo visa a quantificação dos efeitos das variáveis desejadas com qualidade, minimizando o uso de reagentes, ou seja, o custo do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Tabela 1 – Primeira matriz do delineamento central rotacional (DCCR) criada pelo programa *Statistica 7.0*, usando a concentração inicial de levedura e a temperatura como variáveis independentes em seus valores reais e codificados (entre parênteses).

Ensaio	Concentração inicial de leveduras ( $5 \times 10^x$ células.mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (C°)
1	5 (-1)	14 (-1)
2	5 (-1)	26 (+1)
3	7 (+1)	14 (-1)
4	7 (+1)	26 (+1)
5 (Central)	6 (0)	20 (0)
6 (Central)	6 (0)	20 (0)
7	4 (-1,414)	20 (0)
8	8 (+1,414)	20 (0)
9	6 (0)	11 (-1,414)
10	6 (0)	29 (+1,414)
11 (Central)	6 (0)	20 (0)
12 (Central)	6 (0)	20 (0)

Cada ensaio foi realizado em *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL de mosto de extrato de malte (9°P) previamente esterilizado em autoclave a 1 atm por 15 min. A concentração de levedura adicionada e a temperatura de fermentação de cada ensaio (*Erlenmeyer*) foi estipulada de acordo com a matriz do DCCR citado anteriormente. Para o

controle negativo foram separados três *Erlenmeyers* sem adição de leveduras, nos quais foram feitas as quantificações de açúcares e densidade no início do processo fermentativo. Para os controles positivos foram utilizadas as leveduras Saflager S-23 da Fermentis para as temperaturas de 11°C e 14°C, e SafAle T58 da Fermentis para as temperaturas de 20°C, 26°C e 29°C. Esses controles foram realizados *Erlenmeyers* com as mesmas condições submetidas aos isolados e com a maior concentração de levedura da respectiva temperatura. Esse planejamento foi realizado por 168 horas.

A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação das concentrações de células viáveis e mortas com células de *Neubauer*. A cada 48 horas uma alíquota adicional foi retirada para a realização da quantificação de açúcares redutores de acordo com o tópico 4.1.11. Com 168 horas de processo fermentativo foi determinado o teor de alcoólico obtido de acordo com o tópico 4.1.12.

#### 4.2.2 Quantificação de compostos aromáticos relacionados a fermentação de cerveja

Foram escolhidos os ensaios do DCCR1 de um isolado para realizar a determinação dos principais *composto aromático* relacionados a fermentação de cerveja (acetato de feniletila, acetato de etila, acetato de isoamila e álcool isoamílico). Essa quantificação foi realizada por micro extração em fase sólida (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC/MS) realizada pelo departamento de química de *flavours* da Universidade de Hohenheim em Stuttgart, Alemanha com colaboração da professora doutora Yanyan Zhang e mestrandia Marina Rigling.

Para tanto, no final das fermentações, 10 mL das amostras de cada ensaio do primeiro planejamento foram adicionadas em frascos de *headspaces* com 4 g de NaCl e 50 µL de padrão interno (timol diluído em etanol puro como concentração de 4 mg/L). Também foram preparados padrões de cada *composto aromático* utilizando 5 mL de etanol puro, 20 mg do aroma em questão e timol puro. Posteriormente, esses padrões foram diluídos (1:100) com água e 100 µL de cada padrão foi adicionado em frasco de *headspace*. Por fim, os padrões e os ensaios tratados foram submetidos a micro extração em fase sólida (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS) usando os parâmetros da tabela 2 (STEINHAUS et al., 2003).

Tabela 2 - Parâmetros usados para a quantificação de compostos aromáticos usando micro extração em fase sólida (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS)

<b>Especificações</b>	
<b>Extração</b>	HS-SPME, fibra CAR/PDMS 85 $\mu\text{m}$ (Supelco) 30 min incubação, 30 min extração, 30 $^{\circ}\text{C}$ , V = 10 mL + 50 $\mu\text{L}$ padrão interno e 4 g NaCl
<b>Cromatógrafo (CG)</b>	GC 6890 (Agilent Technologies)
<b>Coluna</b>	Stabiwax, 30 m x 0,25 mm i.d x 0,25 $\mu\text{m}$
<b>Forno</b>	0,75 mm i.d.
<b>Sistema de injeção a frio (CIS)</b>	100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 12 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), split 2
<b>Amostrador automático</b>	MPS 2XL (Gerstel)
<b>Deteção</b>	Detector de Espectrometria de Massas (MS) quadrupole 5973 (Agilent Technologies), scan ( $m/z$ ) = 40 – 330, $T_{\text{injetor}}$ 230 $^{\circ}\text{C}$ , $T_{\text{MS}}$ 150 $^{\circ}\text{C}$ , atraso do solvente 4 min
<b>Gás carreador</b>	Hélio (5,0)
<b>Fluxo</b>	1,62 mL/min
<b>Programação da temperatura</b>	40 $^{\circ}\text{C}$ (3 min), 5 $^{\circ}\text{C}$ a 240 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)

$m/z$  = massa/carga

### 4.3 ESTUDO 3 - DCCR2

O estudo 3 foi realizado para alcançar os objetivos específicos E e G, sendo eles:

E. Verificar a influência de diferentes temperaturas, concentrações iniciais de levedura e concentrações iniciais do mosto;

G. apontar as melhores condições para a produção de bebidas com maiores e menores teores alcoólicos.

#### 4.3.1 Influência de diferentes concentrações iniciais de leveduras e concentrações iniciais de mosto no processo fermentativo.

Assim como no tópico 4.2.1, foi empregado, para cada isolado, um segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) para verificar a influência da concentração inicial de levedura e a concentração inicial do mosto. Esse segundo planejamento também contou com cinco diferentes concentrações de cada uma das variáveis em avaliação totalizando

12 ensaios (Tabela 3). A temperatura de condução das fermentações para cada isolado foi determinada a partir dos resultados obtidos no primeiro planejamento.

Tabela 3 – Segunda matriz do delineamento central rotacional (DCCR2) criada pelo programa *Statistica*, usando a concentração inicial de levedura e concentração inicial do mosto como variáveis independentes em seus valores reais e codificados (entre parênteses).

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração inicial de leveduras (<math>5 \times 10^8</math> células.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração inicial do mosto (°P)</b>
1	5 (-1)	8 (-1)
2	5 (-1)	16 (+1)
3	7 (+1)	8 (-1)
4	7 (+1)	16 (+1)
5 (Central)	6 (0)	12 (0)
6 (Central)	6 (0)	12 (0)
7	4 (-1,414)	12 (0)
8	8 (+1,414)	12 (0)
9	6 (0)	6 (-1,414)
10	6 (0)	18 (+1,414)
11 (Central)	6 (0)	12 (0)
12 (Central)	6 (0)	12 (0)

Assim como para o primeiro planejamento, os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL de mosto de extrato de malte com concentração determinada pela matriz do DCCR2 citada anteriormente e previamente esterilizado em autoclave. A concentração de levedura adicionada posteriormente também foi estipulada de acordo com o DCCR2 citado anteriormente. O controle negativo seguiu o padrão mencionado no item 4.2 e o controle positivo (Saflager S-23 ou T58) foi determinado de acordo com a temperatura de fermentação selecionada com base no primeiro planejamento (DCCR1). Foram utilizados para os controles positivos os ensaios com maior e menor concentração inicial do mosto e sua respectiva concentração inicial de levedura foi determinada de acordo com a matriz. Esse planejamento foi realizado por 168 horas.

Tal como no primeiro planejamento, foram quantificados a cada 24 horas as concentrações de células viáveis e mortas e a cada 48 horas a concentração de açúcares redutores. No fim das fermentações foram obtidos os teores alcoólicos de acordo com o tópico 4.1.12.

#### **4.4 Análise estatística**

Foi empregado a Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para as fermentações realizadas no item 4.1.10. Para os experimentos usando DCCR foi empregado a avaliação dos efeitos e a análise de variância (ANOVA).

Quando não houve significância na falta de ajuste da ANOVA e o  $R^2$  foi maior ou igual a 0,70 utilizou-se a Equação 2 com base nos resultados obtidos na tabela de regressão e usando somente os coeficientes significativos. Além desta equação foram criados gráficos de superfície de resposta para o teor alcoólico. Também foram criados gráficos de superfície de resposta para a concentração de açúcares redutores quando o  $R^2$  dessa variável resposta foi maior ou igual a 0,70.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 \quad (2)$$

Onde,  $\beta_0$  é o coeficiente de intercessão,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  são os coeficientes lineares das variáveis em estudo,  $\beta_{12}$  é o coeficiente da interação entre as variáveis,  $\beta_{11}$  e  $\beta_{22}$  são os coeficientes quadráticos das variáveis e  $x_1$  e  $x_2$  são as variáveis em estudo.

Os valores apresentados pelo programa *Statistica* codificadamente para cada variável independente com o objetivo de obter uma fermentação com maior ou menor teor alcoólico foram decodificados usando a Equação 3.

$$x_1 = \frac{X_1 - p_0}{\Delta(p_0 - p_1)} \quad (3)$$

Onde  $x_1$  é a variável codificada,  $X_1$  é a variável decodificada,  $\Delta(p_0 - p_1)$  é o valor da diferença entre o ponto central e o ponto +1.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo 1 – Isolamento, purificação e identificação

#### 5.1.1 Isolamentos e purificação dos isolados.

O isolamento das leveduras do pólen das quatro espécies de abelhas sem ferrão nos três diferentes meios utilizados resultou na obtenção de 58 isolados divididos em dez morfotipos distintos. (Tabela 4).

Tabela 4 – Características dos diferentes morfotipos obtidos a partir do isolamento dos pólenes das quatro espécies de abelhas sem ferrão nos três diferentes meios de isolamento.

Características do isolado				
Isolado	Morfotipo	Cor	Textura	Tamanho
3A	A	Branca	Leitosa	Média
40B	B	Amarelo	Leitosa	Pequena
10C	C	Branca	Seca	Pequena
16E	E	Creme	Leitosa	Média
18F	F	Branca	Cremosa	Média
6G	G	Branca	Seca	Pequena
13H	H	Branca	Seca	Pequena
4I	I	Branca	Cremosa	Pequena
27K	K	Branca	Cremosa	Muito pequena
32L	L	Creme	Leitosa	Média

No pólen da *M. interrupta* observou-se a presença da maioria dos morfotipos (6), seguido pelos pólenes da espécie *T. clavipes* com quatro dos morfotipos, da *S. postica* com três morfotipos e por fim, a *F. varia* com dois morfotipos. A partir desse isolamento também foi constatado que cinco morfotipos ocorreram somente em uma das quatro espécies em estudo (F, G, H, I e K) (Tabela 5).

Um total de dezesseis isolados com os morfotipos obtidos foram separados para serem submetidos aos testes qualitativos e de resistência a alta concentração de açúcares. Os isolados foram selecionados de acordo com seu crescimento e se foi obtido a partir do meio contendo álcool (Tabela 6).

Tabela 5 – Relação dos morfotipos obtidos e as respectivas espécies em que foram observados quando isolados a partir do pólen

Morfotipos	Espécie onde foi observado
<b>A</b>	<i>Melipona interrupta e Tetragona clavipes</i>
<b>B</b>	<i>Scaptotrigona postica e Melipona interrupta</i>
<b>C</b>	<i>Melipona interrupta e Tetragona clavipes</i>
<b>E</b>	<i>Scaptotrigona postica e Frieseomelitta varia</i>
<b>F</b>	<i>Scaptotrigona postica</i>
<b>G</b>	<i>Melipona interrupta</i>
<b>H</b>	<i>Frieseomelitta varia</i>
<b>I</b>	<i>Melipona interrupta</i>
<b>K</b>	<i>Tetragona clavipes</i>
<b>L</b>	<i>Melipona interrupta e Tetragona clavipes</i>

Tabela 6 - Relação dos isolados selecionados para serem submetidos aos testes qualitativos e de resistência a alta concentrações de açúcares, e sua respectiva espécie e meio de isolamento

Isolado	Espécie onde foi obtido	Meio em que foi isolado
<b>4I</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPD líquido
<b>16E</b>	<i>Scaptotrigona postica</i>	YPD líquido
<b>40B</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPR líquido
<b>6G</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPD líquido
<b>18F</b>	<i>Scaptotrigona postica</i>	YPD líquido
<b>42F</b>	<i>Scaptotrigona postica</i>	YPR líquido
<b>27K</b>	<i>Tetragona clavipes</i>	YPR líquido
<b>32L</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPR líquido
<b>13H</b>	<i>Frieseomelitta varia</i>	YPD líquido
<b>3A</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPD líquido
<b>10C</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPD líquido
<b>51L</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPR líquido + 8% álcool
<b>50M</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPR líquido + 8% álcool
<b>55C</b>	<i>Tetragona clavipes</i>	YPR líquido + 8% álcool
<b>48E</b>	<i>Frieseomelitta varia</i>	YPR líquido + 8% álcool
<b>53C</b>	<i>Melipona interrupta</i>	YPR líquido + 8% álcool

### 5.1.2 Potencial fermentativo de maltose

Dentre os 16 isolados submetidos ao teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose seis se destacaram por apresentaram a bolha fermentativa no tubo de *Durham*, em ambos os meios pré-inoculados e com menores tempos (32L, 4I, 18F, 13H, 51L e 48E). Dentre esses isolados citados anteriormente parte deles apresentaram uma bolha fermentativa maior quando pré-inoculados em YPD (32L e 4I) e a outra maioria quando pré-inoculados em YPM (18F, 13 H, 51L e 48E). Comparando o tamanho de bolha de fermentação dos isolados citados anteriormente, sobressaíram-se os isolados pré-inoculados em meios YPD (32L, 4I e 13H). Além desses isolados citados, vale a pena mencionar os isolados 27K, 40B e 55C pré-inoculados em meio YPM e o isolado 53C em ambos os meios de pré-inoculo, que mesmo

apresentaram tardiamente as bolhas de fermentações, destacaram-se no tamanho da bolha fermentativa que exibiram (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados do teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose, relacionando os isolados testados com o tempo que exibiram as bolhas fermentativas e o tamanho das mesmas em seu respectivo meios pré inoculados.

<b>Isolado</b>	<b>Meio pré inoculado</b>	<b>Presença de bolha fermentativa (média em dias)</b>	<b>Tamanho bolha fermentativa (Média em mm)</b>
32L	YPM	1	6,625 ± 2,43
	YPD	1	12,125 ± 4,21
3A	YPM	1	4,5 ± 0,58
	YPD	2	5,875 ± 0,63
10C	YPM	4	2,5 ± 1
	YPD	2	7,125 ± 1,60
6G	YPM	4	2 ± 0
	YPD	1	9,625 ± 1,70
4I	YPM	1	3,875 ± 1,25
	YPD	1	17,25 ± 9,61
18F	YPM	1	5,75 ± 1,50
	YPD	1	3,875 ± 0,63
27K	YPM	1	46 ± 0
	YPD	-	-
40B	YPM	-	-
	YPD	1	23,5 ± 3,00
13H	YPM	1	20 ± 5,80
	YPD	1	10 ± 3,14
16E	YPM	1	16,125 ± 4,66
	YPD	2	21,375 ± 1,38
42F	YPM	2	4,375 ± 2,75
	YPD	2	3 ± 0
50M	YPM	12	9,375 ± 0,75
	YPD	12	3,5 ± 3,58
51L	YPM	1	6,125 ± 0,85
	YPD	1	5,75 ± 0,29
48E	YPM	1	9,25 ± 3,52
	YPD	1	4 ± 2,27
55C	YPM	7	19,5 ± 10,10
	YPD	12	6,25 ± 0,96
53C	YPM	3	18,5 ± 6,66
	YPD	5	22,25 ± 10,21

### 5.1.3 Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Dos 16 isolados testados, oito apresentaram crescimentos bons e médios em ambos os açúcares e concentrações. Desses oito isolados, cinco apresentaram ótimo consumo de glicose e maltose em ambas as concentrações analisadas (2 e 20%), resultando em um ótimo crescimento desses isolados em todos os meios testados. Os isolados 42F, 55C e 13H cresceram menos na maior concentração de glicose e o isolado apresentou menor crescimento na maior concentração de maltose. Os Isolados 40B, 51L e 50M apresentaram menor crescimento na maior concentração de ambos os açúcares. Os isolados 48E, 16E, 18F, e 32L tiveram um bom crescimento em ambas as concentrações de maltose e obtiveram menor desempenho em meios contendo glicose. O isolado 4I apresentou um crescimento médio na menor concentração de ambos os açúcares e menor crescimento na maior concentração de ambos os açúcares. Em contrapartida, esse isolado se sobressaiu no quesito odor, pois exalou um aroma frutal (pera) durante seu crescimento, principalmente quando inoculado em glicose. (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados do teste de resistência a alta concentração de açúcares com o crescimento de cada isolado em meios contendo glicose (2% e 20%) e maltose (2% e 20%).

Isolado	Glicose		Maltose	
	2%	20%	2%	20%
<b>6G</b>	+++	+++	+++	+++
<b>10C</b>	+++	+++	+++	+++
<b>51L</b>	+++	+++	+++	+++
<b>53C</b>	+++	+++	+++	+++
<b>42F</b>	+++	++	+++	+++
<b>50M</b>	+++	+++	+++	+++
<b>13H</b>	+++	++	+++	+++
<b>4I</b>	++	+	++	+
<b>55C</b>	+++	+	+++	+++
<b>48E</b>	++	+/-	+++	+++
<b>16E</b>	++	+/-	+++	+++
<b>40B</b>	+++	++	+++	++
<b>18F</b>	++	++	+++	+++
<b>32L</b>	+++	+	+++	+++
<b>27K</b>	+++	++	+	+/-
<b>3A</b>	++	++	++	++

Legenda: (+++) = alto crescimento; (++) = médio crescimento; (+) = baixo crescimento; (+/-); crescimento muito baixo.

### 5.1.4 Teste qualitativo do potencial de floculação

Nenhum dos isolados testados exibiu o processo de floculação, que é observado pela formação de flocos. Mesmo não exibindo esse processo, alguns isolados apresentaram uma boa

precipitação 24 horas depois de serem agitados em vórtex (4I, 24K, 13H, 10C e 53C) (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados do teste qualitativo de floculação

<b>Isolado</b>	<b>Floculação (+-)</b>
<b>4I</b>	-
<b>16E</b>	---
<b>40B</b>	---
<b>6G</b>	-
<b>18F</b>	---
<b>27K</b>	-
<b>32L</b>	---
<b>13H</b>	-
<b>3A</b>	---
<b>10C</b>	-
<b>51L</b>	---
<b>50M</b>	--
<b>55C</b>	---
<b>48E</b>	---
<b>42F</b>	---
<b>53C</b>	-

Legenda: (-) = não floculou, mas apresentou rápida precipitação e limpidez do meio após 24 horas.

(--) = não floculou, mas apresentou precipitação e limpidez do meio após 24 horas.

(---) = não floculou e não apresentou boa precipitação nem limpidez total do meio após 24 horas.

### 5.1.5 Identificação molecular dos isolados

Para a parte de identificação molecular foram escolhidos os isolados com base nos resultados dos testes qualitativos realizados anteriormente. Portanto, os isolados submetidos a identificação molecular foram o 10C, 13H, 6G, 50M, 4I, 53C e 27K. O isolado 4I foi escolhido principalmente pela peculiaridade de exalar um aroma de pera como mencionado no tópico 5.3 e por apresentar resultados médios e bons na maioria dos testes qualitativos realizados.

Nos géis contendo os *amplicons* de ambas as regiões analisadas (região ITS e da subunidade 28S do rDNA) é possível observar a presença de três diferentes massas moleculares. Nos *amplicons* obtidos da subunidade 28S do rDNA, observa-se os isolados 10C, 13H, 6G e 50M com peso molecular de aproximadamente 900 bp, os isolados 4I e 53C com massa molecular de aproximadamente 950 bp e o isolado 27K com massa molecular de 925 bp (Figura 2). Nos *amplicons* referentes a região ITS é possível notar a massa molecular de 400 bp para os isolados 10C, 13H, 6G e 50M, o isolado 4I com massa molecular de 750 bp e o isolado 53C com 600 bp (Figura 3). Não foi possível amplificar suficientemente o isolado 27K nesta região mesmo após o uso de diferentes diluições.

Figura 2 - Gel de agarose (1%) revelado com *Gel red*, contendo os *amplicons* obtidos com o pare de *primer* LR0R e LR6

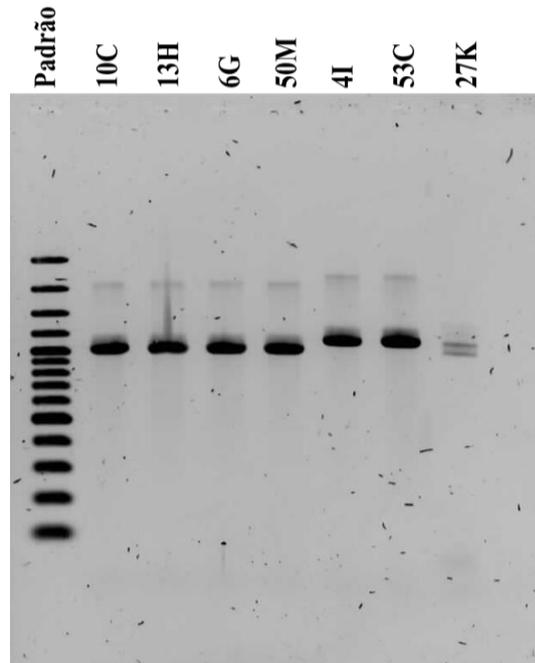
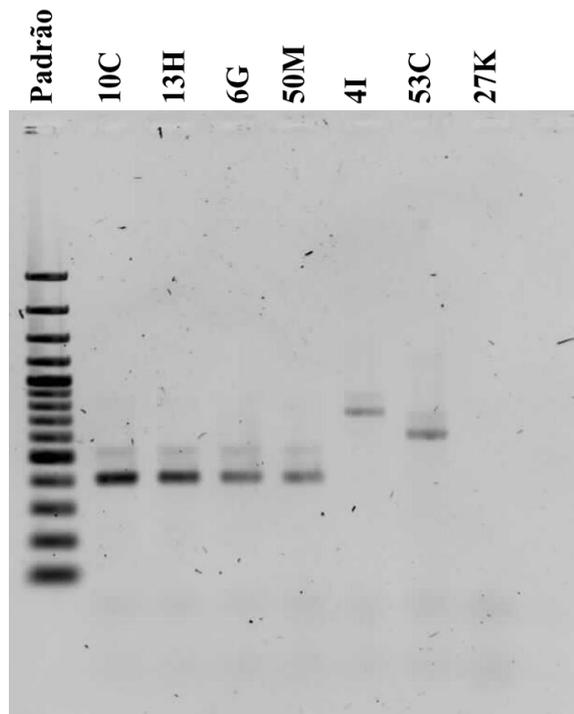


Figura 3 - Gel de agarose (1%) revelado com *Gel red*, contendo os *amplicons* obtidos com o pare de *primer* ITS1 e ITS4



A análise e comparação das sequências dos *amplicons* da região ITS com os bancos de dados *GenBank* e *Mycobank* demonstrou que os *amplicons* com as três diferentes massas moleculares obtidas no gel de agarose realmente correspondem a três diferentes espécies,

*Hanseniaspora opuntiae* (4I), *Wickerhamomyces anomalus* (53C) e *Kodamaea ohmeri* (6G, 50M, 10C e 13H) (Tabelas 10 e 11). O mesmo não foi observado para as sequências dos *amplicons* da subunidade 28S rDNA. Os isolados 4I e 53C, que apresentaram *amplicons* de mesmas massas moleculares no gel de agarose desta região, diferiram na identificação das sequências e confirmaram as identificações obtidas a partir dos *amplicons* da região ITS. Por sua vez, os isolados 6G, 50M, 10C e 13H que apresentaram *amplicons* de mesma massa molecular no gel de agarose, resultaram na identificação da mesma espécie (*Kodamaea ohmeri*).

Tabela 10 - Resultado obtido pelo banco de dado *GenBank* para a identificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS

28S				ITS				
Código do isolado	Acesso da sequência referente a subunidade rRNA 28S	Espécie identificada	Similaridade %	Chave de acesso	Acesso da sequência ITS	Espécie identificada	Similaridade %	Chave de acesso
4I	AAMFMZZX016	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,72	KC111446	AAHMR0490 13	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,73	MN268780.1
53C	AAMSF55G013	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99,62	EU057562	AAJSZ3SD01 6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	KX253664.1
6G	AAN6D8RS016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY39795	AAPJHRDZ01 6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	98,79	MK394144.1
50M	AAMZUPCJ013	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY39795	AAP0XY5J01 3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	98,79	MK394144.1
10C**	AANCSHTS016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY39795				
13H**	AANJNXCU016	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	KY39795				

\*\* dados obtidos somente para a região da subunidade 28S do rRNA

Tabela 11 - Resultado obtido pelo banco de dado MycoBank para a identificação das sequências da subunidade 28S rRNA e da região ITS

Código do isolado	Espécie identificada	28S		ITS		
		Similaridade de %	Chave de acesso	Espécie identificada	Similaridade de %	Chave de acesso
4I	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	100	SH1547319.08F UKC111446	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,73	SH1547319.08FUFM1999 51
53C	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	CNRMA8.316	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	PMM10-516L PMM10-516L_ITS
6G**	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932 -			
50M**	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932			
10C**	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932			
13H**	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	WM 807 gb - U45702 - NRRL Y1932			

\*\* dados obtidos somente para a região da subunidade 28S do rRNA

### 5.1.6 Fermentações e cofermentações

Com base nos resultados obtidos na identificação molecular, aliados a pesquisas de literatura voltadas para o potencial fermentativo e de produção de compostos aromáticos, os isolados das espécies *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I) foram selecionados para a realização das fermentações.

A partir das curvas padrões de crescimento obtidas para ambas as espécies, é possível observar que o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) atinge a fase estacionária primeiro, com 15 horas de crescimento e o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) atinge a mesma fase somente com 27 horas de crescimento (Figura 4). Contudo, mesmo o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) atingindo antes a fase estacionária, essa espécie produz seis vezes menos células que o isolado da espécie *W. anomalus* (53C). Também é possível observar que até 12 horas de crescimento não há uma grande diferença na quantidade de células produzida por ambas as espécies. Porém, com 15 horas de crescimento, o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) produziu quase três vezes mais células que o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (Tabela 12).

Figura 4 - Curvas padrão de crescimento dos isolados da espécie *H. opuntiae* - 4I (A) e da espécie *W. anomalus*- 53C (B) em meio YPM sob agitação de 150 rpm a 30°C, destacando com pontos vermelhos o tempo de início da fase estacionária de cada isolado.

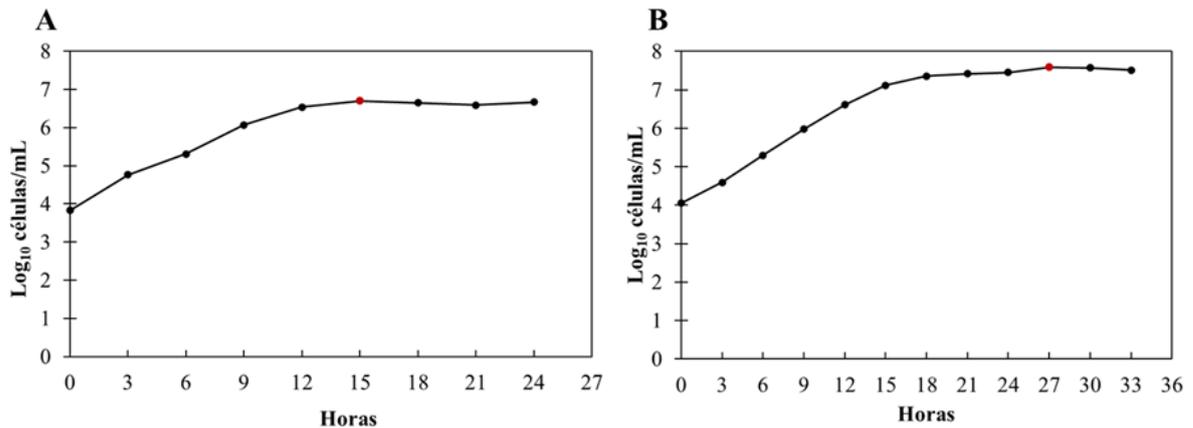


Tabela 12 - Médias de células obtidas a partir das curvas padrão realizadas com os isolados da espécie *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I) em meio YPM sob agitação a 30°C.

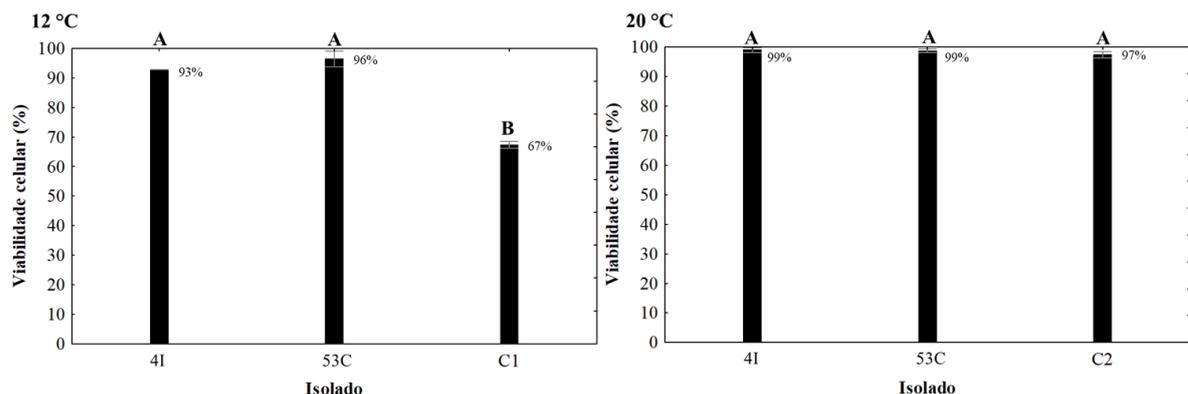
Média células/mLx10 <sup>6</sup>		
Horas	<i>W. anomalus</i> (53C)	<i>H. opuntiae</i> (4I)
0	0,01	0,01
3	0,04	0,06
6	0,20	0,21
9	0,99	1,20
12	4,13	3,64
15	13,18	4,89*
18	22,71	4,63
21	26,78	3,99
24	29,80	4,75
27	39,38*	-
30	37,50	-
33	33,00	-

\* Início da fase estacionária.

#### 5.1.6.1 Influência do tipo de isolado usado nas diferentes fermentações testadas

Com os resultados obtidos no fim das fermentações simples observa-se que o tipo de isolado usado foi significativo para a viabilidade celular somente na menor temperatura usada ( $p=0$  a 12 °C e  $p=0,11$  a 20 °C). Nessa menor temperatura, os isolados da espécie *H. opuntiae* (4I) e da espécie *W. anomalus* (53C) apresentaram melhores resultados e não diferenciaram entre si (Figura 5).

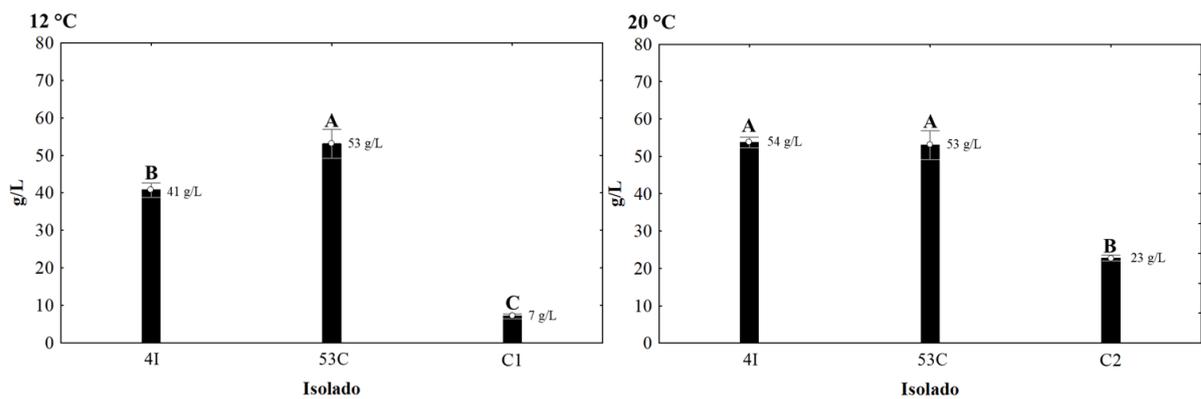
Figura 5 – Comparação, segundo o teste de Tukey, da viabilidade celular entre os isolados da espécie *H. opuntiae* (4I) e da espécie *W. anomalus* (53C) e os controles positivos (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*) nas fermentações simples a 12°C e 20 °C.



Letras maiúsculas comparam médias das viabilidades celular entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

O tipo de isolado usado também teve significância para o consumo de açúcares redutores em ambas as temperaturas usadas nas fermentações simples ( $p=0$  para ambas). Na menor temperatura o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) exibiu o menor consumo de açúcares redutores, enquanto na maior temperatura, os isolados das espécies *H.opuntiae* (4I) e *W. anomalus* (53C) foram responsáveis pelo menor consumo de açúcares, não havendo diferença entre eles (Figura 6).

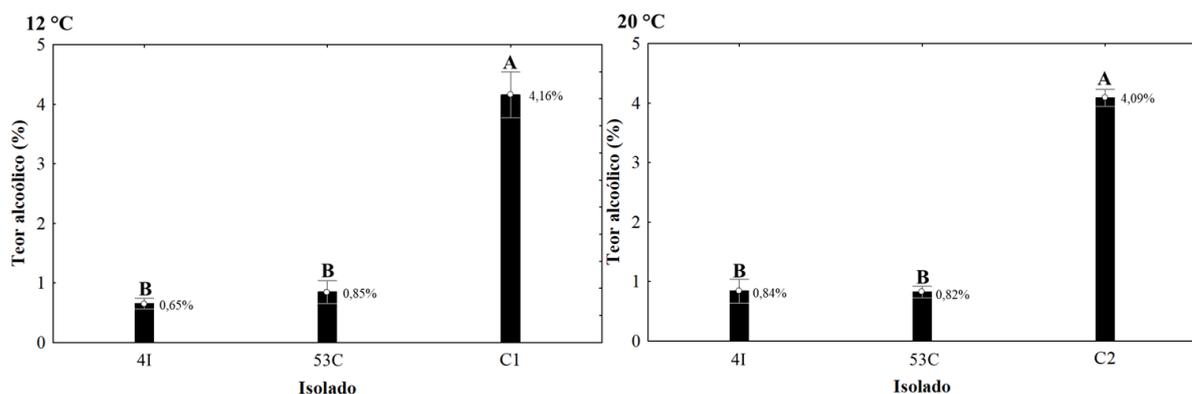
Figura 6 - Comparação, segundo o teste de Tukey, das concentrações de açúcares redutores entre os isolados da espécie *H. opuntiae* (4I) e da espécie *W. anomalus* (53C) e os controles positivos (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*) nas fermentações simples a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

O mesmo foi observado com teor alcoólico, que nesse tipo de fermentação foi afetado pelo tipo de isolado em ambas as temperaturas ( $p=0$  em ambas as temperaturas), nas quais os isolados das espécies *H.opuntiae* (4I) e *W. anomalus* (53C) produziram os menores teores alcoólicos, não diferindo entre si (Figura 7).

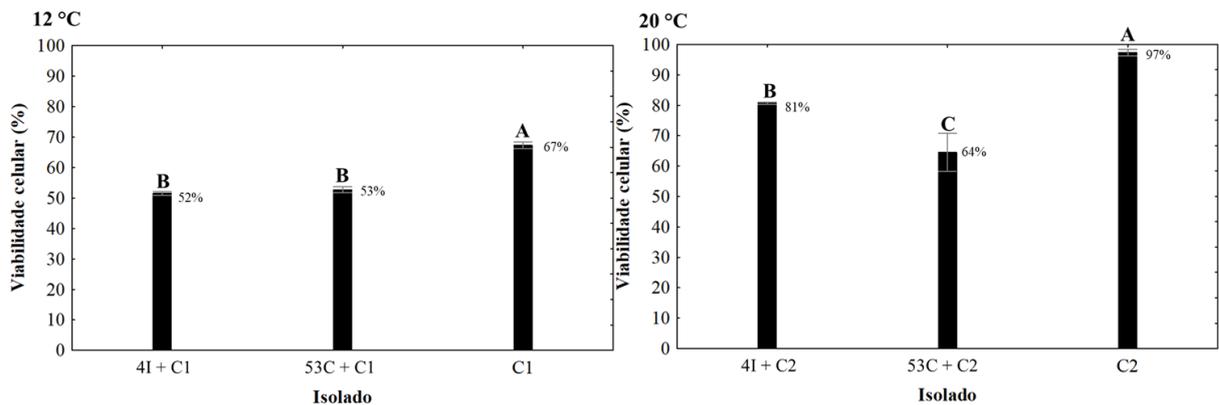
Figura 7 - Comparação, segundo o teste de Tukey, dos teores alcoólicos entre os isolados da espécie *H. opuntiae* (4I), da espécie *W. anomalus* (53C) e os controles positivos (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*) nas fermentações simples a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias dos teores alcoólicos entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

Os resultados do último dia de fermentação das cofermentações simultâneas indicam que o tipo de isolado interferiu na viabilidade celular em ambas as temperaturas ( $p=0$  para ambas). Na maior temperatura a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com o controle positivo foi responsável pela menor viabilidade celular. Na menor temperatura as co-culturas de ambas as leveduras não-convencionais com o controle positivo não diferiram entre si e apresentaram as menores viabilidades celulares (Figura 8).

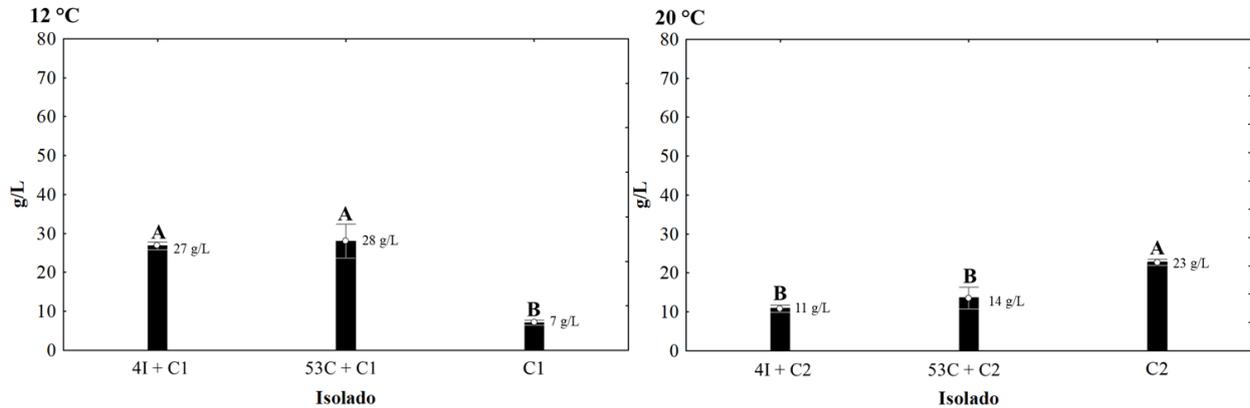
Figura 8 – Comparação, segundo o teste de Tukey, da viabilidade celular entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das viabilidades celular entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

No último dia desse tipo de cofermentação, o consumo de açúcares redutores também foi influenciado pelo tipo de isolado nas duas temperaturas usadas ( $p = 0$  em ambas). Na menor temperatura utilizada as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo exibiram as maiores concentrações de açúcares redutores e não diferiram entre si. O oposto foi observado na maior temperatura, na qual as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo foram responsáveis pelas menores concentrações de açúcares redutores e não diferiram entre si (Figura 9).

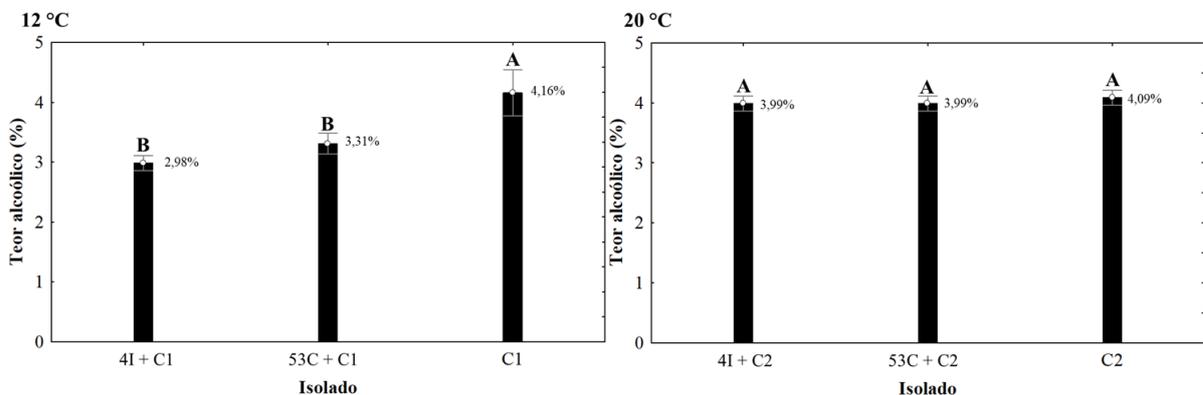
Figura 9 – Comparação, segundo o teste de Tukey, da concentração de açúcares redutores entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

Para esse tipo de cofermentação, o tipo de isolado foi significativo na produção de álcool somente quando usado a menor temperatura ( $p=0$ ), na qual as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo não diferiram entre si e produziram os menores teores alcoólicos (Figura 10).

Figura 10 - Comparação, segundo o teste de Tukey, do teor alcoólico entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações simultâneas a 12°C e 20°C.

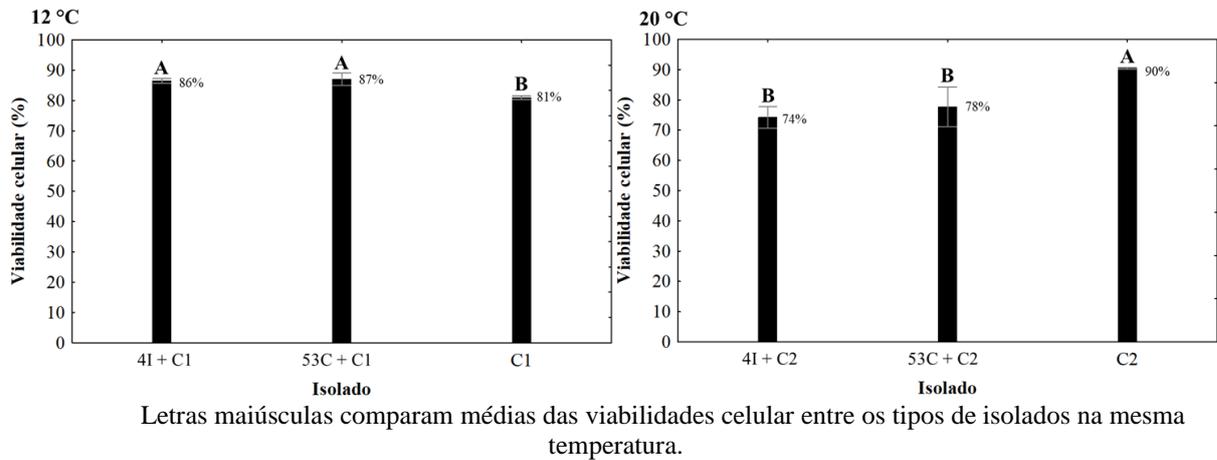


Letras maiúsculas comparam médias dos teores alcoólicos entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

Os resultados do último dia de fermentação das cofermentações tardias apontam que em ambas as temperaturas o tipo de isolado foi significativo para a viabilidade celular ( $p=0$  a 12°C e  $p=0,01$  a 20°C). Na menor temperatura as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo foram responsáveis pelas maiores viabilidades celulares e não apresentaram

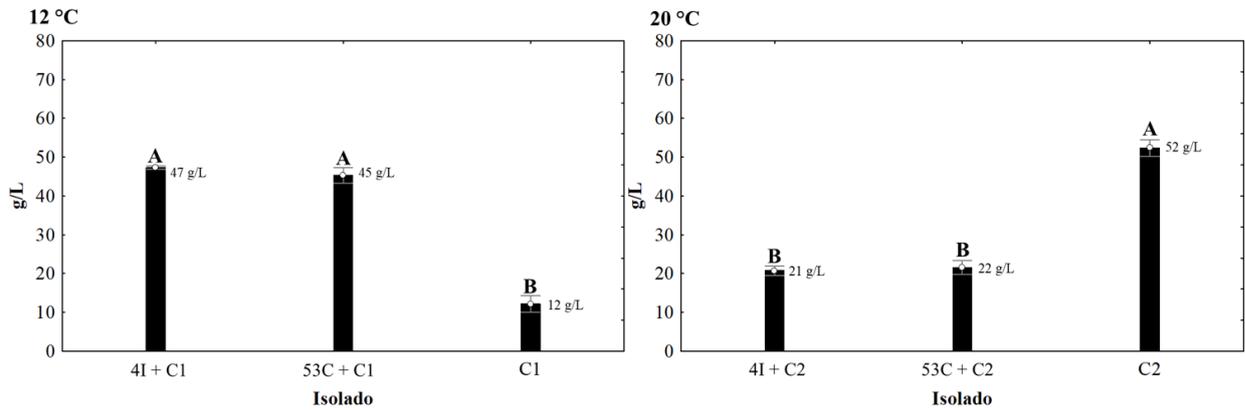
diferença entre si. O oposto ocorreu na maior temperatura, na qual as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo exibiram as menores viabilidades celulares e não diferiram entre si (Figura 11).

Figura 11 - Comparação segundo o teste de Tukey da viabilidade celular entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações tardias a 12°C e 20°C.



Em relação ao consumo de açúcares redutores nas cofermentações tardias, o tipo de isolado usado foi significativo em ambas as temperaturas de trabalho ( $p=0$  para ambas). Na menor temperatura usada, as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo não diferenciaram entre si e apresentaram menor consumo de açúcares redutores. O oposto foi observado na maior temperatura utilizada, na qual as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo foram responsáveis pelos maiores consumos de açúcares redutores, não diferenciando entre si (Figura 12).

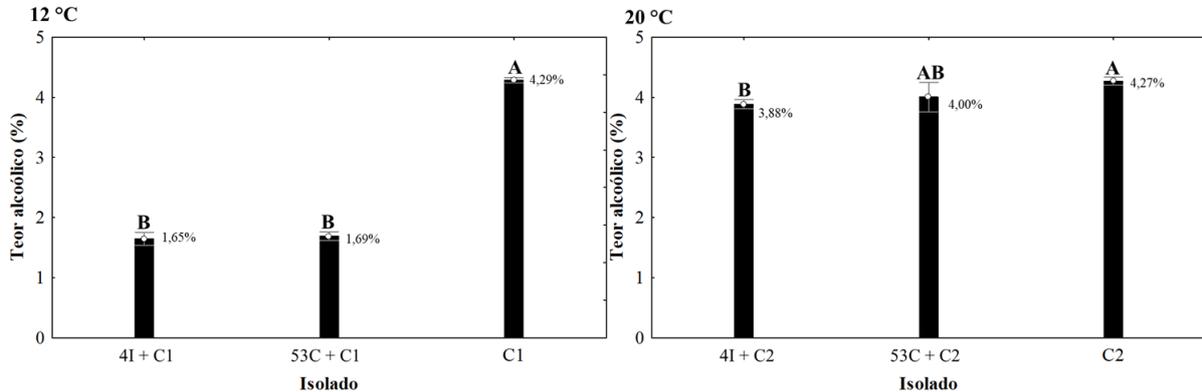
Figura 12 - Comparação segundo o teste de Tukey da concentração de açúcares redutores entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações tardia a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores em os tipos de isolados na mesma temperatura.

No que se refere ao teor alcoólico produzido nas cofermentações tardias, o tipo de isolado foi significativo em ambas as temperaturas, contudo mostrou maior relevância na menor temperatura ( $p=0$  a 12 °C e  $p=0,05$  a 20°C). Na menor temperatura as co-culturas das leveduras não convencionais com o controle positivo produziram os menores teores alcoólicos e não apresentaram diferença entre si. Na maior temperatura a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com o controle positivo produziu o menor teor alcoólico, enquanto a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com o controle positivo produziu um teor alcoólico média, se igualando tanto ao controle positivo, que produziu o maior teor alcoólico, quanto com a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com o controle positivo (Figura 13).

Figura 13 - Comparação, segundo o teste de Tukey, do teor alcoólico entre as co-culturas dos isolados da espécie *H. opuntiae* com os controles positivos (4I+C1 e 4I+C2), da espécie *W. anomalus* com os controles positivos (53C+C1 e 53C+C2) e os controles positivos em fermentação simples (C1- *S. pastorianus* e C2- *S. cerevisiae*), nas cofermentações tardia a 12°C e 20°C.



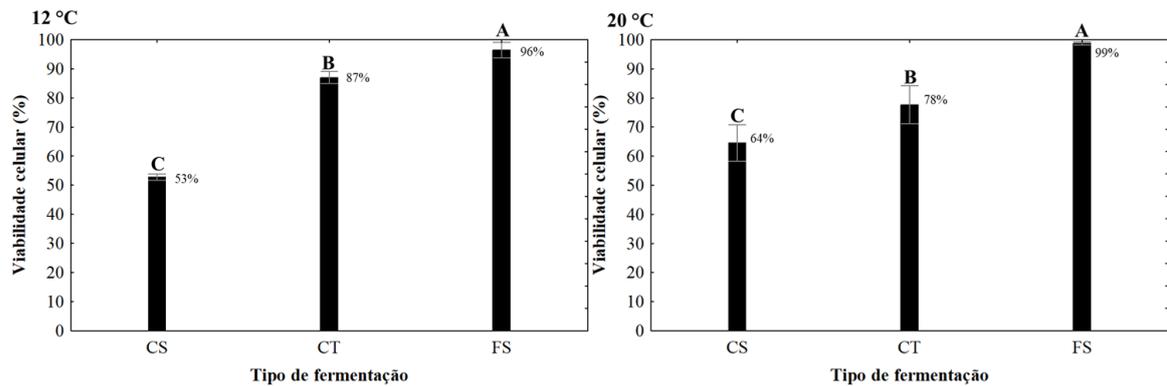
Letras maiúsculas comparam médias dos teores alcoólicos entre os tipos de isolados na mesma temperatura.

#### 5.1.6.2 Influência do tipo de fermentação usado com os isolados das espécies *W. anomalus* (53C) e *H. opuntiae* (4I)

A análise dos resultados do último dia das fermentações indica que o tipo de fermentação utilizado foi significativo para todas as variáveis respostas estudadas, em ambas as temperaturas de trabalho e para os isolados das duas espécies ( $p=0$  para todas as variáveis e em ambas as espécies).

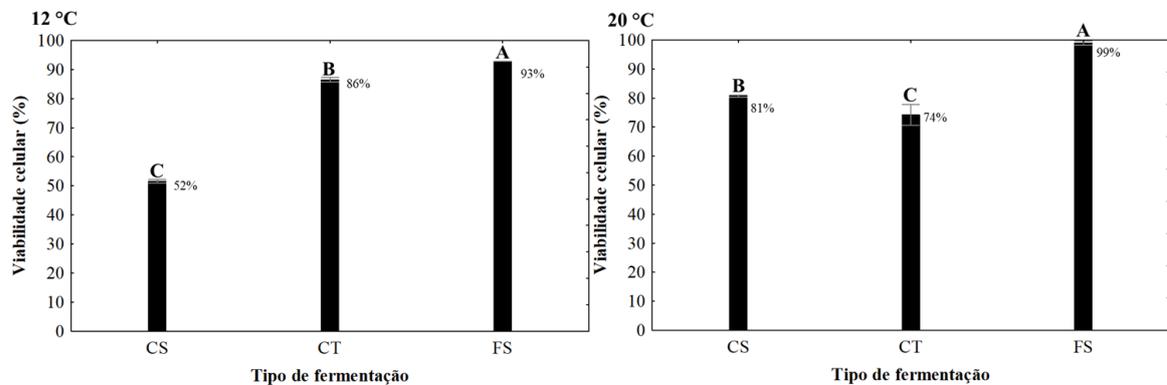
Analisando a viabilidade celular, verifica-se que a fermentação simples resultou na maior viabilidade celular e de forma geral, a cofermentação simultânea foi responsável pela menor viabilidade celular para os isolados de ambas as espécies. A única exceção foi observada para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) na maior temperatura, na qual a cofermentação tardia foi responsável pela menor viabilidade celular (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as viabilidades celular obtidas pelo isolado da espécie *W. anomalus* (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das viabilidades celular entre os tipos de fermentações usados na mesma temperatura.

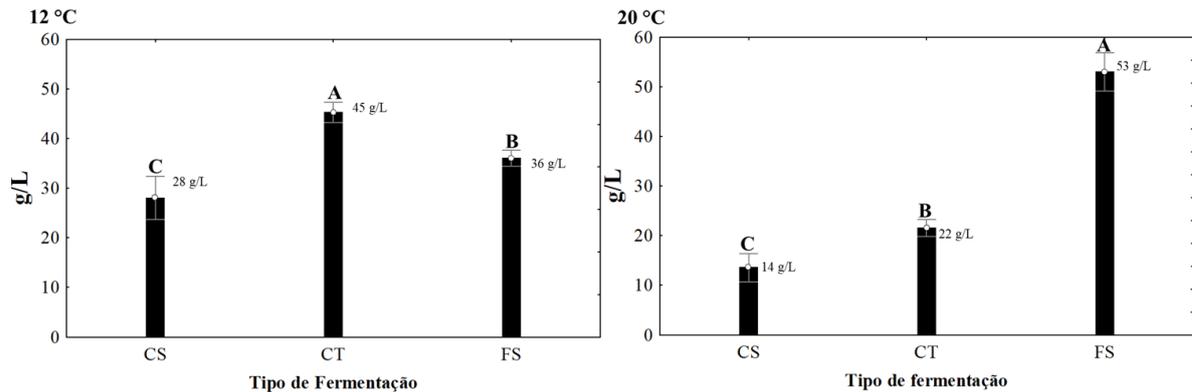
Figura 15 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as viabilidades celular obtidas pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das viabilidades celular entre os tipos de fermentações usados na mesma temperatura.

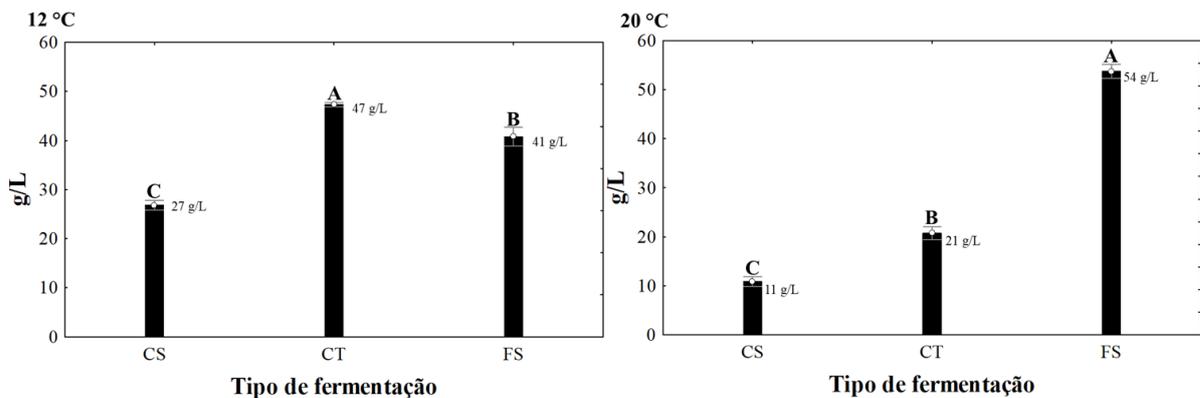
Analisando o consumo de açúcares redutores, a cofermentação simultânea apresentou o maior consumo de açúcares redutores nas duas temperaturas e em para ambas as espécies de leveduras não convencionais estudadas. Para ambas essas espécies de leveduras não convencionais, o menor consumo de açúcares redutores foi observado pela cofermentação tardia na menor temperatura e pela fermentação simples na maior temperatura (Figura 16 e 17).

Figura 16 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas pelo isolado da espécie *W. anomalus* (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre os tipos de fermentações usados na mesma temperatura.

Figura 17 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.



Letras maiúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre os tipos de fermentações usados na mesma temperatura.

Assim como ocorreu para o consumo de açúcares, a cofermentação simultânea resultou no maior teor alcoólico para ambas as espécies em ambas as temperaturas usadas. Na maior temperatura as duas cofermentações usadas promoveram o maior teor alcoólico, não diferenciando entre si nos isolados das duas espécies de leveduras não convencionais usadas (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre os teores alcoólicos obtidos pelo isolado da espécie *W. anomalus* (53C) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.

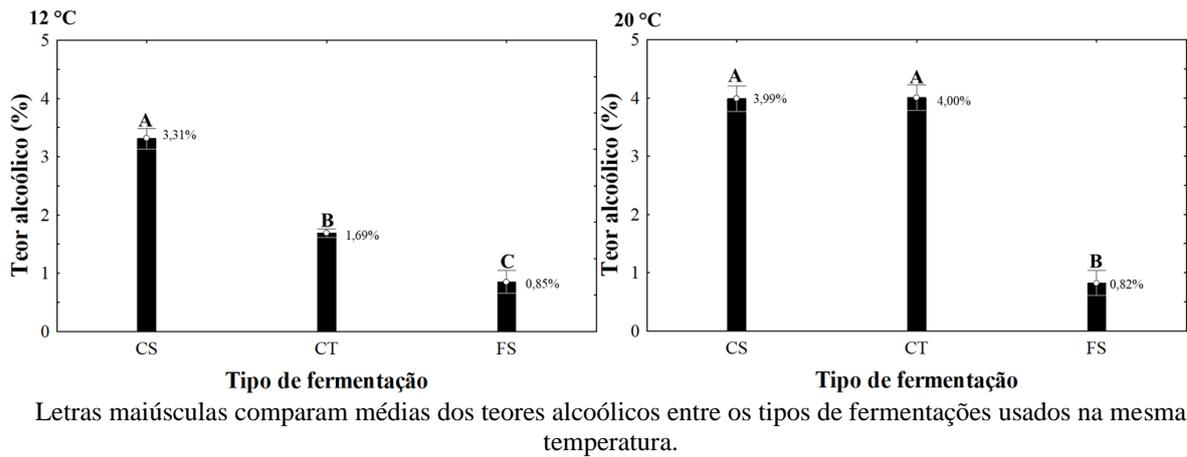
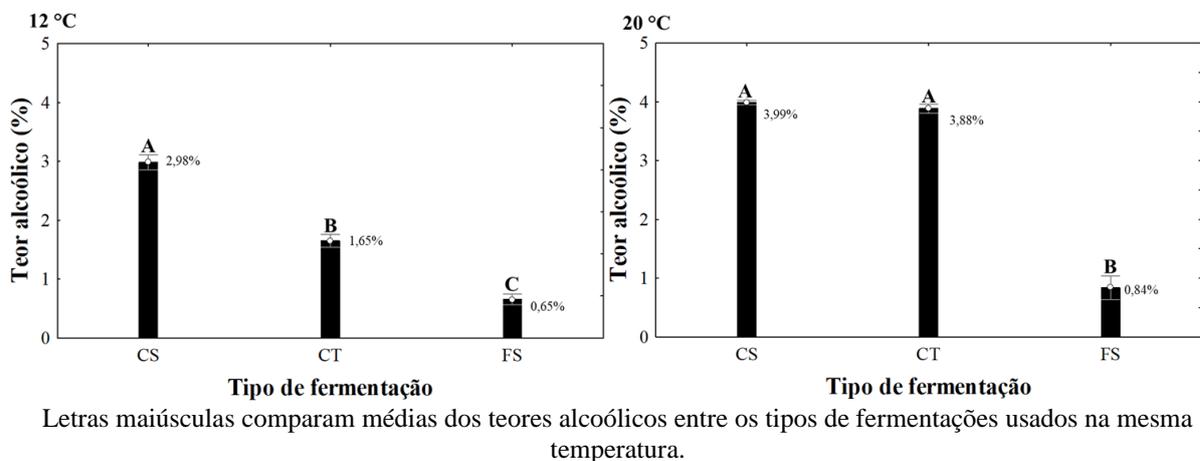


Figura 19 - Comparação, segundo o teste de Tukey, entre os teores alcoólicos obtidos pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) na fermentação simples (FS), em co-cultura com os controles positivos na cofermentação simultânea (CS) e na cofermentação tardia (CT) a 12°C e 20°C.



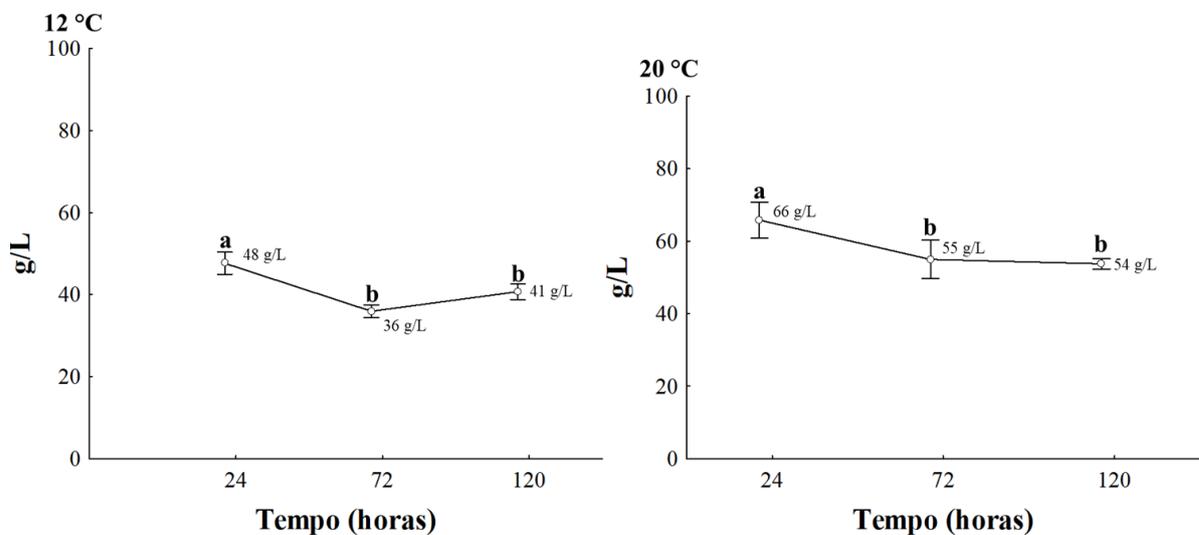
### 5.1.6.3 Influência da temperatura nos diferentes tipos de fermentações para os isolados das espécies *H. opuntiae* (4I) e *W. anomalus* (53C).

Nas fermentações simples a temperatura influenciou somente a viabilidade celular e o consumo de açúcares redutores nos isolados das duas espécies de leveduras não convencionais ( $p=0$  para ambas as variáveis respostas nos isolados das duas espécies).

A maior viabilidade celular foi observada nas maiores temperaturas tanto para o isolado *H. opuntiae* (99% a 20 °C contra 95% a 12 °C) quanto para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (99% a 20 °C contra 97% a 12 °C).

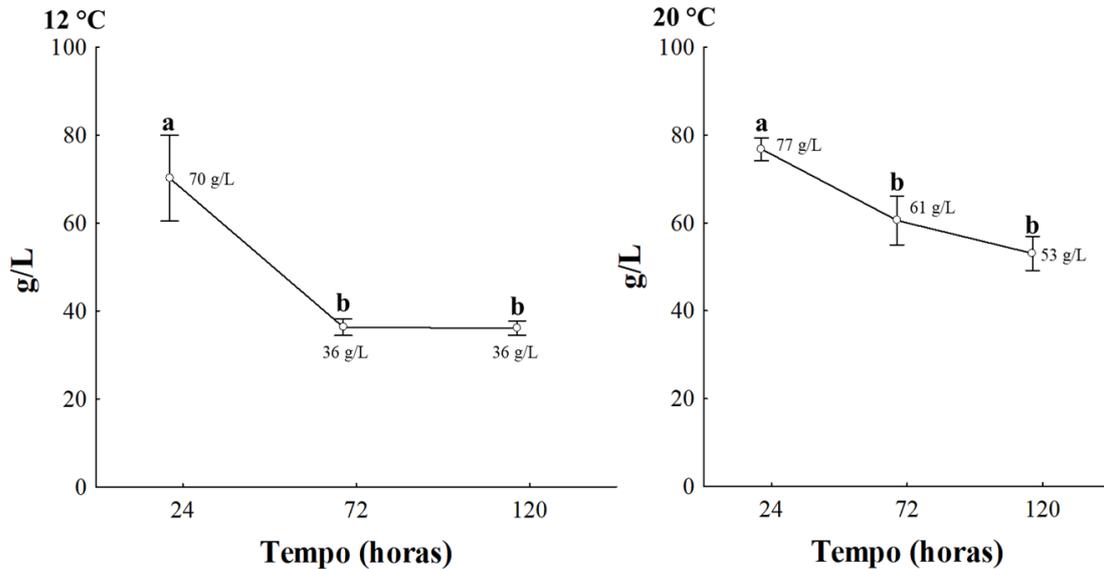
Referente ao consumo de açúcares redutores, a menor temperatura apresentou menor concentração de açúcares residuais tanto para o isolado da espécie *H. opuntiae* (35,97 g/L utilizando 12°C e 53,75 g/L com 20°C) quanto para o isolado da espécie *W. anomalus* (36,04 g/L com 12°C e 53,04 g/L com 20°C). Em ambas as espécies a menor temperatura apresentou consumo de açúcares até 72 horas de fermentação e na temperatura mais elevada, mesmo não havendo diferença estatística entre 72 horas e 120 horas de fermentação é possível perceber um consumo maior de açúcares até o final da fermentação (Figura 20 e 21). As fermentações simples resultaram em teores alcoólicos abaixo de 1% em ambas as temperaturas tanto para a *H. opuntiae* (0,42% a 12°C e 0,34% a 20°C) quanto para a *W. anomalus* (0,84% a 12°C e 0,82% a 20°C).

Figura 20 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da fermentação simples do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12°C e 20°C.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

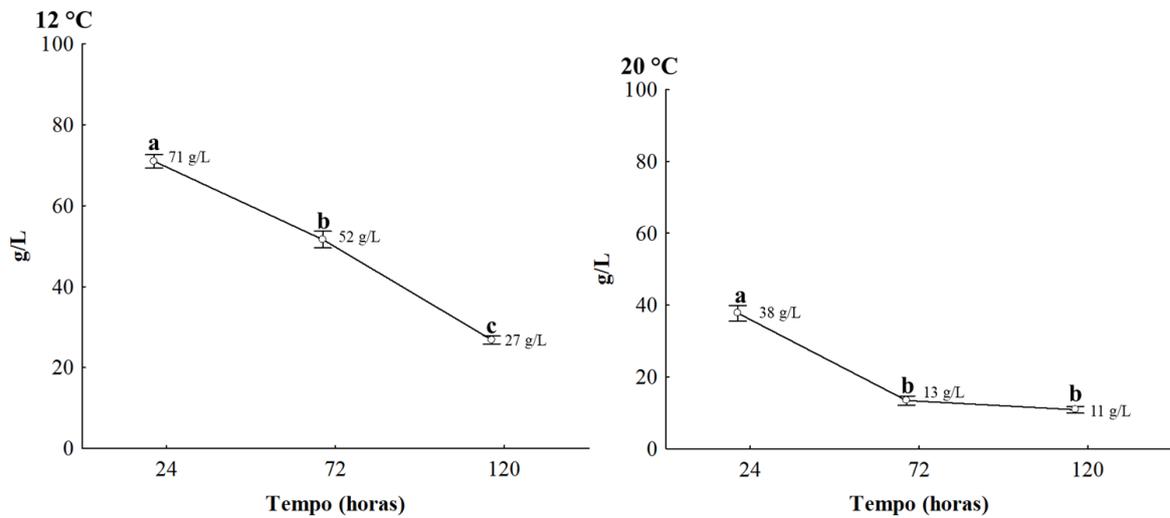
Figura 21 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da fermentação simples do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 12°C e 20°C.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

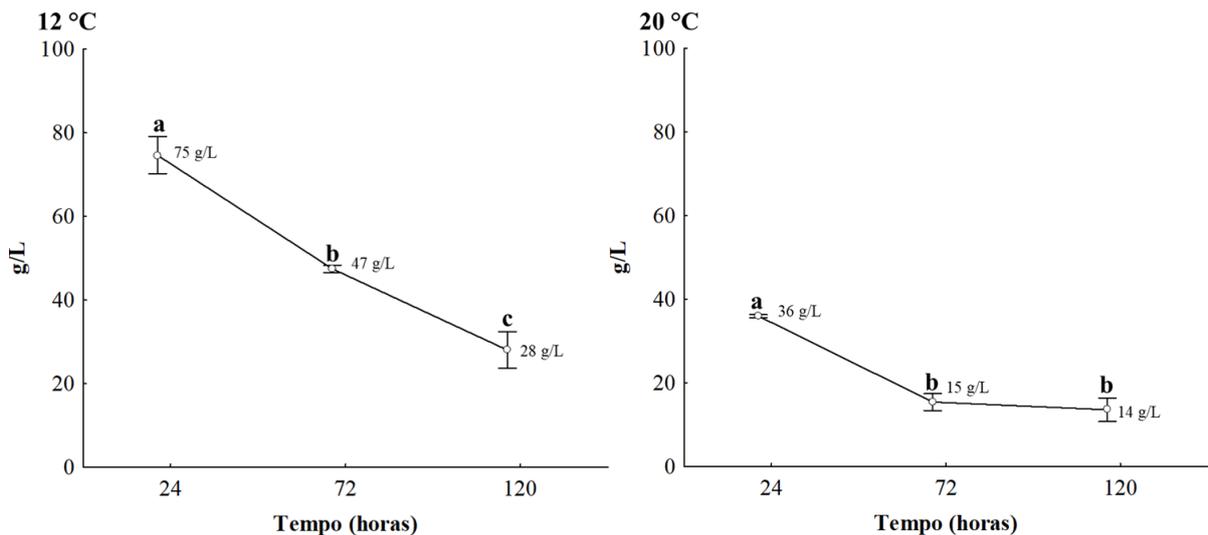
Na cofermentação simultânea, a temperatura influenciou somente o consumo de açúcares redutores e a produção alcoólica em ambas as espécies ( $p=0$  para ambas as variáveis nos isolados das duas espécies). A maior temperatura proporcionou a menor concentração de açúcares residual tanto para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com o controle positivo (10,85 g/L com 20°C e 26,83 g/L com 12°C) quanto para a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com o controle positivo (13,56 g/L com 20°C e 28,01 g/L com 12°C) (Figura 22 e 23).

Figura 22 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação simultânea da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com os controles positivos a 12°C e 20°C.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

Figura 23 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação simultânea da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com os controles positivos a 12°C e 20°C.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

A maior temperatura igualmente resultou na maior produção de álcool tanto para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com o controle positivo (4I) (3,99 % a 20°C e 2,98 % a 12°C) quanto para a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com o controle positivo (3,99% a 20°C e 3,31% a 12°C).

No que se refere a cofermentação tardia, a temperatura afetou a viabilidade celular somente da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) ( $p= 0,03$ ), na qual a menor temperatura foi responsável pela maior viabilidade celular (93% a 12 °C e 88% a 20 °C). Adicionalmente, a partir da tabela 13 é possível verificar que na menor temperatura, as co-culturas do controle positivo com os isolados de ambas as leveduras não convencionais mantiveram a viabilidade celular após a adição da levedura convencional, apresentando queda somente com 120 horas de fermentação. Quando usado a maior temperatura, as co-culturas do controle positivo com os isolados de ambas as leveduras não convencionais apresentaram queda imediatamente após a adição da levedura convencional.

Tabela 13 - Resultados do teste Tukey para a cofermentação tardia a 20 °C e 12°C comparando os tempos de fermentação para a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C)

Tempo (horas)	Viabilidade celular (%)			
	Co-cultura da <i>H. opuntiae</i> (4I)		Co-cultura da <i>W. anomalus</i> (53C)	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
24	99 ± 0,73 <b>A</b>	100 ± 0,19 A	99 ± 1,52 <b>a</b>	100 ± 0.07 a
48	97 ± 1,20 <b>A</b>	99 ± 0,54 A	99 ± 0,30 <b>a</b>	99 ± 0.08 a
72	94 ± 0,82 <b>B*</b>	95 ± 2,84 AB*	94 ± 0,94 <b>bc*</b>	96 ± 1.26 a*
96	93 ± 1,30 <b>BC</b>	89 ± 2,40 BC	94 ± 2,40 <b>b</b>	86 ± 1.28 b
120	88 ± 0,47 <b>DE</b>	79 ± 0,20 DE	88 ± 0,81 <b>d</b>	81 ± 0.46 bc
144	90 ± 1,66 <b>CD</b>	86 ± 4,26 CD	90 ± 0,31 <b>cd</b>	85 ± 4.40 bc
168	87 ± 0,99 <b>DE</b>	85 ± 0,15 CD	89 ± 1,70 <b>cd</b>	77 ± 1.41 c
192	86 ± 0,76 <b>E</b>	74 ± 3,59 DE	87 ± 2,04 <b>d</b>	78 ± 6.58 bc

Letras maiúsculas em negrito comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12 °C;

letras maiúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 20°C; letras

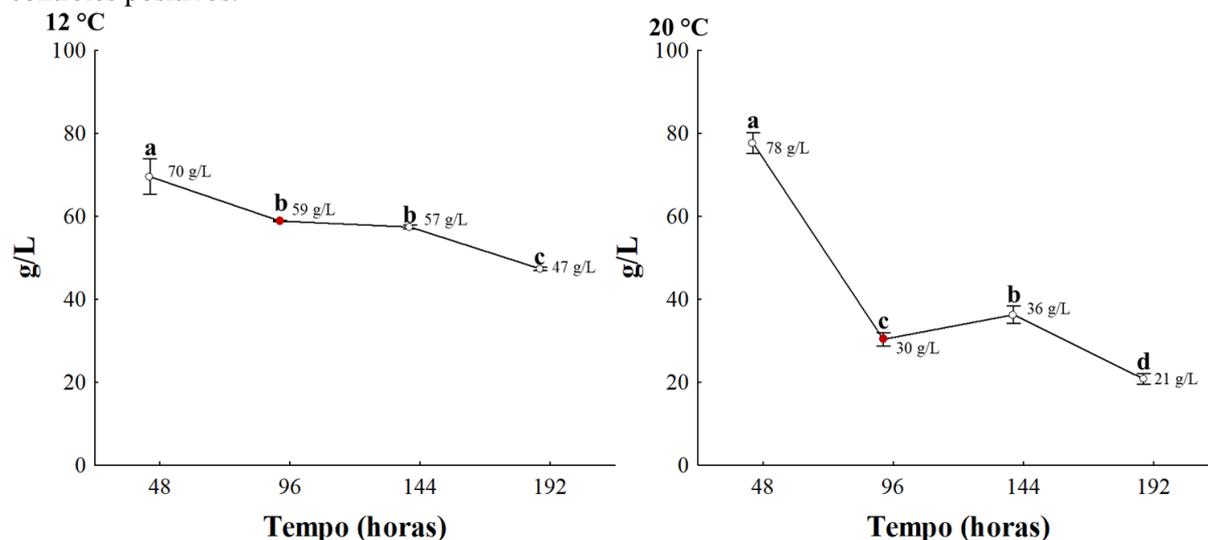
minúsculas em negrito comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 12 °C;

letras minúsculas comparam os tempos da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 20 °C

\* Adição dos controles positivos (*Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces pastorianus*)

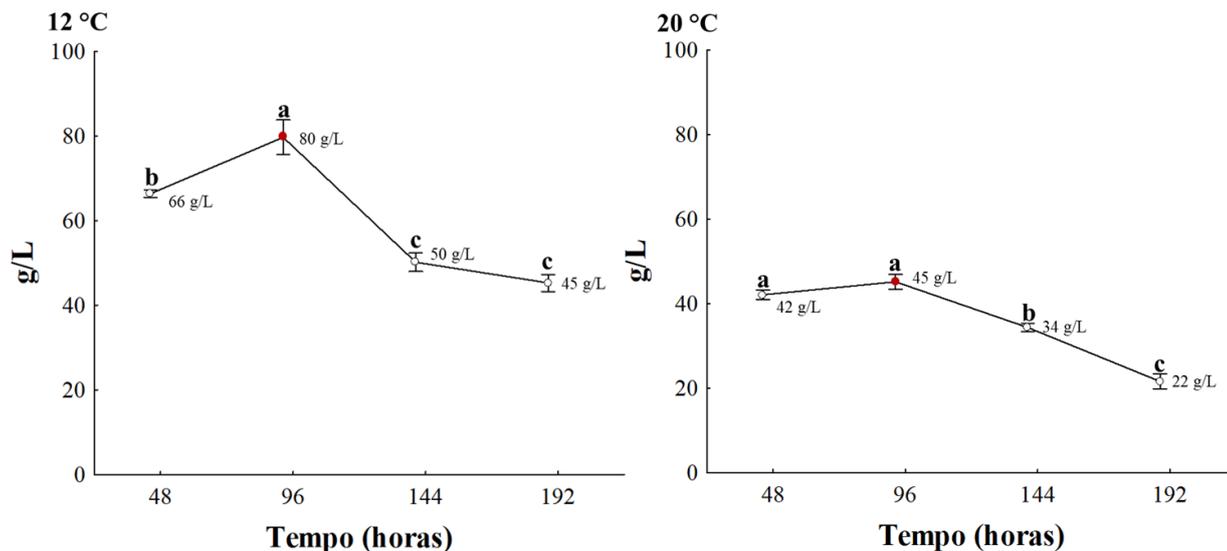
Quanto ao consumo de açúcares redutores e o teor alcoólico, nesse tipo de cofermentação (tardia), a temperatura influenciou as co-culturas dos controles positivos com os isolados de ambas as espécies estudadas. Assim como na cofermentação simultânea, a maior temperatura apresentou menor concentração de açúcares residuais tanto para a co-cultura do controle positivo com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (41,22 g/L com 20°C contra 58,27 g/L a 12°C) quanto para a co-cultura do controle positivo com o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (35,77 g/L com 20°C contra 60,39 g/L a 12°C) (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação tardia da co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com os controles positivos a 12°C e 20°C. Os pontos vermelhos indicam o tempo 24 horas após a adição dos controles positivos.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

Figura 25 - Comparação, segundo teste de Tukey, entre as concentrações de açúcares redutores obtidas durante as horas da cofermentação tardia da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com os controles positivos a 12°C e 20°C. Os pontos vermelhos indicam o tempo 24 horas após a adição dos controles positivos.



Letras minúsculas comparam médias das concentrações de açúcares redutores entre as horas de fermentação na mesma temperatura.

A maior temperatura também resultou no maior teor alcoólico tanto para a co-cultura do controle positivo com o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (3,88 % a 20°C e 1,65 % a 12°C) quanto para a co-cultura do controle positivo com o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) (4,00 % a 20°C e 1,69 % a 12°C).

## 5.2 Estudo 2 – DCCR1

### 5.2.1 Resultados do DCCR1 para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C)

Os resultados do DCCR1 para a espécie *W. anomalus* (53C) a respeito da viabilidade celular no último dia de fermentação indicam que os coeficientes lineares da concentração inicial de leveduras e da temperatura apresentaram efeitos significativos. Enquanto o coeficiente linear da concentração inicial de leveduras exerceu efeito positivo, o coeficiente linear da temperatura exerceu efeito negativo sob essa variável resposta (Tabela 14).

Tabela 14 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação sobre a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	90,740	0,951	95,464	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	4,427	1,344	3,293	0,046
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	3,668	1,503	2,440	0,092
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	-9,401	1,344	-6,994	0,006
<b>Temperatura (Q)</b>	-3,669	1,503	-2,441	0,092
<b>1Lx 2L</b>	5,103	1,901	2,684	0,075

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

A partir da análise de variância da concentração de açúcares redutores observa-se que a falta de ajuste não apresentou significância, tornando assim o modelo preditivo (Tabela 15). Contudo, o R<sup>2</sup> do modelo obtido usando somente os coeficientes significativos foi de 0,62, considerado um R<sup>2</sup> baixo, uma vez que ele explica somente 62% da variabilidade dos resultados dessa variável resposta.

Tabela 15 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtido pelo programa *Statistica 7.0* para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	39,194	1	39,194	10,845	0,046	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	21,524	1	21,524	5,956	0,092	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	176,769	1	176,769	48,914	0,006	
<b>Temperatura (Q)</b>	21,539	1	21,539	5,960	0,092	
<b>1Lx 2L</b>	26,039	1	26,039	7,205	0,075	
<b>Fa</b>	124,365	6	20,727	5,735	0,090	6,94
<b>Erro Puro</b>	10,842	3	3,614			
<b>Total</b>	351,170	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcalc= F calculado; Ftab = F tabelado

Quanto a concentração de açúcares redutores, nenhuma variável independente apresentou efeito significativo no fim da fermentação (Tabela 16). Assim como ocorreu para a viabilidade celular, a análise de variância da concentração de açúcares redutores indicou que a falta de ajuste não apresentou significância, tornando assim o modelo obtido preditivo (Tabela 17). Contudo, novamente o R<sup>2</sup> do modelo obtido usando somente os coeficientes significativos foi baixo (0,58) e explica somente 58 % da variabilidade

Tabela 16 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	66,001	2,855	23,118	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	6,256	4,038	1,550	0,219
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	1,597	4,514	0,354	0,747
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	-7,385	4,038	-1,829	0,165
<b>Temperatura (Q)</b>	-3,356	4,514	-0,743	0,511
<b>1Lx 2L</b>	-12,778	5,710	-2,238	0,111

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

Tabela 17 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
--	-----------	-----------	-----------	--------------	----------------	-------------

<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	78,283	1	78,283	2,401	0,219	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	4,082	1	4,082	0,125	0,747	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	109,070	1	109,070	3,345	0,165	
<b>Temperatura (Q)</b>	18,021	1	18,021	0,553	0,511	
<b>1Lx 2L</b>	163,282	1	163,282	5,008	0,111	
<b>Fa</b>	176,493	3	58,831	1,804	0,320	9,28
<b>Erro Puro</b>	97,812	3	32,604			
<b>Total</b>	651,538	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

O teor alcoólico foi a variável resposta mais afetada pelas variáveis independentes estudadas. Somente o coeficiente linear da temperatura não teve efeito significativo sobre essa variável resposta. Todos os coeficientes com efeitos significativos apresentaram efeito positivo sobre o teor alcoólico (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	0,577	0,015	38,356	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,097	0,021	4,572	0,020
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,204	0,024	8,590	0,003
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,036	0,021	1,706	0,186
<b>Temperatura (Q)</b>	0,183	0,024	7,706	0,005
<b>1Lx 2L</b>	0,104	0,030	3,464	0,041

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

Com base nos resultados da ANOVA para o teor alcoólico, o modelo criado é considerado preditivo por não apresentar significância para a falta de ajuste (Tabela 19). Além de ser preditivo, o R<sup>2</sup> resultante do modelo usando os coeficientes significativos foi 0,86 (Equação 4), ou seja, esse modelo explica 86% da variação dos resultados do teor alcoólico.

Tabela 19 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statística 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,019	1	0,019	20,904	0,0196	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,067	1	0,067	73,782	0,0033	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,003	1	0,003	2,911	0,1865	
<b>Temperatura (Q)</b>	0,054	1	0,054	59,388	0,0045	
<b>1Lx 2L</b>	0,011	1	0,011	12,000	0,0405	
<b>Fa</b>	0,018	4	0,005	5,00	0,109	9,12
<b>Erro Puro</b>	0,003	3	0,001			
<b>Total</b>	0,151	11				

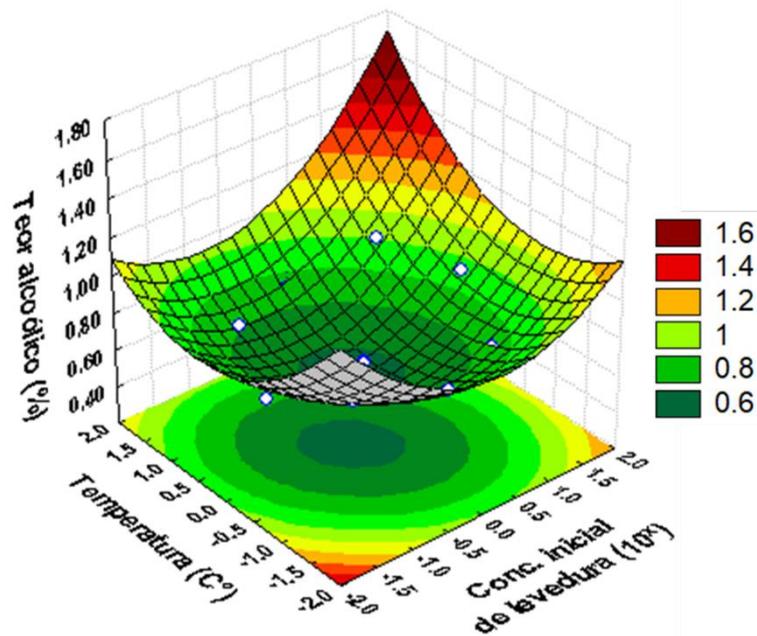
(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

$$\text{Teor alcoólico} = 0,577 + 0,049x_1 + 0,102x_1^2 + 0,052 x_1x_2 - 0,092x_2^2 \quad (4)$$

O programa *Statística 7.0*, indica que para se obter o maior teor de álcool (0,57%), usando o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) em uma fermentação de sete dias com mosto de 9°P, o ideal seria usar uma concentração de levedura inicial de  $5 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> e uma temperatura de 20°C (ponto central codificado de ambas as variáveis). Lembrando que esses valores são baseados no modelo matemático gerado pelo programa, o qual considera todos os coeficientes da regressão e obteve um R<sup>2</sup> de 0,88.

O gráfico de superfície de resposta, também criado com base no modelo gerado pelo programa *Statística 7.0*, indica que para alcançar maiores teores alcoólicos recomenda-se a utilização de concentrações de levedura inicial maiores e temperaturas mais elevadas. Se o objetivo é a produção de baixos teores alcoólicos recomenda-se o uso de menores concentrações de levedura inicial e de temperaturas mais baixas (Figura 26).

Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR1 usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C), o qual relaciona a temperatura (C°) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados.



### 5.2.2 Resultados do DCCR1 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I)

Os resultados do DCCR1 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) obtidos no último dia de fermentação indicam que o coeficiente quadrático da concentração inicial de leveduras e o coeficiente linear da temperatura apresentaram efeitos significativos sobre a viabilidade celular. Enquanto o coeficiente quadrático da concentração inicial de leveduras exerceu efeito positivo, o coeficiente linear da temperatura exerceu efeito negativo sob essa variável resposta (Tabela 20).

Tabela 20 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	87,782	1,084	81,014	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	3,984	1,532	2,600	0,080
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	8,066	1,713	4,708	0,018
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	-8,113	1,532	-5,295	0,013
<b>Temperatura (Q)</b>	2,563	1,713	1,496	0,232
<b>1Lx 2L</b>	2,940	2,167	1,357	0,268

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

A análise de variância da viabilidade celular indica que a falta de ajuste não apresentou significância, demonstrando que o modelo é preditivo (Tabela 21). Além disso, o R<sup>2</sup> do modelo obtido, usando somente os coeficientes significativos, foi de 0,70, portanto ele explica 70% da variabilidade dos resultados dessa variável resposta (Equação 5).

Tabela 21 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	31,751	1	31,751	6,761	0,080	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	104,093	1	104,093	22,165	0,018	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	131,648	1	131,648	28,032	0,013	
<b>Temperatura (Q)</b>	10,511	1	10,511	2,238	0,232	
<b>1Lx 2L</b>	8,646	1	8,646	1,841	0,268	
<b>Fa</b>	82,849	6	13,808	2,940	0,202	6,94
<b>Erro Puro</b>	14,089	3	4,696			
<b>Total</b>	323,67	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcalc= F calculado; Ftab = F tabelado

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = 88,807 + 3,777x_1^2 - 4,057x_2 \quad (5)$$

Assim como ocorreu com o isolado anterior, nenhuma variável independente apresentou efeito significativo sobre a concentração de açúcares redutores para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) (Tabela 22).

Tabela 22 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	64,135	4,476	14,327	0,001
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	7,607	6,331	1,202	0,316
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-7,609	7,078	-1,075	0,361
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	2,846	6,331	0,450	0,684
<b>Temperatura (Q)</b>	-1,508	7,078	-0,213	0,845
<b>1Lx 2L</b>	-1,938	8,953	-0,216	0,842

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

A análise de variância da concentração de açúcares redutores novamente indicou que a falta de ajuste não apresentou significância, tornando assim o modelo obtido preditivo (Tabela 23). Contudo, novamente o R<sup>2</sup> do modelo obtido usando somente os coeficientes significativos foi baixo (0,42) e explica somente 42 % da variabilidade das respostas da concentração de açúcares redutores.

Tabela 23 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	115,720	1	115,720	1,444	0,316	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	92,647	1	92,647	1,156	0,361	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	16,197	1	16,197	0,202	0,684	
<b>Temperatura (Q)</b>	3,636	1	3,636	0,045	0,845	
<b>1Lx 2L</b>	3,757	1	3,757	0,047	0,842	
<b>Fa</b>	75,891	3	25,297	0,316	0,816	9,28
<b>Erro Puro</b>	240,460	3	80,153			
<b>Total</b>	544,671	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

Para o teor alcoólico, somente o coeficiente quadrático da temperatura foi significativo e apresentou efeito negativo sobre essa variável resposta (Tabela 24). Assim como para as variáveis respostas anteriores, a análise de variância apontou a falta de ajuste como não significativa, indicando se tratar de um modelo preditivo (Tabela 25). No entanto, o R<sup>2</sup> do

modelo obtido usando somente os coeficientes significativos foi baixo (0,42). Assim como para a concentração de açúcares redutores esse modelo explica somente 42 % da variabilidade das respostas do teor alcoólico.

Tabela 24 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	0,829	0,0399	20,784	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,124	0,0564	2,193	0,116
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-0,008	0,0631	-0,134	0,902
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,165	0,0564	2,922	0,061
<b>Temperatura (Q)</b>	-0,257	0,0631	-4,077	0,027
<b>1Lx 2L</b>	0,066	0,0798	0,825	0,470

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

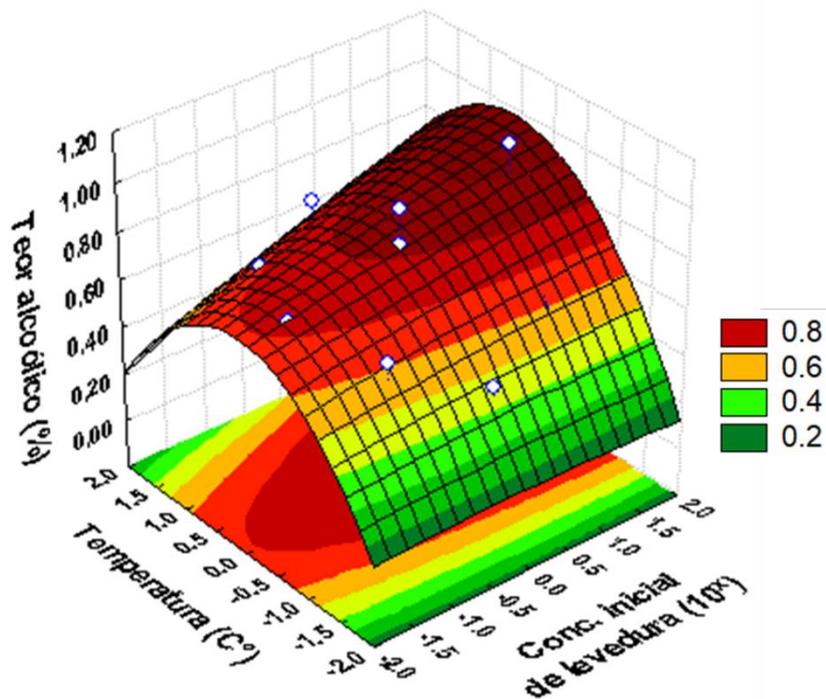
Tabela 25 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR1.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,031	1	0,031	4,810	0,116	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,000	1	0,000	0,018	0,902	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,054	1	0,054	8,537	0,061	
<b>Temperatura (Q)</b>	0,106	1	0,106	16,62 0	0,027	
<b>1Lx 2L</b>	0,004	1	0,004	0,680	0,470	
<b>Fa</b>	0,132	7	0,019	2,96	0,201	8,89
<b>Erro Puro</b>	0,019	3	0,006			
<b>Total</b>	0,260	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

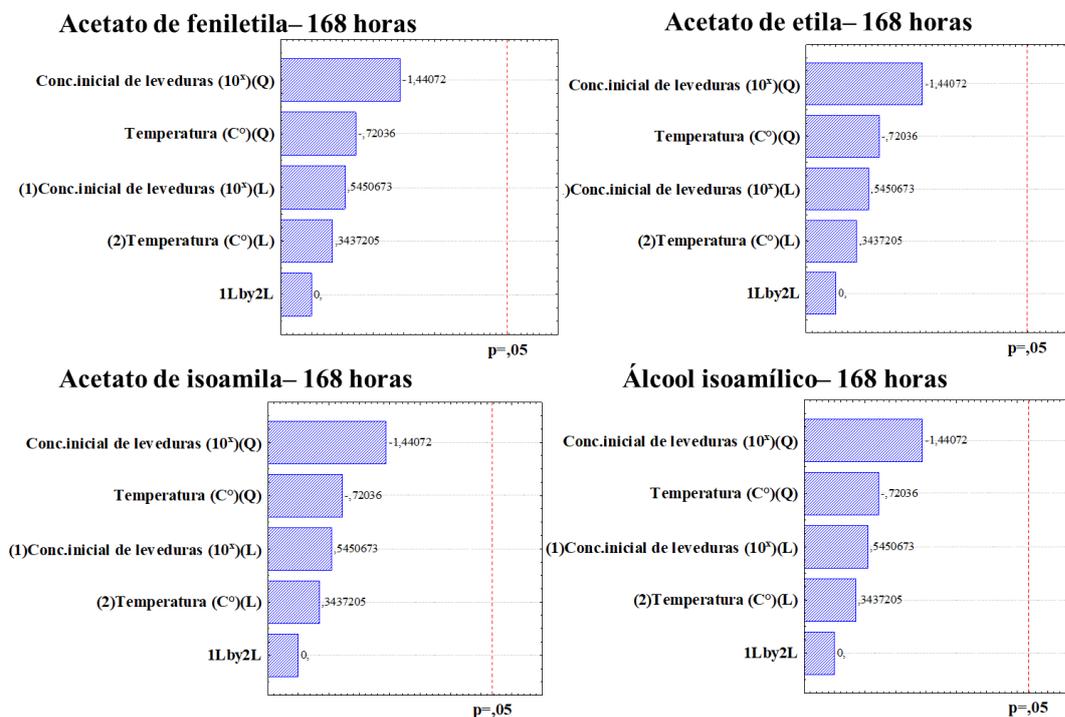
Apesar dos dados para o teor alcoólico não resultarem na geração de um modelo matemático com R<sup>2</sup> satisfatório, foi gerado um gráfico de superfície de resposta que indica a tendência dessa variável resposta para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I). Portanto, para obter maior teor alcoólico usando essa espécie é indicado utilizar uma temperatura próxima de 20°C (ou ponto central codificado). Porém, se o objetivo é obter um menor teor alcoólico é indicado o uso de temperaturas mais baixas (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR1 usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o qual relaciona a temperatura (C°) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados.



Os resultados obtidos para a produção de acetato de feniletila, acetato de etila, acetato de isoamila e álcool isoamílico pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) apontam que nenhuma variável independente estudada no DCCR1 apresentou efeito significativo (Figura 28).

Figura 28 - Diagramas de pareto demonstrando se o efeito das variáveis independentes ou sua interação apresentaram significância sobre os compostos aromáticos determinados com 168 horas de fermentação usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I).



Variável independente significativa = coluna azul da variável independente passa a linha vertical vermelha; Variável independente não significativa = coluna azul da variável independente não passa a linha vertical vermelha.

Mesmo nenhuma variável independente sendo significativa, constata-se a partir da tabela 26 que o acetato de etila foi produzido somente pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) e não pelos controles positivos S-23 e T-58. Porém, esses controles positivos produziram maiores concentrações de fenilacetato. O controle positivo S-23 produziu a maior concentração de acetato de isoamila e álcool isoamílico. No entanto, quando comparado ao controle positivo T-58, alguns ensaios do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) apresentaram maiores concentrações desses compostos aromáticos.

Além disso, no desenvolvimento desses DCCR1, foi constatado que em temperaturas mais elevadas os isolados de ambas as espécies de leveduras não convencionais exalaram um aroma de acetona e produziram um aglomerado de células nas paredes dos *Erlenmeyers*.

Tabela 26 - Dados obtidos da produção dos compostos aromáticos usando os ensaios do DCCR1 do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o controle negativo (C1), os controles positivos S23 (*S. pastorianus*) e T58 (*S. cerevisiae*) com 168 horas de fermentação.

Ensaio	Acetato de etila ( $\mu\text{g/L}$ )	Acetato de Isoamila ( $\mu\text{g/L}$ )	Álcool isoamílico ( $\mu\text{g/L}$ )	Feniletacetato ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>1</b>	15.84 $\pm$ 2.51	26.78 $\pm$ 1.19	71.91 $\pm$ 2.51	58.39 $\pm$ 0.43
<b>2</b>	165.75 $\pm$ 14.33	100.12 $\pm$ 20.47	29.80 $\pm$ 3.09	146.21 $\pm$ 22.63
<b>3</b>	56.78 $\pm$ 8.22	20.86 $\pm$ 2.02	51.68 $\pm$ 2.28	126.91 $\pm$ 1.36
<b>4</b>	55.67 $\pm$ 6.90	87.16 $\pm$ 6.27	18.64 $\pm$ 0.46	209.10 $\pm$ 38.35
<b>5</b>	156.80 $\pm$ 12.85	167.88 $\pm$ 18.12	36.21 $\pm$ 5.28	330.03 $\pm$ 13.10
<b>6</b>	177.81 $\pm$ 12.27	213.05 $\pm$ 23.61	37.95 $\pm$ 3.78	411.86 $\pm$ 40.11
<b>7</b>	50.00 $\pm$ 3.61	37.18 $\pm$ 1.11	39.35 $\pm$ 0.55	154.61 $\pm$ 11.01
<b>8</b>	177.81 $\pm$ 12.27	213.05 $\pm$ 23.61	37.95 $\pm$ 3.78	411.86 $\pm$ 40.11
<b>9</b>	12.01 $\pm$ 0.96	35.53 $\pm$ 0.50	81.34 $\pm$ 2.02	131.83 $\pm$ 18.33
<b>10</b>	138.67 $\pm$ 7.52	162.51 $\pm$ 16.09	23.85 $\pm$ 2.05	423.56 $\pm$ 14.96
<b>11</b>	174.51 $\pm$ 2.29	197.51 $\pm$ 16.24	30.88 $\pm$ 1.51	324.25 $\pm$ 29.97
<b>12</b>	166.67 $\pm$ 14.99	166.47 $\pm$ 29.71	35.00 $\pm$ 3.71	403.61 $\pm$ 72.16
<b>C1</b>	24.15 $\pm$ 2.29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	28.03 $\pm$ 4.51
<b>S23</b>	<i>n.d.</i>	259.10 $\pm$ 24.15	86.96 $\pm$ 10.54	699.98 $\pm$ 72.83
<b>T58</b>	<i>n.d.</i>	129.55 $\pm$ 20.27	51.04 $\pm$ 3.03	767.01 $\pm$ 122.61

### 5.3 Estudo 3 - DCCR2

#### 5.3.1 Resultados do DCCR2 para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C)

Os dados do último dia de fermentação do DCCR2 do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) indicam que para a viabilidade celular nenhuma variável independente teve efeito significativo (Tabela 27).

Tabela 27 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR2.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	98,319	0,434	226,706	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,257	0,613	0,420	0,703
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,192	0,686	0,280	0,798
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	-1,312	0,613	-2,139	0,122
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	1,058	0,686	1,542	0,221
<b>1Lx 2L</b>	-0,993	0,867	-1,145	0,335

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

A partir da análise de variância observa-se que para essa variável resposta não houve falta de ajuste, indicando se tratar de um modelo preditivo (Tabela 28). No entanto, o R<sup>2</sup> do modelo obtido foi baixo (0,42) e explica somente 42 % da variabilidade das respostas da viabilidade celular.

Tabela 28 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR2.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,132	1	0,132	0,176	0,703	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,059	1	0,059	0,078	0,798	
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	3,441	1	3,441	4,574	0,122	
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	1,790	1	1,790	2,379	0,221	
<b>1Lx 2L</b>	0,986	1	0,986	1,310	0,335	
<b>Fa</b>	6,504	3	2,168	2,882	0,204	9,28
<b>Erro Puro</b>	2,257	3	0,752			
<b>Total</b>	15,111	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

Os resultados referentes a concentração de açúcares redutores indicam que os coeficientes lineares e quadráticos da concentração inicial do mosto tiveram efeito significativo sobre essa variável resposta. Enquanto o coeficiente linear da concentração inicial do mosto exerceu efeito positivo, o coeficiente quadrático exerceu efeito negativo sobre essa variável resposta. Contudo, é possível perceber pelos valores de p que a significância do coeficiente

linear da concentração inicial do mosto foi maior do que do coeficiente quadrático desta variável independente (Tabela 29).

Tabela 29 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR2.

	Efeito	Erro puro	t(3)	p
<b>Média</b>	140,766	4,353	32,337	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	7,686	6,156	1,248	0,300
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-13,567	6,883	-1,971	0,143
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	68,113	6,156	11,064	0,002
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	-31,285	6,883	-4,545	0,020
<b>1Lx 2L</b>	11,692	8,706	1,343	0,272

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

A análise de variância feita para a concentração de açúcares redutores novamente indicou que a falta de ajuste não apresentou significância, tornando assim o modelo obtido preditivo (Tabela 30). Além disso, o R<sup>2</sup> obtido para o modelo, usando somente os coeficientes significativos (Equação 6), foi de 0,91, indicando que esse modelo explica 91 % da variação dos dados obtidos para a concentração de açúcares redutores.

$$\text{Conc. açúcares redutores (g/L)} = 135,339 + 34,056 - 14,286x_2^2 \quad (6)$$

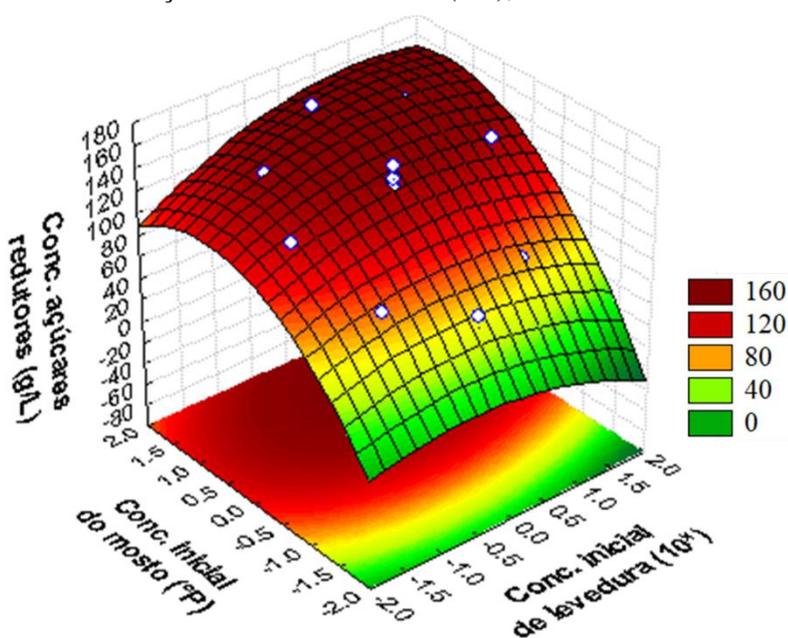
Tabela 30 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) no DCCR2.

	SQ	GL	MQ	Fcalc	Valor p	Ftab
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	118,142	1	118,142	1,559	0,300	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	294,515	1	294,515	3,885	0,143	
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	9278,687	1	9278,687	122,4	0,002	
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	1566,028	1	1566,028	20,66	0,020	
<b>1Lx 2L</b>	136,710	1	136,710	1,804	0,272	
<b>Fa</b>	771,963	6	128,660	1,697	0,356	6,94
<b>Erro Puro</b>	227,396	3	75,799			
<b>Total</b>	11638,624	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcalc= F calculado; Ftab = F tabelado

O gráfico de superfície de resposta da concentração de açúcares redutores, gerado a partir do modelo matemático criado pelo programa *Statistica 7.0*, o qual considera todos os coeficientes da regressão e obteve um  $R^2$  de 0,96, indica que quanto maior a concentração inicial do mosto maior a concentração final de açúcares redutores. Apontando assim, que concentração inicial do mosto é diretamente proporcional a concentração final de açúcares redutores (Figura 29).

Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 usando o isolado da espécie *W. anomalous* (53C), o qual relaciona a concentração inicial do mosto (°P) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados.



Referente a produção de álcool, somente o coeficiente linear da concentração inicial apresentou efeito significativo, o qual foi positivo assim como ocorreu com a concentração de açúcares redutores (Tabela 31).

O modelo obtido para essa variável resposta não apresentou falta de ajuste segundo a análise de variância, tornando-o preditivo (Tabela 32). Ademais, o  $R^2$  desse modelo foi de 0,84, ou seja, 84% da variação dos resultados do teor alcoólico é explicada por esse modelo (Equação 7).

Tabela 31 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR2.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	0,992	0,075	13,306	0,001
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,056	0,105	0,533	0,631
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,223	0,118	1,893	0,155
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	0,856	0,105	8,124	0,004
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	0,056	0,118	0,477	0,666
<b>1Lx 2L</b>	-0,163	0,149	-1,093	0,354

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

Tabela 32 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) no DCCR2.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,006	1	0,006	0,284	0,631	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,080	1	0,080	3,583	0,155	
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	1,467	1	1,467	65,996	0,004	
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	0,005	1	0,005	0,228	0,666	
<b>1Lx 2L</b>	0,027	1	0,027	1,194	0,354	
<b>Fa</b>	0,210	7	0,030	1,352	0,439	8,89
<b>Erro Puro</b>	0,067	3	0,022			
<b>Total</b>	1,744	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

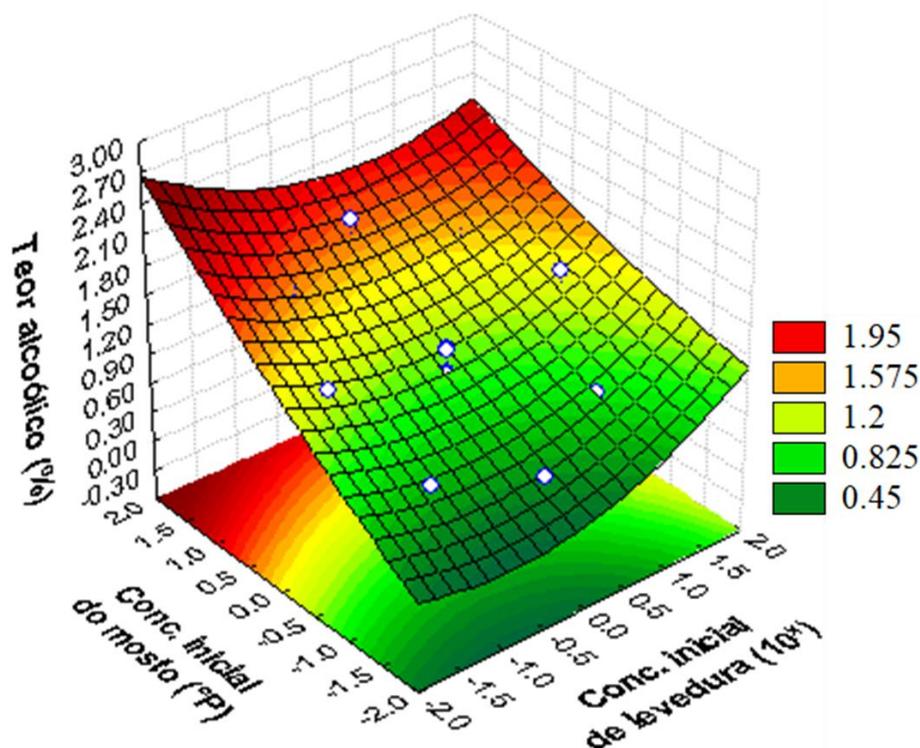
$$\text{Teor alcoólico (\%)} = 1,085 + 0,428x_2 \quad (7)$$

O programa *Statistica 7.0*, indica que para se obter o maior teor de álcool (1,99%) usando o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) em uma fermentação de sete dias a 14 °C, o ideal seria usar uma concentração de levedura inicial de  $5 \times 10^4$  células. mL<sup>-1</sup> (-1,41 codificado) e uma concentração inicial de mosto de 18°P (+1,41 codificado). Ressaltando que esses valores são baseados no modelo matemático gerado pelo programa, o qual considera todos os coeficientes da regressão e obteve um R<sup>2</sup> de 0,91.

Essa tendência também pode ser observada a partir do gráfico de superfície de resposta do teor alcoólico. Portanto, constata-se que assim como ocorreu para a concentração de

açúcares redutores, a concentração inicial do mosto é diretamente proporcional ao teor alcoólico. Ou seja, para obter teores alcoólicos maiores indica-se o uso de mostos com maiores concentrações e para obter menores teores alcoólico o uso de mostos com menores concentrações (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR2 usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C), o qual relaciona a concentração inicial do mosto (°P) com a concentração inicial de leveduras ( $10^8$ ), usando seus valores codificados.



### 5.3.2 Resultados do DCRR2 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I).

Os dados do último dia de fermentação do DCCR2 apontam que para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), assim como ocorreu com o isolado anterior, nenhuma variável independente usada nesse planejamento estatístico teve efeito significativo sobre a viabilidade celular (Tabela 33). A análise de variância para essa variável resposta indica que esse modelo é preditivo por não haver falta de ajuste (Tabela 34). Porém, o  $R^2$  desse modelo foi de 0,30, sendo considerado um valor muito baixo, dado que ele explica somente 30% da variabilidade das respostas da viabilidade celular.

Tabela 33 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	98,718	0,973	101,502	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	-1,284	1,375	-0,933	0,419
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,062	1,538	0,040	0,970
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	1,041	1,375	0,757	0,504
<b>Temperatura (Q)</b>	-2,998	1,538	-1,950	0,146
<b>1Lx 2L</b>	0,016	1,945	0,008	0,994

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

Tabela 34 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a viabilidade celular com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	3,297	1	3,297	0,871	0,419	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,006	1	0,006	0,002	0,970	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	2,168	1	2,168	0,573	0,504	
<b>Temperatura (Q)</b>	14,382	1	14,382	3,801	0,146	
<b>1Lx 2L</b>	0,000	1	0,000	0,000	0,994	
<b>Fa</b>	36,287	3	12,095	3,197	0,183	9,28
<b>Erro Puro</b>	11,351	3	3,784			
<b>Total</b>	68,214	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcalc= F calculado; Ftab = F tabelado

Referente a concentração de açúcares redutores, somente o coeficiente linear da concentração inicial do mosto apresentou efeito significativo, o qual foi positivo (Tabela 35). O modelo obtido não apresentou falta de ajuste segundo a análise de variância, ou seja, ele é considerado preditivo (Tabela 36). Além de preditivo, o R<sup>2</sup> desse modelo foi de 0,90, sendo considerado um R<sup>2</sup> muito bom, já que ele explica 90% da variação dos resultados da concentração de açúcares redutores (Equação 8).

Tabela 35 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para a concentração de açúcares com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	133,250	6,398	20,828	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	3,958	9,048	0,438	0,691
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	9,620	10,116	0,951	0,412
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	83,234	9,048	9,199	0,003
<b>Temperatura (Q)</b>	-17,168	10,116	-1,697	0,188
<b>1Lx 2L</b>	-14,487	12,795	-1,132	0,340

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

Tabela 36 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa *Statistica 7.0* para a concentração de açúcares redutores com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

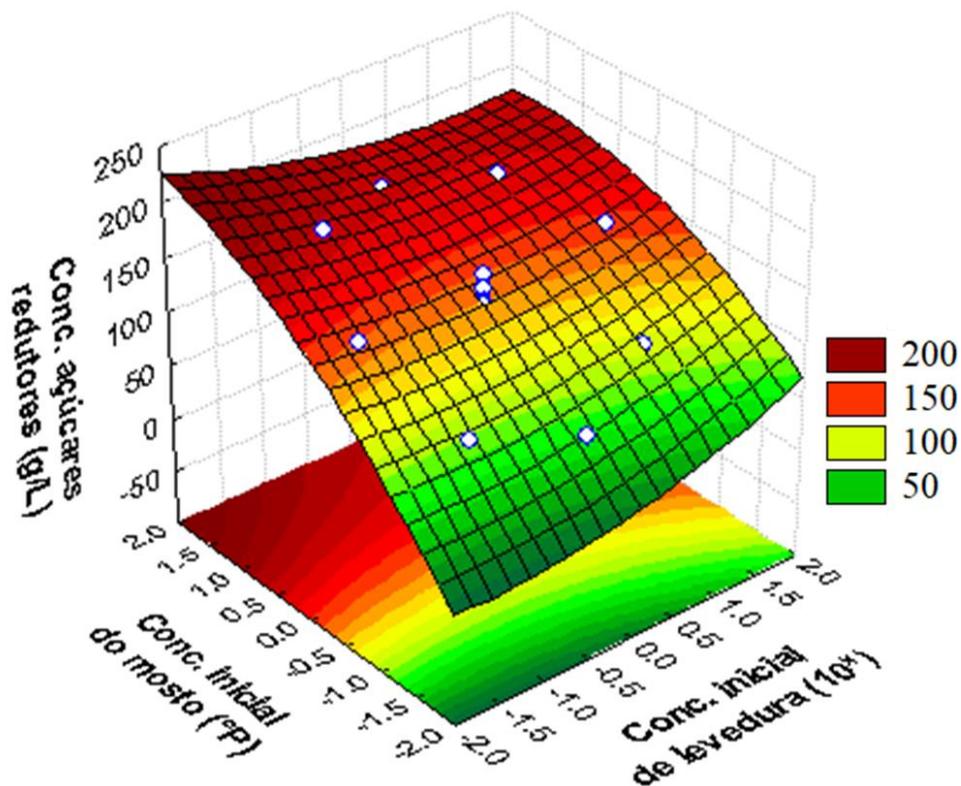
	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	31,338	1	31,338	0,191	0,691	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	148,077	1	148,077	0,904	0,412	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	13855,888	1	13855,888	84,63	0,003	
<b>Temperatura (Q)</b>	471,599	1	471,599	2,880	0,188	
<b>1Lx 2L</b>	209,878	1	209,878	1,282	0,340	
<b>Fa</b>	1134,204	7	162,029	0,990	0,5569	8,89
<b>Erro Puro</b>	491,166	3	163,722			
<b>Total</b>	15481,257	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

$$\text{Con. açúcares redutores (g/L)} = 130,734 + 41,617x_2 \quad (8)$$

O gráfico de superfície de resposta da concentração de açúcares redutores, gerado a partir do modelo matemático criado pelo programa *Statistica 7.0*, que considera todos os coeficientes da regressão e obteve um R<sup>2</sup> de 0,96, indica que concentração inicial do mosto é diretamente proporcional a concentração final de açúcares redutores. A mesma tendência foi observada para o isolado anterior (Figura 31).

Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o qual relaciona a concentração inicial do mosto (°P) com a concentração inicial de leveduras ( $10^x$ ), usando seus valores codificados.



A respeito do teor alcoólico produzido pelo isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), assim como para a concentração de açúcares redutores, somente o coeficiente linear da concentração inicial do mosto foi significativo, apresentando efeito positivo sobre o teor alcoólico (Tabela 37). O modelo obtido foi considerado preditivo pois não apresentou falta de ajuste segundo a análise de variância (Tabela 38). Além de preditivo, o modelo apresentou um  $R^2$  de 0,87, desta foram, ele explica 87% da variação dos resultados do teor alcoólico (Equação 9).

Tabela 37 - Efeitos das variáveis independentes e sua interação para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	1,185	0,068	17,433	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	-0,099	0,096	-1,028	0,380
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-0,066	0,107	-0,614	0,582
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,830	0,096	8,633	0,003
<b>Temperatura (Q)</b>	-0,233	0,107	-2,169	0,119
<b>1Lx 2L</b>	-0,035	0,136	-0,254	0,816

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático

Tabela 38 - Resultado de análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para o teor alcoólico com 168 horas de fermentação para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) no DCCR2.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>Valor p</b>	<b>Ftab</b>
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,020	1	0,020	1,057	0,380	
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,007	1	0,007	0,377	0,582	
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	1,377	1	1,377	74,52	0,003	2
<b>Temperatura (Q)</b>	0,087	1	0,087	4,704	0,119	
<b>1Lx 2L</b>	0,001	1	0,001	0,064	0,816	
<b>Fa</b>	0,143	7	0,020	1,106	0,5143	8,89
<b>Erro Puro</b>	0,055	3	0,018			
<b>Total</b>	1,575	11				

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático; Fa = falta de ajuste; SQ = Soma Quadrática; GL = grau de liberdade; MQ= Média quadrática; Fcal= F calculado; Ftab = F tabelado

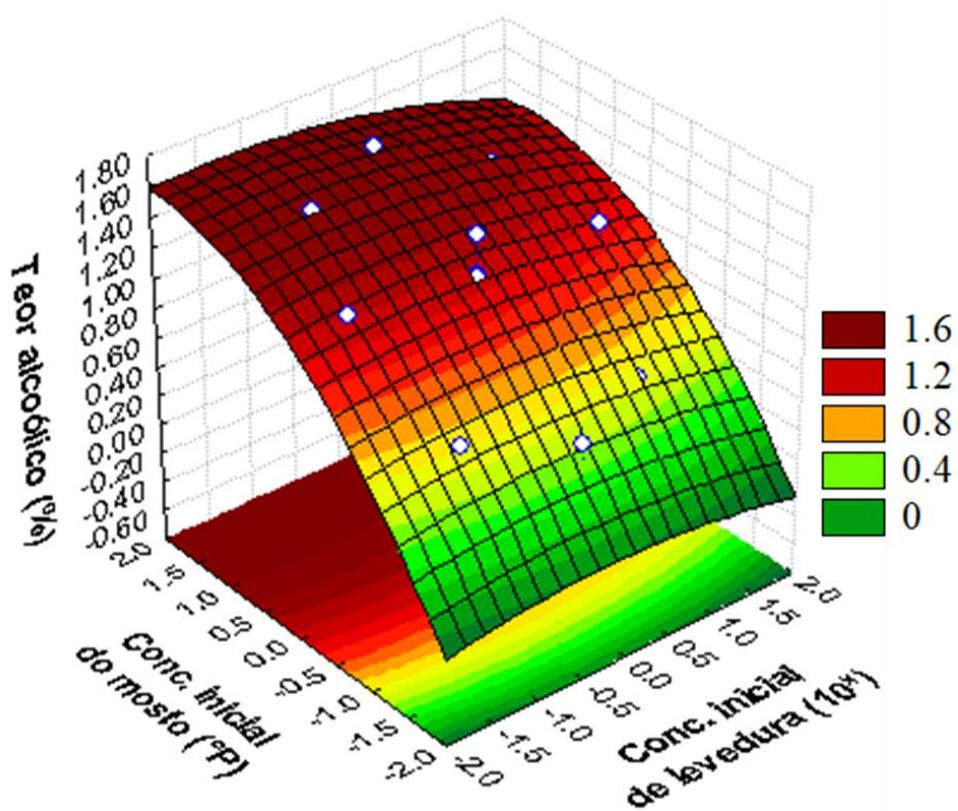
$$\text{Teor alcoólico (\%)} = 1,085 + 0,415x_2 \text{ (9)}$$

O programa *Statistica 7.0*, indica que para se obter o maior teor de álcool (1,60%), usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) em uma fermentação de sete dias a 14 °C, o ideal seria usar uma concentração de levedura inicial de  $5 \times 10^5$  células. mL<sup>-1</sup> (-1,24 codificado) e uma concentração inicial de mosto de 19,5°P (1,87 codificado). Lembrando que esses valores são baseados no modelo matemático gerado pelo programa, o qual considera todos os coeficientes da regressão e obteve um R<sup>2</sup> de 0,94.

A partir do gráfico de superfície de resposta do teor alcoólico é possível verificar que a para obter maiores teores alcoólicos o melhor seria fazer usar de mostos com maiores concentrações iniciais e para obter menores teores alcoólicos o mais adequado seria usar mostos

com menores concentrações (Figura 32). Portanto, assim como ocorreu para a concentração de açúcares redutores constata-se que, a concentração inicial do mosto é diretamente proporcional ao teor alcoólico.

Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta referente ao teor alcoólico do DCCR2 usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), o qual relaciona a concentração inicial do mosto (°P) com a concentração inicial de leveduras (10<sup>x</sup>), usando seus valores codificados.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Estudo 1 – Isolamento, purificação e identificação

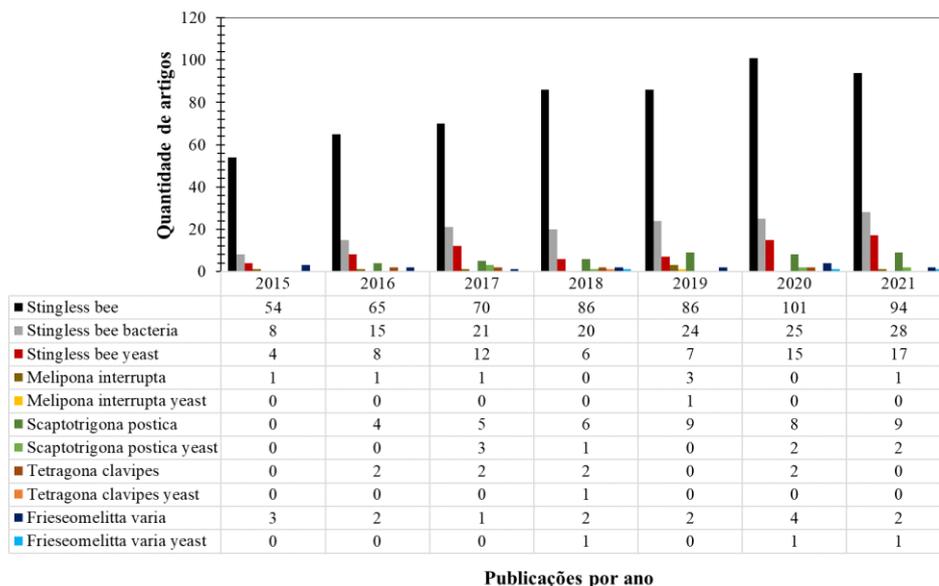
#### 6.1.1 Isolamento e purificação

As abelhas sem ferrão são conhecidas por serem generalistas contudo, dependendo da espécie, pode existir “preferência” por uma certa fonte vegetal, o que explicaria a presença de alguns morfotipos exclusivamente no pólen de uma das espécies de abelha estudadas (MICHENER, 2007). Já a presença compartilhada de alguns morfotipos entre duas espécies de abelhas sem ferrão pode ser explicada pela possível associação dessas leveduras com os ninhos dessas abelhas sem ferrão, assim como pelos recursos de forrageamento em comum na área estudada. Essa associação é ratificada por Neto e Morais (2020) através da rede de relacionamento entre espécies de abelhas sem ferrão criada pelas leveduras presentes nos ninhos das abelhas. Nessa rede, assim como no presente estudo, é possível verificar a relação entre as espécies *Scaptotrigona postica* e *Frieseomelitta varia* que possuem espécies de leveduras em comum e outras exclusivas.

O fato da espécie *Melipona (Melikerria) interrupta* ter apresentado maior quantidade de morfotipos também foi ser constatado por Meireles (2018) em seu trabalho com o isolamento e identificação de leveduras de *Melipona (Melikerria) interrupta* e *Cephalotrigona femorata*. O estudo demonstrou que o pólen da primeira espécie de abelha apresentou maior quantidade de espécies de leveduras (6) quando comparada a outra abelha estudada (4 espécies de leveduras), tendo em vista a quantidade de espécies de leveduras total encontrada no pólen e não pensando nos diferentes locais estudados.

Portanto, a existência das leveduras no pólen das abelhas sem ferrão é mais do que comprovada através do presente estudo e dos trabalhos mencionados acima. Porém, o conhecimento a respeito da microbiota de leveduras presentes em certas espécies de abelhas sem ferrão, como por exemplo, as quatro estudadas nesse trabalho ainda é limitada (MENEZES *et al.*, 2013). Essa realidade é reforçada pelas informações contidas na figura 33 na qual comprova-se que além de não existir muitos artigos a respeito das quatro espécies de abelhas sem ferrão estudadas, a quantidade de artigos relacionando essas espécies com a presença de leveduras é ainda menor ou nula.

Figura 33- Gráfico resultante da pesquisa realizada no site *ScienceDirect* para os títulos: Stingless bee, Stingless bee bacteria, Stingless bee yeast, cada uma das quatro espécies estudadas e a associação das mesmas com leveduras no período de 2015 até 2021



### 6.1.2 Teste qualitativo de potencial fermentativo de maltose

Quando se imagina algum processo fermentativo envolvendo uso de açúcares para a produção de álcool é comum lembrar da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que se destaca em todos os setores industriais envolvendo esse tipo de processo. Contudo, como foi possível constatar a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, algumas leveduras isoladas a partir do pólen das abelhas sem ferrão são capazes de fermentar a maltose, mesmo que em velocidade e quantidade menores do que uma *S. cerevisiae*. A maior parte dessas leveduras, também nomeadas como não-*Saccharomyces* ou como não convencionais, são conhecidas de fato por apresentarem metabolismo fraco para o processo fermentativo ou não completam o processo de fermentação alcoólica (CIANI e COMITINI, 2011; YE *et al.*, 2014).

Algumas espécies de leveduras não convencionais são fermentadoras de maltose como por exemplo a *Dekkera bruxellensis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii* e *Candida zemplinina*. Normalmente essas espécies são relacionadas com a produção de bioetanol, destilados, cervejas e tequilas (WALKER e WALKER, 2018). Contudo, mesmo fermentando a maltose algumas espécies não apresentam a produção de gás e sim de ácido, como a *W. anomalus* e *Saccharomycopsis fibuligera*, estudadas por Liu e colaboradores (2018). O trabalho de Li *et al.* (2019) com fermentação de massas, confirmou a baixa capacidade de fermentação dessas espécies, devido a sua baixa produção de gás e lenta

liberação do mesmo. Rijswijk *et al* (2017) trabalhando com as espécies *Cyberlindnera fabianii* e *Pichia kudriavzevii* também observaram esse contexto pois essas espécies usaram toda a glicose do meio e somente 1g/L de maltose. Essa baixa capacidade de fermentar a maltose deve estar relacionada a ausência ou a pouca presença dos *locus* independentes MAL (MAL1, MAL2, MAL3, MAL4 e MAL6), compostos por um gene de maltase intracelular, um gene de proteína de transporte de maltose e um gene de proteína reguladora positiva. A fermentação da maltose pode ser realizada com a presença de no mínimo um desses *locus*, no entanto, a presença de mais de um *locus* ou de todos os cinco, aumenta a capacidade de fermentação desse açúcar (NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004). Até o momento, pouco se sabe a respeito da presença dos *locus* de maltose nas leveduras não convencionais e não existem muito estudos que abordam esse tema. Um dos únicos estudos a respeito de gene de maltase nesse tipo de levedura foi conduzido por Viigand *et al.* (2005), os quais citam o gene de maltase HPMAL1 e o gene funcional maltose-permease HPMAL2 presente na espécie *Hansenula polymorpha*. Os autores também sugerem a existência de um gene ativador funcional MAL.

A maior capacidade de fermentar a maltose apresentada por alguns isolados quando previamente inoculados em YPD e outros em YPM, pode estar relacionada com a potencialização do funcionamento do seu metabolismo antes do processo fermentativo, decorrente da sua preferência pela fonte de açúcar previamente disponibilizada. Ademais, os isolados previamente inoculados em YPM podem ter adquirido predisposição ao consumo desse açúcar, facilitando o uso do mesmo na fermentação (JOSEPH e BACHHAWAT, 2014).

A partir do cenário apresentado acima, é possível notar que ainda existe uma lacuna na literatura no que diz respeito à fermentação de maltose por leveduras não convencionais.

### 6.1.3 Teste de resistência a alta concentração de açúcares

Geralmente as leveduras não convencionais são conhecidas por sobreviverem a altos teores de açúcares, ou seja, são osmotolerantes como afirma Mukherjee *et al.* (2017) para as leveduras não convencionais *Candida bombi*, *Candida metapsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Citeromyces matritensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces mellis* e *Zygosaccharomyces rouxii*. Esse cenário corrobora somente em parte com o que foi observado no presente estudo pois como foi visto, somente cinco isolados apresentaram bom crescimento nas menores e maiores concentrações de ambos os açúcares

utilizados. O pouco crescimento que alguns isolados apresentaram na maior concentração de glicose pode estar relacionado com a composição do pólen das abelhas sem ferrão do qual foram isolados, pois mesmo que a maioria dos estudos indicam que essas abelhas possuem alta concentrações de açúcares no seu pólen (REBELO *et al.*, 2016; CHUTTONG *et al.*, 2018), existem estudos que obtiveram baixa quantidade de carboidratos na composição do pólen de algumas espécies dessas abelhas. Um exemplo é espécie *Tetragonisca angustula*, que apresentou de 27,62 a 31.03 g/100g de carboidrato total no seu pólen e a espécie *Melipona mandacaia* com 12  $\pm$ 2g de açúcares totais (VIT *et al.*, 2016; BÁRBARA *et al.*, 2015). A dificuldade de crescimento em maiores concentrações de maltose que algumas leveduras possuem já foi constatada por Ravasio *et al.* (2018) trabalhando com *Candida kofuensis*, *Pichia farinosam*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri* *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces pastorianus*.

O crescimento de certos isolados somente em meio contendo glicose, demonstra que esses isolados não metabolizam a maltose. Essa falta de aptidão no uso desse açúcar pode estar relacionada ao fato desses isolados terem sido isolado do pólen das abelhas sem ferrão, que normalmente não possui maltose em sua composição e sim frutose, glicose e sacarose (SILVA *et al.*, 2014) e as vezes manitol (SILVA *et al.*, 2006). Apesar disso, sabe-se que o perfil físico-químico do pólen das abelhas sem ferrão depende muito da sua origem floral (que não foi avaliada neste estudo). Portanto, a habilidade de certos isolados em metabolizar esse açúcar pode estar relacionada à presença de maltose na composição do pólen de uma espécie dentre essas quatro estudadas, mesmo que em menor concentração (DUARTE *et al.*, 2018).

#### 6.1.4 Teste qualitativo do potencial de floculação

A floculação, ou seja, a habilidade que as células possuem de se manterem aderidas umas às outras e formaram flocos suspensos no meio de cultivo ou depositados no fundo do recipiente, é uma das características importantes nas leveduras cervejeiras (LI *et al.*, 2017). Esta característica classifica o tipo de cerveja produzida, em *Lager* ou *Ale*, principalmente na primeira, que normalmente utiliza leveduras com floculação que resultam em células no fundo do tanque de fermentação (GIBSON *et al.*, 2020). Contudo, como visto nos resultados, no presente estudo não foi verificado essa característica em nenhum dos isolados testados. O mesmo foi constatado por Matraxia *et al.* (2021) usando cepas da espécie *Hanseniaspora uvarum*. A ausência de floculação nas leveduras não convencionais pode estar relacionada com a falta de expressão dos genes FLO e a fatores ambientais, visto que a floculação é uma

característica influenciada pela temperatura, nutrientes, aeração, entre outros (SOARES, 2010; PANTELOGLOU e SMART, 2012, LI *et al.*, 2017). Contudo, a falta de floculação pode ser contornada utilizando a etapa de centrifugação que é realizada para a reutilização de leveduras em processos industriais (CAVALHEIRO, 2013). Além disso, a produção de cerveja artesanal que vem ganhando o mercado apresenta-se como um tipo de cerveja em que o importante é a criatividade, a inovação, o sabor, o aroma e a qualidade do produto desenvolvido (LI *et al.*, 2018). Portanto, a característica de flocular acaba não possuindo tanto peso como na produção das cervejas com classificações pré-estabelecidas como é o caso das cervejas *Lager* e *Ale*.

#### 6.1.5 Identificação molecular dos isolados

A espécie *Hanseniaspora opuntiae*, resultante da identificação do isolado 4I, já foi relacionada a produtos obtidos de abelhas sem ferrão anteriormente no estudo de Meireles (2018) com *Melipona interrupta* e a *Cephalotrigona femorata*. No entanto, em grande parte dos estudos essa espécie está relacionada às fases iniciais de fermentações espontâneas de frutas e na produção do vinho (BASTOS *et al.*, 2018). Além disso, geralmente as espécies de leveduras do gênero *Hanseniaspora* possuem como característica a colonização de ambientes ricos em açúcares (LIBKIND *et al.*, 2020). O que explicaria sua presença nas fases iniciais das fermentações, uma vez que essas fases possuem maior concentração de açúcares.

Um exemplo desse contexto é o trabalho de Ruiz-Moyano *et al.* (2016) no qual a espécie *H. opuntiae* representou 1,7% das leveduras presentes em figos. González-Quijano *et al.* (2014) também observaram a presença de *H. opuntiae*, mesmo que em menor concentração na fermentação da pimenta jalapenõ. A presença dessa espécie de levedura não convencional foi mais significativa no trabalho de Lima *et al.* (2021), os quais constataram que a *H. opuntiae* representou 98% das leveduras presente na fermentação do cacau. Figueroa-Hernandez *et al.* (2019) citam a *H. opuntiae* como uma espécie comum na fermentação do cacau. Recentemente, relatou-se a presença dessa espécie de levedura na película do kombucha, sendo a *H. opuntiae* apontada no mesmo estudo como a segunda levedura mais eficiente contra a degradação da aflatoxina AFB1, a qual ocasiona risco a saúde humana (TAHEUR *et al.*, 2020).

A espécie de levedura não convencional *Wickerhamomyces anomalus*, a qual corresponde ao isolado 53C, conhecida também pelo nome de *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*, é considerada uma espécie bem difundida na natureza e presente em diferentes materiais de plantas e no solo (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008). Basso *et al.* (2016) apontam a cerveja, a massa fermentada, frutas, o saquê e a madeira de

carvalho como locais onde a *W. anomalus* pode ser encontrada. Essa variedade de ambientes reforça a afirmação da *W. anomalus* ter vasta disseminação na natureza. Assim como a espécie *H. opuntiae*, a *W. anomalus* também é frequentemente associada a uva e a diferentes tipos de vinhos (PADILHA *et al.*, 2018) e ambientes fermentativos. Alguns exemplos são o estudo de Spitaels *et al.* (2014) que apontaram essa espécie de levedura como uma das mais frequentemente encontrada na fermentação espontânea da cerveja do tipo *Lambic* e o estudo de Porru *et al.* (2018) os quais observaram que as espécies de leveduras *W. anomalus* e *Nakazawaea molendini-olei* representaram 75% dos isolados obtidos da fermentação de azeitonas do cultivares Bosana. Essa espécie também foi apontada por Xie *et al.* (2018) como a levedura dominante no *sufu* (tofu fermentado), um alimento derivado da fermentação do grão de soja.

A espécie *Kodamaea ohmeri* correspondente aos demais isolados submetidos a identificação molecular já foi isolada na cerveja indígena conhecida como chicha (PILÓ *et al.*, 2018), em vinho de palmeira, o qual é confeccionado a partir da fermentação da seiva de palmeiras (OUOBA *et al.*, 2012), na fermentação da pimenta Jalapenõ (GONZÁLEZ-QUIJANO *et al.*, 2014) e no “pão de abelha” fresco da *Apis mellifera* (DETRY *et al.*, 2020). Contudo, mesmo essa espécie demonstrando uma forte ligação com ambientes fermentativos, alguns estudos vêm relacionando a *K. ohmeri* a infecções em humanos, que apesar de ocorrer raramente, tem capacidade de provocar severas infecções generalizadas em pacientes com fatores de risco, com queimaduras profundas ou imunocomprometidos (TASHIRO *et al.*, 2018; MTIBAA *et al.*, 2019). Somado a isso, o fato da *K. ohmeri* pertencer à mesma família da *Candida* faz com que na hora de ser diagnosticada ela seja comumente confundida com espécies de *Candida*. Todavia, o antifúngico *fluconazol* geralmente usado contra a *Candida* é menos eficiente contra a *K. ohmeri*, tornando-a mais infecciosa (HITAM, 2020).

Como foi possível notar, as três espécies identificadas no presente estudo estão intimamente ligadas a processos fermentativos, o que pode explicar o fato das mesmas estarem presentes no pólen das abelhas sem ferrão, o qual passa por um processo fermentativo depois de estocado nos potes (MENEZES *et al.*, 2018). Com base em todo o cenário apresentado anteriormente constata-se que dentre as espécies de leveduras não convencionais isoladas a *Hanseniaspora opuntiae* e a *Wickerhamomyces anomalus* são as que possuem maior potencial para serem usadas na indústria alimentícia.

#### 6.1.6 Fermentações e cofermentações

A maior diferença na quantidade de células produzidas nas curvas padrões a partir de 15 horas deve estar diretamente relacionada às fases exponenciais e estacionárias de cada espécie. Enquanto a *H. opuntiae* atinge a sua fase estacionária com 15 horas, ou seja, atinge sua concentração máxima de células no meio, a *W. anomalus* nesse mesmo momento está iniciando a sua fase exponencial, ou seja, sua produção acelerada de células. A partir desses resultados dois cenários distintos podem ser considerados no contexto biotecnológico. O primeiro apontaria a *H. opuntiae* como uma ótima candidata para uso em processos fermentativos, pois a mesma atinge a fase estacionária com pouco mais de 12 horas de fermentação, o que aceleraria os processos realizados, pois normalmente essa fase é atingida com 24 horas ou mais (TORRELLAS *et al.*, 2020). Em contrapartida, o segundo cenário apontaria a *W. anomalus* como a melhor candidata para fins biotecnológicos que visam a produção celular, pois mesmo atingindo a fase estacionária um pouco após 24 horas de fermentação, a mesma possui um ótimo rendimento celular.

A maior viabilidade celular observada nas fermentações simples dos isolados das espécies *H. opuntiae* e *W. anomalus* quando comparada com os controles (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*), pode estar relacionada a utilização dos nutrientes por ambas as leveduras. Enquanto as leveduras não convencionais estão direcionando a utilização desses nutrientes para a reprodução celular e produção de outras substâncias, como por exemplo o glicerol (o qual não foi analisado neste estudo), as espécies de *Saccharomyces* comerciais são conhecidas pela eficiência em converter açúcares em álcool e CO<sup>2</sup>. Henriques *et al.* (2018) comparando a *Saccharomyces cerevisiae* com a levedura não convencional *S.kudriavzevii*, na produção de vinho sintético constataram o mesmo comportamento.

Esse mesmo comportamento não foi constatado nas cofermentações, nas quais o uso das *Saccharomyces* conjuntamente com as leveduras não convencionais afetou consideravelmente a viabilidade celular, principalmente quando usado a cofermentação simultânea. O fato da cofermentação simultânea ter afetado mais a viabilidade celular deve estar relacionado a rápida produção de metabólitos pelas *Saccharomyces*, como por exemplo, etanol, glicoproteínas, entre outros, os quais afetam desde o início o crescimento das leveduras não convencionais, enquanto a cofermentação tardia deve proporcionar uma população razoável das células dos isolados da espécie *W. anomalus* e da espécie *H. opuntiae* nos primeiros três dias sem as *Saccharomyces* (VANNETTE e FUKAMI, 2014; BOYNTON e GREIG, 2016).

No que concerne a influência da temperatura na viabilidade celular, a menor temperatura ter afetado negativamente a viabilidade celular indica que esses isolados não possuem criotolerância.

O pouco consumo dos açúcares observados pelas espécies não convencionais em fermentação simples corrobora com os resultados obtidos nos testes qualitativos de fermentação da maltose, que demonstram que os isolados da espécie *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I) fermentam sim a maltose contudo, muito menos do que uma *Saccharomyces*. Isso pode estar relacionado a pouca presença dos *locus* independentes MAL, responsáveis pela fermentação desse açúcar, nos seus genomas (NOVAK et al., 2004). O baixo consumo dos açúcares por essas espécies também explica o baixo teor alcoólico obtido nas suas fermentações simples, nas quais mesmo o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) apresentando o dobro do teor alcoólico do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I), ainda assim apresentou menos de 1% de álcool, não podendo ser comparado com o teor alcoólico alcançado pelo controle positivo. Estudos anteriores já relacionaram a *W. anomalus* assim como outras espécies de leveduras não convencionais como a *Zygosaccharomyces rouxii*, *Scheffersomyces shehatae* (anteriormente *Candida shehatae*) e a *Pichia kluyveri* com a produção de bebidas com baixo teor alcoólico (DE FRANCESCO et al., 2015; LI, LIU, ZHANG, 2013; WALKER 2011; SARENS e SWIEGERS 2013).

O aumento do consumo de açúcares observado nas co-culturas dos isolados da *W. anomalus* (53C) e da *H. opuntiae* (4I) com as *Saccharomyces* quando comparado a cultura simples dessas leveduras não convencionais, principalmente nas cofermentações simultâneas, deve estar diretamente relacionado ao consumo de maltose pelas *Saccharomyces* conjuntamente com o consumo de glicose tanto pelas *Saccharomyces* quanto pelas leveduras não convencionais. O aumento no teor alcoólico constatado nas cofermentações deve estar diretamente relacionado com a melhora no consumo dos açúcares.

O aumento da concentração de açúcares logo após a adição das *Saccharomyces* observada na cofermentação tardia da co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* pode estar relacionada a lise das células do isolado da espécie *W. anomalus* causado por essa adição, resultando na liberação de açúcares que as mesmas continham. A queda imediata das células do isolado da espécie *W. anomalus* com a adição de *S. cerevisiae* também foi constatada por Ye et al. (2014) em seu trabalho com cultura mista dessas duas espécies para a produção de cidra de maçã. Essa queda causada pela presença da *S. cerevisiae* deve estar relacionada a produção dos diferentes metabólitos que ela produz (VANNETTE e FUKAMI, 2014; BOYNTON e GREIG, 2016).

A maior temperatura ter apresentado maior consumo dos açúcares redutores e maiores teores alcoólico nos dois tipos de cofermentações pode estar diretamente relacionado ao tipo de *Saccharomyces* usada, pois a *S. cerevisiae*, usada na maior temperatura, apresenta uma

fermentação mais rápida e eficiente do que a *S. pastorianus* usada na temperatura mais baixa. Enquanto a *S. pastorianus*, apresenta uma fermentação de 7 a 10 dias, a *S. cerevisiae*, apresenta uma fermentação de 3 a 5 dias (VENTURI FILHO, 2010; LIBKIND et al., 2011). Essa característica das *Saccharomyces* também pode explicar por que a cofermentação simultânea, na menor temperatura, converteu mais açúcares em álcool do que a cofermentação tardia e na maior temperatura não haver diferença entre o teor alcoólico dessas duas cofermentações. Ou seja, enquanto adicionar à *S. cerevisiae* três dias depois da fermentação ou no início da fermentação pode não afetar tanto seu resultado com oito dias de fermentação, esse intervalo de tempo deve afetar o rendimento da *S. pastorianus* em uma fermentação com a mesma duração.

Mesmo não produzindo muito álcool, e pensando no melhor consumo de açúcares, o fato dos isolados da espécie *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I) terem consumido melhor os açúcares na menor temperatura pode demonstrar que são leveduras que poderiam serem usadas na produção de cervejas do tipo *Lager* que são fermentadas a uma temperatura mais baixa (LI et al., 2017).

## 6.2 Estudo 2 – DCCR1

### 6.2.1 Influência da temperatura e concentração inicial de levedura sobre as variáveis respostas

O aumento da temperatura ter afetado negativamente a viabilidade celular dos isolados da espécie *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I) pode estar relacionado ao fato de temperaturas mais altas ocasionarem o aumento de estresse no processo fermentativo levando ao lise celular e conseqüentemente diminuindo a viabilidade celular (BASSOS et al., 2008; WHITE, ZAINASHEFF, 2010). Mesmo a espécie *W. anomalus* sendo conhecida por sua tolerância a diferentes estresses ambientais, dentre eles a diferentes temperaturas, neste caso, deve-se considerar que em um processo fermentativo ocorre a ação de outros fatores aliados a temperatura, que podem ter afetado essa variável resposta e que não foram controlados nem testados, como por exemplo a aeração (WALKER, 2011).

A concentração inicial de levedura ter influenciado positivamente a viabilidade celular de ambos os isolados testados deve estar diretamente relacionada a quantidade de células adicionadas inicialmente. Portanto, se mais células forem adicionadas no início do processo é muito provável que no final do mesmo a quantidade de células restante seja maior.

Nenhuma variável independente tem efeito significativo na concentração final de açúcares redutores demonstra que independente da condição a assimilação de maltose, glicose

e maltotriose, presente no extrato de malte, continua mínima nos isolados de ambas as espécies. Alguns estudos relatam que a espécie *W. anomalus* possui habilidade de metabolizar a maltose e até pode ser melhor do que uma levedura de cerveja comercial, outros estudos relatam exatamente o oposto, ou seja, corroborando com o cenário observado neste estudo (WALKER, 2011; LEE et al., 2011). Portanto, a cepa de *W. anomalus* isolada neste estudo metaboliza a maltose, todavia de forma lenta e muito menos do que uma levedura comercial como foi visto nas fermentações testes e neste DCCR. O mesmo foi observado para o isolado da espécie *H. opuntiae*.

A influência positiva da concentração inicial de levedura sobre o teor alcoólico para o isolado da espécie *W. anomalus* pode ser resultado de uma maior eficiência na conversão dos açúcares disponíveis no mosto, decorrente de uma maior quantidade de células (VERBELEN et al., 2008). Além dessa variável independente, o fato da temperatura inicial ter afetado positivamente o teor alcoólico do isolado da espécie *W. anomalus* e desse isolado ter produzido mais álcool quando comparado com o isolado da espécie *H. opuntiae*, pode apontá-lo como bom candidato para ser usado na produção de cervejas do tipo *ale*, nas quais as fermentações são conduzidas em temperaturas mais elevadas e normalmente produzem mais álcool (LI et al., 2017). Por sua vez, a temperatura influenciou negativamente o teor alcoólico do isolado da espécie *H. opuntiae*, dessa foram indicando que esse isolado possui maior potencial para ser usado na produção de cervejas do tipo *lager* que são fermentadas em temperaturas mais baixas (LI et al., 2017).

A baixa utilização dos açúcares pelos isolados de ambas as espécies deve estar diretamente relacionada ao baixo teor alcoólico observado para ambos esses isolados. Esse contexto não foi surpresa pois as leveduras não convencionais são conhecidas pela baixa produção de álcool e serem usadas para produção de cervejas com baixo teor alcoólico (0,51 - 2,0%), cervejas sem álcool ( $\leq 0,5\%$ ) ou em cofermentações com uma *Saccharomyces*, exatamente para aumentar o teor alcoólico das bebidas (YEO e LIU, 2014; MATRAXIA et al., 2021; BRASIL, 2019).

O fato de nenhuma variável independente ser significativa na produção dos compostos aromáticos quantificado, mas terem apresentado diferença de aroma nos diferentes ensaios realizados com o isolado da espécie *H. opuntiae* corrobora com o estudo de Garcia (2017) que igualmente não obteve diferença na produção de compostos aromáticos nos diferentes ensaios realizados com leveduras não convencionais. Contudo, a análise sensorial realizada por ele apontou diferenciação nos aromas das cervejas fermentadas usando leveduras não convencionais.

No que se refere ao agrupamento de células observado nos ensaios utilizando as maiores temperaturas tanto para o isolado da espécie *H. opuntiae* quanto para o isolado da espécie *W. anomalus*, o mesmo foi constatado por Ravasio e colaboradores (2018) usando essa última espécie.

### 6.3 Estudo 3 – DCCR2

#### 6.3.1 Influência da concentração inicial de levedura e da concentração do mosto sobre as variáveis respostas

O fato de nenhuma variável ter afetado a viabilidade celular de ambos os isolados testados indica que os dois possuem uma grande tolerância ao estresse osmótico. Essa tolerância da espécie *H. opuntiae* a maiores concentrações de açúcares já é uma característica das leveduras do gênero *Hansiaspora* que normalmente são associadas às primeiras fases de fermentações espontâneas de frutas, as quais apresentam essa maior concentração de açúcares (BASTOS et al., 2018). Já a espécie *W. anomalus* é conhecida pela sua tolerância a diferentes estresses ambientais (WALKER, 2011).

O impacto significativo e positivo da maior concentração inicial do mosto na concentração final de açúcares redutores para os isolados de ambas as espécies reforça a teoria constatada nas fermentações testes e no DCCR1, de que essas espécies metabolizam minimamente a maltose. Contudo, essa mesma variável também resultou em maior teor alcoólico para os isolados de ambas as espécies, o que pode estar relacionado a maior quantidade de glicose disponível no meio, o qual é metabolizado facilmente tanto pela *W. anomalus* quanto pela *H. opuntiae*. Além de que um mosto com maior gravidade normalmente resulta em maior produção alcoólica no final da fermentação (LEI et al., 2016).

Os  $R^2$  do teor alcoólico tanto nos DCCR1 quanto nesses DCCR2 terem sido maiores usando todos os coeficientes quando comparados com os  $R^2$  usando somente os coeficientes significativos é resultado da inclusão de mais parâmetros. Quanto mais parâmetros são incluídos no modelo maior o valor do  $R^2$ , contudo, nem sempre isso significa a melhoria na precisão da resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

## 7 CONCLUSÃO

A investigação do pólen de abelhas sem ferrão das espécies *Melipona interrupta*, *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Frieseomelitta varia* apresenta potencial para obtenção de leveduras fermentadoras e produtoras de compostos aromáticos.

As espécies *W. anomalus* (53C) e *H. opuntiae* (4I), isoladas dos pólenes são indicadas para a produção de bebidas com baixo ou zero teor alcoólico quando em fermentação simples e pode ser ressaltado que esse estudo é o primeiro que abrange desde a coleta na colmeia até testes pilotos na fermentação.

A utilização dessas duas espécies com leveduras convencionais em cofermentações com *Saccharomyces* demonstraram potencial para a produção de uma bebida alcoólica com base de malte e com um diferencial (o aroma adocicado, floral e leve), principalmente usando temperaturas amenas (14°C).

Os delineamentos estatísticos utilizados nesse estudo conseguiram apresentar modelos matemáticos bons para os teores alcoólicos produzidos pelos isolados da espécie *W. anomalus* (53C) e da espécie *H. opuntiae* (4I), podendo ser usados em trabalhos futuros voltados para a otimização.

Para trabalhos futuros, maiores análises de produção de compostos aromáticos é indicada para ambas as espécies, assim como a análise toxicológica, sensorial e de pasteurização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANTONINI, S. R. C. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. **Araras: Coleção UFSCar**, EdUfSCar 33 p (Apostila), 2004.
- BAMFORTH, C.W. Flavour changes in beer: oxidation and other pathways. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J. **Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications**. Woodhead Publishing, 2010. p. 424-444.
- BÁRBARA, M. S.; MACHADO, C. S.; SODRÉ, G. S.; DIAS, L. G.; ESTEVINHO, L. M.; CARVALHO, C. A. L. Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacai* Smith, 1983. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12525-12544, 2015.
- BASSOS, L.C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, D. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.
- BASTOS, V. S.; SANTOS, M. F.S.; GOMES, L. P.; LEITE, A. M.O.; PASCHOALIN, V.M.F.; AGUILA, E. M. D. Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in southern Brazil. **Research Article**, v. 98, n. 13, p. 4963-4970, 2018.
- BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, 691-698, 2004.
- BELLUT, K. M. M.; ZARNKOW, M.; HUTZLER, M.; JACOB, F.; SCHUTTER, D. P.; DAENEN, L.; LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 1-19, 2018.
- BETTENHAUSEN, H. M.; BARR, L.; BROECKLING, C. D.; CHAPARRO, J. M.; HOLBROOK, C.; SEDIN, D.; HEUBERGER, A. L. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, p. 487-504, 2018.
- BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p.39-51, 1993.
- BOYNTON, J. P.; GREIG, D. Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. **Fungal Ecology**, v. 22, p. 61-72, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019. **Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria**. Brasília, 2019.

BRENELLI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19-27, 2014.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p.21-30, 2012.

CAÑAS, P. M. I.; GARCÍA-ROMERO, E.; MANSO, J. M. H.; FERMÁNDEZ-GONZALEZ, M. Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. **Eur. Food Res Technol**, v. 239, n. 2, p. 279-286, 2014.

CAVALHEIRO, A. A. **Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo – São Paulo, SP, 2013.

CHUTTONG, B.; PHONGPHISUTTHINANT, R.; SRINGARM, K.; BURGETT, M.; BARTH, O. M. Nutritional Composition of Pot-Pollen from Four Species of Stingless Bees (Meliponini) in Southeast Asia. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Springer: Cham, 2018. Cap. 22 p. 313-324.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**. v. 61, p. 25-32. 2011.

CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas Fibrolíticas na digestibilidade da forragem de Milho. **Cienc. Anim. Bras**, v. 14, n. 4, p. 426-435, 2013.

DACK, R. E.; BLACK, G. W.; KOUTSIDIS, G.; USHER, S. J. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. **Food Chemistry**, v. 232, p. 595-601, 2017.

DE FRANCESCO, G.; TURCHETTI, B.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G. Screening of new strains of *Saccharomycodes ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Institute of Brewing e Distilling**, v. 121, n. 1, p. 113-121, 2015.

DETRY, R.; SIMON-DELISO, N.; BRUNEAU, E.; DANIEL, H. Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, 2020.

DUARTE, A. W. F.; VASCONCELOS, M. R. S.; ODA-SOUZA, M.; OLIVERIA, F. F.; LÓPEZ, A. M. Q. Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 493-503, 2018.

DUJON, B. Yeast evolutionary genomics. **Nat Rev Genet**, v.11, n. 7, p. 512-524, 2010.

FIGUEIREDO, B. I. C., SARAIVA, M. A. F., PIMENTA, P. P. S., TESTASICCA, M. C. S., SAMPAIO, G. M. S., CUNHA, A. C., AFONSO, L. C. C., QUEIROZ, M. V., CASTRO, I. M. and BRANDÃO, R. L. New Lager Brewery Strains Obtained by Crossing Techniques Using Cachaça (Brazilian Spirit) Yeasts. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 20, 2017.

FIGUEROA-HERNANDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ, J.; FERROCINO, I.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; COCOLIN, L.; SUÁREZ-QUIROZ, M. L. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 41-50, 2019.

GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P. R.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, 535e569 (2007).

GIBSON, B.; DAHABIEH, M.; KROGERUS, K.; JOUHTEN, P.; MAGALHÃES, F.; PEREIRA, R.; SIEWERS, V.; VIDGREN, V. Adaptive Laboratory Evolution of Ale and Lager Yeasts for Improved Brewing Efficiency and Beer Quality. **Annual Review of Food and Technology**, v. 11, p. 23-44, 2020.

GONZÁLEZ-QUIJANO, G. K.; DORANTES-ALVAREZ, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; PEREA-FLORES, M. J.; LEÓN, A. V.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Halotolerance and Survival Kinetics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Jalapeño Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fermentation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 8, p. M1545-M1553, 2014.

HARRISON, M.A.; ALBANESE JR. J. B. Beer/Brewing. In: SCHMIDT, T. M. (4 ed) **Encyclopedia of microbiology**. Academic Press, 2019. Pp. 467-477.

HENRIQUES, D.; ALONSO-DEL-REAL, J.; QUEROL, A.; BALSACANTO, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 88, 2018.

HITAM, S. A. S. A case report of *Kodamaea ohmeri* infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101(S1), p. 384, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1012>, 2020.

JOSEPH, R.; BACHHAWAT, A. K. Yeast: Production and commercial uses. In: Carl A. Batt e Mary Lou Tortorello (2 eds) **Encyclopedia of food microbiology**, Academic Press, pp. 823-830, 2014.

KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS. Diagnosis of the genus. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W and Teun Boekhout (5 eds) **The Yeasts, a Taxonomic Study**, Elsevier Science, Cap 80, p. 899-917, 2008.

LEE, Y.; CHOI, Y., LEE, S.; PARK, J.; SHIM, J.; PARK, K.; KIM, J. Screening Wild Yeast Strains for Alcohol Fermentation from Various Fruits. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 33-39, 2011.

LEI, H.; XU, H.; FENG, L.; YU, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 5, p. 583-588, 2016.

LI, H.; LIU, Y.; ZHANG, W. Method for Manufacturing Alcohol-Free Beer through *Candida shehatae*. **China Patent CN102220198**, 6 Feb, 2014.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: PANDEY, A.; SANROMÁN, M. A.; DU, G.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C. (eds) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering- Food and Beverages Industry**, Amsterdam, Netherlands:Elsevier, pp. 305-351, 2017.

LI, Z.; LI, H.; SONG, K.; CUI, M. Performance of non-Saccharomyces yeasts isolated from Jiaozi in dough fermentation and steamed bread making. **LWT – Food Science and Technology**, 111, p. 46-54, 2019.

LIBKIND, D.; HITTINGER, C. T.; VALÉRIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011.

LIBKIND, D.; PERIS, D.; CUBILLOS, F. A.; STEENWYK, J.L.; OPUNLENTE, D. A.; LANGDON, Q. K.; ROKAS, A.; HITTINGER, T. Into the wild: new yeast genomes from natural environments and new tools for their analysis. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 2, foaa008, 2020.

LIMA, C. O.; VAZ, A.B.M.; CASTRO, G. M.; LOBO, F.; SOLAR, R.; RODRIGUES, C.; PINTO, L. R. M.; VANDENBERGHE, L.; PEREIRA, G.; COSTA, A. M.; BENEVIDES, R. G.; AZEVEDO, V.; UETANABARO, A. P. T.; SOCCOL, C. R.; GÓES-NETO, A. Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation. **Food Microbiology**, v. 93, 103608, 2021.

LIU, T.; LI, Y.; SADIQ, F. A.; YANG, H.; GU, J.; YUAN, L.; LEE, Y. K.; HE, G. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 242, p. 404-411, 2018.

MATRAXIA, M.; ALFONZO, A.; PRESTIANNI, R.; FRANCESCA, N.; GAGLIO, R.; TODARO, A.; ALFEO, V.; PERRETTI, G.; COLUMBA, P.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. **Food Microbiology**, v. 99, 103806, 2021.

MEIRELES, S. F. **Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2018.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. F. L.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In: VIT. P., R. M. PEDRO, P. S. R. M and ROUBIK, 1 eds. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. New York: Springer Science+Business Media, p. 153-171, 2013.

MENEZES, C.; PALUDO, C. R.; PUPO, M.T. A Review of the Artificial Diets Used as Pot-Pollen Substitutes. In: Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology. Springer International Publishing, 2018. p. 253-262.

MICHENER, C.D. The Bees of the World. 2nd Edition. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press, 2007.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426- 428, 1959.

MTIBAA, L., SOULD, H.; JEMLI, B.; HAJJEJ, Z.; HALWENI, C.; REBAL, A.; MHAMED, R. B.; AKKARA, K.; FERJANI, M. *Kodamaea ohmeri*, An Emerging Yeast in Tunisia: First Identification in Three Case Reports and Literature Review. **Journal of Medical Microbiology e Diagnosis**, v. 8, n. 2, 1000299, 2019.

MUKHERJEE, V.; RADECKA, D.; AERTS, G.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B.; THEVELEIN, M. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 216, p. 2-19, 2017.

NETO, D. J. C. **Leveduras vetorizadas por abelhas sem ferrão em áreas de Cerrado no Estado do Tocantins, Brasil**. 2017. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecótonos) – Universidade Federal do Tocantins, 2017.

NETO, D. J. C.; MORAIS, P.B. The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, v. 47, 100973, 2020.

NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIC, V. Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 213-218, 2004.

OUOBA, L. I. I., KANDO, C.; PARKOUDA, C.; SAWADOGO-LINGANI, H.; DIAWARA, B.; SUTHERLAND, J. P. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 6, p. 1428-1441, 2012.

PADILHA, B., GIL, J. V.; MANZANARES, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. **Fermentation**, v. 4, n. 68, 2018.

PANTELOGLOU, A. G.; SMART, K. A.; COOK, D. Malt-induced premature yeast flocculation: current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 813-822, 2012.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, p.348-35, 2014.

PILÓ, F. B.; CARVAJAL-BARRIGA, E. J.; GUAMÁN-BURNEO, M.C.; PORTERO-BARAHONA, P.; DIAS, A. M. M.; FREITAS, L. F.D.; GOMES, F. C. O.; ROSA, C. A. *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers

(chicha) of Ecuador. **Biotechnology and Industrial Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 808-815, 2018.

PORRU, C.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.; BENÍTEZ-CABELLO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; ZARA, G.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I.; ARROYO-LÓPEZ, F. Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. **Food microbiology**, v. 69, p. 33-42, 2018.

RAVASIO, D.; CARLIN, S.; BOEKHOUT, T.; GROENEWALD, M.; VRHOVSEK, U.; WALTHER, A.; WENDLAND, J. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. **Fermentation**, v. 4, n. 1:15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>, 2018.

REBELO, K. S.; FERREIRA, A. G.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 46, n. 5, p. 927-932, 2016.

RIJSWIJCK, I. M. H. V.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J. C. M.; ABEE, T.; SMID, E. J. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1591-1602, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: AMIC, 2014.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M.; SILVA, J. O. C.; TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p.271-275, 2003.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTIN, A.; VILLALOBOS, M. C.; SERRADILHA, M. J.; CÓRDOBA, M. G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, p. 45-53, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.003>, 2016.

RUSTERHOLZ, H. P.; URSENBACHER, S.; CORAY, A., WEIBEL, U.; BAUR, B., URBAN, J. DNA quantity and quality in remnants of traffic-killed specimens of an endangered longhorn beetle: comparison of different methods. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 120, 2015.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. V. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 165-177, 2010.

SARENS, S.; SWIEGERS, J. H. **Enhancement of Beer flavor by a combination of Pichia and different hop varieties**. WO 2013/030398, 07 de mar de 2013.

SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; LINS, A.C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA, E.M.S.; FREITAS, B.M.; SANTOS, F.A.R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 507-511, 2006.

- SILVA, D. F. C. **Análise por técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Araraquara, SP, 2012.
- SILVA, G. R.; NATIVIDADE, T. B.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1015-1021, 2014.
- SINGH, R.; VADLANI, V. P.; HARRISON, M. L.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Aerobic production of isoamyl acetate by overexpression of the yeast alcohol acetyltransferases AFT1 and AFT2 in *Escherichia coli* and using low-cost fermentation ingredients. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 299-306, 2008.
- SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-47, 2010.
- STEINHAUS, M.; FRITSCH, H. T.; SCHIEBERLE, P. Quantitation of (R)- and (S)-Linalool in Beer Using Solid Phase Microextraction (SPME) in Combination with a Stable Isotope Dilution Assay (SIDA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7100-7105, 2003.
- SUZZI, G.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation Of Wine Yeasts - Frequency, Differences, And Stability Of The Character. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 36-39, 1984.
- SPITAEELS, F.; WIEME, A.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.; LANDSCHOOT, A. V.; VUYST, L. D.; VANDAMME, P. The Microbial Diversity of Tradicional Spontaneously Fermented Lambic Beer. **Plos one** **9**, v. 9, n. 4, e95384, 2014.
- TAHEUR, F. B.; MANSOUR, C.; JEDDOU, K. B.; MACHREKI, Y.; KOUIDHI, B.; ABDULHAKIM, J. A.; CHAIEB, K. Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. **Toxicon**, v. 179, p. 76-83, 2020.
- TASHIRO, A.; NEI, T.; SUGIMOTO, R.; WATANABE, A.; HAGIWARA, J. TAKIGUCHI, T.; YOKOTA, H.; KAMEI, K. *Kodamaea ohmeri* fungemia in severe burn: Case study and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 22, p. 21-23, 2018.
- THIAGO-CALAÇA, P. S. S. **Aspectos da biologia de *Melipona quinquefasciata* Lepeletier (Mandaçaia do chão), características físico-químicas do mel, recursos alimentares e leveduras associadas**. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomas tropicais) - Universidade Federal do Ouro Preto, 2011.
- TORRELLAS, M.; ROZÈS, N.; ARANDA, A.; MATALLANA, E. Basal catalase activity and high glutathione levels influence the performance of non-*Saccharomyces* active dry wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 92, 103589, 2020.
- VANNETTE, L. R.; FUKAMI, T. Historical contingency in species

interactions: towards niche-based predictions. **Ecology Letters**, v.17, n. 1, p. 115–124, 2014.

VENTURINI FILHO, W.G. Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia. **São Paulo: Editora Blucher**, v. 1, p 14-50, 2010.

VERBELEN, P.J.; VAN MULDER, S.; SAISON, D.; VAN LAERE, S.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Characteristics of high cell density fermentations with different lager yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing** v. 114, n. 2, p. 127-133, 2008.

VIIGAND, K.; TAMMUS, K.; ALAMÄE, T. Clustering of *MAL* genes in *Hansenula polymorpha*: Cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 1019-1028, 2005.

VIT, P.; SANTIAGO, B.; SILVIA, P.; RUIZ, J.; MAZA, F.; PENA-VERA, M.; PEREZ-PEREZ, E. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by Melipona and Scaptotrigona stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.28, n. 2, p. 78-84, 2016.

WALKER, M. G. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Springer Science+Business**, v. 99, n. 1, p. 25-34, 2011.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-43, 2018.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. Yeast: the practical guide to beer fermentation. Boulder, Colorado, p. 304, 2010.

XIE, C.; ZENG, H.; WANG, C.; XU, Z.; QIN, L. Volatile composto aromático components, microbiota and their correlations in different sufu, a Chinese fermented soybean food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1761-1773, 2018.

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

YEO, H. Q.; LIU S.-Q. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects, **Int. J. Food Sci. Technol**, v. 49, n. 7, 1607–1618, 2014.

ZHA, M.; SU, B.; WU, Y.; YIN, S.; WANG, C. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Wickerhamomyces anomalus* for Chinese Baijiu making. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 2018.

## APÊNDICES

**Apêndice A** - Resultados de ANOVA referentes a influência do isolado usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas fermentações simples a 12°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	1519,80	759,90	271,66	0,000 001	3397,12	1698,56	266,832	0,000 001	23,29	11,65	181,825 8	0,000 004
<b>Erro</b>	6	16,78	2,80			38,19	6,37			0,38	0,06		
<b>Total</b>	8	1536,59				3435,32				23,68			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice B** - Resultados de ANOVA referentes a influência do isolado usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas fermentações simples a 20°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	86968,86	86968,86	123740,1	0,000 000	1880,02	940,01	159,630	0,000 006	21,24	10,62	446,525	0,000 000
<b>Erro</b>	6	4,54	2,27	3,2	0,111 490	35,33	5,89			0,14	0,02		
<b>Total</b>	8	4,22	0,70			1915,35				21,38			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice C** - Resultados de ANOVA referentes a influência do isolado usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas cofermentações simultâneas a 12°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	462,60	231,30	255,74	0,000 002	830,01	415,00	61,0751	0,000 103	2,20	1,10	17,052	0,003 349
<b>Erro</b>	6	5,43	0,90			40,77	6,80			0,39	0,06		
<b>Total</b>	8	468,03				870,78				2,59			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice D** - Resultados de ANOVA referentes a comparação entre os isolados usados para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas cofermentações simultâneas a 20°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	1619,54	809,77	60,369	0,000 106	232,98	116,49	36,6296	0,000 434	0,021	0,01	1,36	0,325 044
<b>Erro</b>	6	80,48	13,41			19,08	3,18			0,05	0,01		
<b>Total</b>	8	1700,02				252,06				0,07			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice E** - Resultados de ANOVA referentes a influência do isolado usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas cofermentações tardias a 12°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	68,87	34,44	20,18	0,002 167	2339,62	1169,81	399,824	0,000 000	13,73	6,86	1071,73 6	0,000 000
<b>Erro</b>	6	10,24	1,71			17,55	2,93			0,04	0,01		
<b>Total</b>	8	79,11				2357,17				13,77			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice F** - Resultados de ANOVA referentes a influência do isolado usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e teor alcoólico nas cofermentações tardias a 20°C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Isolado</b>	2	437,32	218,66	11,657	0,008 575	1952,34	976,17	311,170	0,000 001	0,23	0,12	5,017	0,052 395
<b>Erro</b>	6	112,55	18,76			18,82	3,14			0,14	0,02		
<b>Total</b>	8	549,87				1971,17				0,37			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice G** - Resultados de ANOVA referentes a influência do tipo de fermentação usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 12 °C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Tipo de fermentação</b>	2	3178,71	1589,36	385,48	0,000000	448,31	224,15	26,240	0,001080	9,39	4,69641	189,830	0,000004
<b>Erro</b>	6	24,74	4,12			51,25	8,54			0,15	0,02474		
<b>Total</b>	8	3203,45				499,56				9,54			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice H** - Resultados de ANOVA referentes a influência do tipo de fermentação usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) a 20 °C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Tipo de fermentação</b>	2	1787,67	893,83	32,494	0,000604	2614,05	1307,03	149,5512	0,000008	20,14	10,07	424,480	0,000000
<b>Erro</b>	6	165,05	27,51			52,44	8,74			0,14	0,02		
<b>Total</b>	8	1952,71				2666,49				20,28			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice I** - Resultados de ANOVA referentes a influência do tipo de fermentação usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 12 °C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Tipo de fermentação</b>	2	2972,88	1486,44	4559,3000	0,000000	656,29	328,15	207,225000	0,000003	8,22	4,11	340,868000	0,000001
<b>Erro</b>	6	1,96	0,33			9,50	1,58			0,07	0,01		
<b>Total</b>	8	2974,84				665,79				8,30			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice J** - Resultados de ANOVA referentes a influência do tipo de fermentação usado para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) a 20 °C.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)				Teor alcoólico (%)			
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Tipo de fermentação</b>	2	988,60	494,30	108,74019	0,000000	3028,74	1514,37	992,130000	0,000000	19,18	9,59	597,265000	0,000000
<b>Erro</b>	6	27,27	4,55			9,16	1,53			0,10	0,02		
<b>Total</b>	8	1015,88				3037,90				19,28			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice K** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas fermentações simples usando o isolado da espécie *W. anomalus* (53C).

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	289273,15	289273,15	24,3	0,000034	1	1143,49	1143,49	5,2228	0,036275	1	0,00	0,00	0,0428	0,846230
<b>Erro</b>	28	38,14	38,14			16	3503,07	218,94			4	0,10	0,02		
<b>Total</b>	29	43,94	1,57			17	4646,56				5	0,10			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice L** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas fermentações simples usando o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I).

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	130,01	130,01	14,30	0,000752	1	1262,00	1262,00	33,267	0,000029	1	0,05	0,05	2,1875	0,213219
<b>Erro</b>	28	254,56	9,09			16	606,97	37,94			4	0,10	0,02		
<b>Total</b>	29	384,57				17	1868,97				5	0,15			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice M** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas cofermentações simultâneas usando a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com os controles positivos.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	56.30	56.30	0.2386	0.629013	1	3619,73	3619,73	13,42384	0,002096	1	0,69	0,69	42,1185	0,002907
<b>Erro</b>	28	6606.52	235.95			16	4314,38	269,65			4	0,07	0,02		
<b>Total</b>	29	6662.83				17	7934,11				5	0,75			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice N** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas cofermentações simultâneas usando a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com os controles positivos.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	198.29	198.29	0.8010	0.378435	1	3819,38	3819,38	14,23575	0,001665	1	1,51	1,51	172,775	0,000193
<b>Erro</b>	28	6931.74	247.56			16	4292,71	268,29			4	0,03	0,01		
<b>Total</b>	29	7130.03				17	8112,09				5	1,54			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice O** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas cofermentações tardias usando a co-cultura do isolado da espécie *W. anomalus* (53C) com os controles positivos.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	267.60	267.60	4.943	0.031144	1	3638,92	3638,92	24,3116	0,000062	1	8,04	8,04	247,239	0,000096
<b>Erro</b>	46	2490.18	54.13			22	3292,92	149,68			4	0,13	0,03		
<b>Total</b>	47	2757.79				23	6931,84				5	8,17			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice P** - Resultados de ANOVA referente a influência da temperatura usada para a viabilidade celular, a concentração de açúcares redutores e o teor alcoólico nas cofermentações tardias usando a co-cultura do isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) com os controles positivos.

	Viabilidade celular (%)					Açúcares redutores (g/L)					Teor alcoólico (%)				
	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p	GL	SQ	MQ	Valor de F	Valor de p
<b>Temperatura (°C)</b>	1	136.79	136.79	2.655	0.110040	1	1744,35	1744,35	5,9258	0,023493	1	7,51	7,51	839,563	0,000008
<b>Erro</b>	46	2369.87	51.52			22	6476,03	294,36			4	0,04	0,01		
<b>Total</b>	47	2506.67				23	8220,37				5	7,55			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados

**Apêndice Q** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão reduzida somente os coeficientes significativos referente ao teor alcoólico do DCCR1 para o isolado da espécie *W. anomalus* (53C) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	0,577	0,015	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,049	0,011	0,020
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,102	0,012	0,003
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	0,018	0,011	0,186
<b>Temperatura (Q)</b>	0,092	0,012	0,005
<b>1Lx 2L</b>	0,052	0,015	0,041

**Regressão reduzida - somente com os coeficientes significativos**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	0,577	0,015	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,049	0,011	0,020
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,102	0,012	0,003
<b>Temperatura (Q)</b>	0,092	0,012	0,005
<b>1Lx 2L</b>	0,052	0,015	0,041

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático;

**Apêndice R** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão somente os coeficientes significativos referente a viabilidade celular do DCCR1 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	87,782	1,084	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	1,992	0,766	0,080
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	4,033	0,857	0,018
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	-4,057	0,766	0,013
<b>Temperatura (Q)</b>	1,282	0,857	0,232
<b>1Lx 2L</b>	1,470	1,084	0,268

**Regressão reduzida - somente com os coeficientes significativos**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	88,807	0,839	0,000
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	3,777	0,839	0,020
<b>(2) Temperatura (°C) (L)</b>	-4,057	0,766	0,013

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

**Apêndice S** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão somente os coeficientes significativos referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	140,766	4,353	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	3,843	3,078	0,300
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-6,784	3,441	0,143
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	34,056	3,078	0,002
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	-15,643	3,441	0,020
<b>1Lx 2L</b>	5,846	4,353	0,272

**Regressão reduzida - somente com os coeficientes significativos**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	135,339	3,372	0,000
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	34,056	3,078	0,002
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	-14,286	3,372	0,024

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

**Apêndice T** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão somente os coeficientes significativos referente ao teor alcoólico do DCCR2 para o isolado da espécie *W. anomalous* (53C) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	0,992	0,075	0,001
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	0,028	0,053	0,631
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	0,112	0,059	0,155
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	0,428	0,053	0,004
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	0,028	0,059	0,666
<b>1Lx 2L</b>	-0,081	0,075	0,354

**Regressão reduzida - somente com os coeficientes significativos**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	1,085	0,043	0,000
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	0,428	0,053	0,004

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

**Apêndice U** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão somente os coeficientes significativos referente a concentração de açúcares redutores do DCCR2 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	133.250	6.398	0.000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	1.979	4.524	0.691
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	4.810	5.058	0.412
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	41.617	4.524	0.003
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	-8.584	5.058	0.188
<b>1Lx 2L</b>	-7.244	6.398	0.340

**Somente os coeficientes significativos – R<sup>2</sup> 0,90**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	130,734	3,694	0,000
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	41,617	4,524	0,003

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.

**Apêndice V** - Resultados da regressão com todos os coeficientes e da regressão somente os coeficientes significativos referente ao teor alcoólico do DCCR2 para o isolado da espécie *H. opuntiae* (4I) usando os dados de 168 horas de fermentação.

**Regressão completa - com todos os coeficientes**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	1,18	0,068	0,000
<b>(1) Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (L)</b>	-0,05	0,048	0,380
<b>Conc. Inicial de leveduras (10<sup>x</sup>) (Q)</b>	-0,03	0,054	0,582
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	0,41	0,048	0,003
<b>Conc. Inicial do mosto (P°) (Q)</b>	-0,12	0,054	0,119
<b>1Lx 2L</b>	-0,02	0,068	0,816

**Regressão reduzida - somente com os coeficientes significativos**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Média/intercepção</b>	1,085	0,039	0,000
<b>(2) Conc. Inicial do mosto (P°) (L)</b>	0,415	0,048	0,003

(L) = coeficiente linear; (Q) = coeficiente quadrático.