



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E
APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO
DE CERVEJAS PERSONALIZADAS”**

Bruno Cardoso Andrion

**São Carlos – SP
2022**



**“ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E
APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO
DE CERVEJAS PERSONALIZADAS”**

Bruno Cardoso Andrion*

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr.

Coorientador:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001” – (CAPES/DS) Processo 88882.426502/2019-01”.

****Bolsista CAPES: 88882.426502/2019-01***

**São Carlos – SP
2022**

BRUNO CARDOSO ANDRION

“Isolamento, caracterização taxonômica e aplicação de leveduras no processo de fabricação de cervejas personalizadas”

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos

Orientador:

Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr.

Coorientador:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr..
PPGBiotec/UFSCar

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Departamento de Morfologia e Patologia/UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
Departamento de Morfologia e Patologia/UFSCar

Prof. Dr. Gleidson Silva Teixeira
BioinFood

Prof. Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto
BioinFood

São Carlos – SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Bruno Cardoso Andrion, realizada em 30/06/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Dielle Pierotti Procópio (USP)

Prof. Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto (BIOTOX) O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, minha esposa Patrícia e meus filhos, Theo e Liz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr e ao meu coorientador Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, pela oportunidade em me orientar demonstrando toda atenção, dedicação e paciência nesses anos de desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec/UFSCar) e seus funcionários, em especial à Cláudia Pastega, sempre disposta em sanar minhas dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo financiamento dessa pesquisa.

À Cervejaria Invicta (Ribeirão Preto), em especial ao Rodrigo Silveira (fundador e diretor), que me oportunizou a coleta dos meus dados durante as brassagens e aos meus amigos cervejeiros, Lucas e Camila, que me auxiliaram com as coletas durante esse período.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LGBA) do Departamento de Genética e Evolução (DGE/UFSCar), em especial ao Henrique, João, Cleiton, Hosana, Emeline, Jeferson e Matheus, que me ajudaram durante as coletas e análises laboratoriais.

À banca examinadora do exame de qualificação: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (DMP/UFSCar) e Prof. Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto (BioinFood), por terem aceitado em participar desse momento para contribuir e orientar essa pesquisa e, conseqüentemente, torná-la melhor.

Aos membros que aceitaram compor a Comissão Examinadora para realização do exame de defesa dessa presente Tese de Doutorado: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (DMP/UFSCar); Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (DMP/UFSCar); Prof. Dr. Gleidson Silva Teixeira (BioinFood) e Prof. Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto (BioinFood). Obrigada pela disponibilidade e atenção!

Aos meus pais, Paulo e Téia, e aos meus sogros, Elaine e Eduardo, que se prontificaram a ficar com meus filhos nos finais de semana, para que eu

pudesse dar andamento e desenvolvimento nas análises e testagens e, principalmente, durante a fase de escrita final desse trabalho.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo distante nesse momento de pandemia, puderam acompanhar minha trajetória e minha história ao longo desses cinco anos.

Agradeço à minha esposa Patrícia Rossi Andrion, pela paciência, auxílio, companheirismo, amor e pelo incentivo dedicado a mim durante esse período.

Aos meus filhos, Theo (4 anos) e Liz (1 ano e meio), que nasceram juntos com essa tese, fizeram e fazem parte desse trabalho. Não foi fácil ser pai e pesquisador nesses anos do doutorado, mas certamente, o nascimento deles me renovou enquanto pessoa. Amo vocês, meus filhos!

Muito obrigado!

Andrion, Bruno Cardoso. **Isolamento, caracterização taxonômica e aplicação de leveduras no processo de fabricação de cervejas personalizadas**. 2022. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

RESUMO

O mercado cervejeiro vem se expandindo com demandas importantes visando a melhoria de qualidade da bebida. Uma das alternativas para a melhoria do processo seria a identificação de linhagens de leveduras com características organolépticas únicas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo geral conhecer e identificar novas leveduras para o comércio de cervejas artesanais. E como objetivos específicos: a) Identificar a diversidade de leveduras participantes do processo produtivo em uma microcervejaria; b) Relacionar essa contribuição sensorial com as características territoriais que estão presentes naquela cervejaria; c) Identificar e reproduzir levedura(s) brasileira(s) de potencial para a indústria de bebidas e a montagem de um banco de microrganismos personalizado que pode ser usado para produção de cervejas personalizadas; d) Verificar a eficiência produtiva e as características sensoriais de cervejas produzidas com os isolados; e e) Identificar, através do estudo da expressão gênica destas leveduras, possíveis alterações em vias metabólicas que sejam de interesse da indústria cervejeira e desenvolver essas leveduras para contribuir para o processo produtivo. Para tanto, o presente estudo foi dividido em cinco etapas: (I) Coleta e propagação de leveduras em treze pontos de produção englobando todo processo produtivo; (II) Análises e criação do banco de leveduras baseado na morfologia; (III) Caracterização do banco por meio do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal; (IV) Seleção de leveduras com potencial produtivo; e (V) Produção de cerveja com a levedura selecionada. Foram testadas 119 linhagens de acordo com suas características morfológicas que após o sequenciamento foram agrupadas em oito espécies diferentes da ordem Saccharomycetales (*Candida tropicalis*, *Diutina rugosa*, *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Kazachstania yasuniensis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia myanmarensis*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus*), que se organizaram na proximidade genética em duas etapas, pré e pós fermentação. Quanto as linhagens pertencentes à espécie *S. cerevisiae*, cinco linhagens foram submetidas a teste de crescimento e de fermentação em diferentes temperaturas e concentrações de extrato de malte. Essas cepas foram utilizadas para uma produção em micro-escala (teste em bancada) e submetida a testes de avaliação por painel um sensorial treinado, testes físico-químico de desempenho fermentativo e em testes de voláteis. Dentre essas cinco linhagens, foi selecionada a levedura GP2 devido às suas características sensoriais, que apresentavam padrões diferentes e com bom desempenho fermentativo. Durante a fermentação, amostras foram coletadas para a avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de genes relacionados a importantes vias metabólicas durante ao consumo de açúcar, produção de etanol e aromas. Foi possível verificar uma diversidade de leveduras dentro de uma microcervejaria, que foram obtidas desde os insumos

até o final do processo produtivo. Com essa seleção, foi possível identificar e selecionar cepas de potencial produtivo que demonstraram ter características de crescimento, de formação de álcool e de compostos aromáticos com interesse para indústria de produção de cerveja. Além disso, foi possível identificar as vias metabólicas utilizadas pelas cepas selecionadas, sendo isso importante para estudos futuros no que se refere o desenvolvimento de leveduras por meio de cruzamentos e seleções ou domesticação de leveduras selvagens de interesse.

Palavras-chave: Produção de Cerveja. Fermentação. Leveduras. Genética. Cervejaria. *Saccharomyces cerevisiae*.

Andrion, Bruno Cardoso. **Isolation, taxonomic characterization and application of yeasts in the process of manufacturing customized beers.** 2022. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

ABSTRACT

The brewing market has been expanding with important demands aimed at improving the quality of the drink. One of the alternatives to improve the process would be the identification of yeast strains with unique organoleptic characteristics. Thus, this study aimed to understand the dynamics of yeast succession throughout the production chain of a small microbrewery in a city in the interior of São Paulo, aiming to create a yeast bank that can be used to identify strain customized. And as the specific aimed, it was: a) to identify the diversity of yeasts participating in the production process in a microbrewery; b) to relate this sensorial contribution with the territorial characteristics that are present in that brewery; c) to identify and reproduce Brazilian yeast(s) with potential for the beverage industry and the assembly of a personalized microorganism bank that can be used for the production of personalized beers; d) to verify the productive efficiency and sensory characteristics of beers produced with the isolates; and e) to identify, through the study of the gene expression of these yeasts, possible alterations in metabolic pathways that are of interest to the brewing industry and develop these yeasts to contribute to the production process. For this purpose, the present study was divided into five stages: (I) Collection and propagation of Yeasts in 13 production points encompassing the entire production process; (II) Analyzes and creation of the yeast bank based on morphology (III) Characterization of the bank by sequencing the ITS region of the ribosomal DNA (IV) Selection of yeasts with productive potential and (V) Brewing with selected yeast in scale pilot. So far, topics I to III have been completed. 119 colonies were tested due to their morphological characteristics, which after sequencing were grouped into eight different species of the order Saccharomycetales (*Candida tropicalis*; *Diutina rugosa*, *Hanseniaspora pseudoguilliermondi*; *Kazachstania yasuniensis*; *Pichia kudriavzevii*; *Pichia myanmarensis*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Wickerhamomyces anomalus*), which were organized in genetic proximity in 2 stages (pre and post fermentation); Of the strains belonging to the species *S. cerevisiae*, 5 colonies were subjected to growth and fermentation tests at different temperatures and malt extract concentrations, the 3 best being selected for micro-scale beer production for evaluation in a sensory test by trained sensory panel. Among these 5 candidates we selected the GP2 yeast, it was chosen due to its sensory characteristics very different from the standard and with good fermentative performance. During fermentation, samples was collected for the evaluation of gene expression by real-time PCR (qPCR) of genes related to important metabolic pathways related to sugar consumption, ethanol production and aromas). We hope that the results of this work can identify new Brazilian yeasts that can produce beers with new aromas and flavors, in addition to making the process more competitive and with lower production costs. It was possible to verify a diversity of yeasts within a

microbrewery, which were obtained from the inputs to the end of the production process. With this selection, it was possible to identify and to select strains with productive potential that showed growth characteristics, alcohol formation and aromatic compounds with interest for the brewing industry. In addition, it was possible to identify the metabolic pathways used by the selected strains, which it is important for future studies regarding the development of yeasts through crosses and selections or domestication of wild yeasts of interest.

Keywords: Beer Production. Fermentation. Yeasts. Genetics. Brewery. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo produtivo de cervejas.....	27
Figura 2. Vias metabólicas para a fermentação alcoólica. A molécula de Piruvato é descarboxilada para formação de acetaldeído, em seguida, ele é reduzido pela ação da enzima Álcool desidrogenase formando álcool e regenerando o NAD+.....	37
Figura 3. Vias metabólicas para a formação dos principais flavours produzidos por Saccharomyces, esquema simplificado.....	40
Figura 4. Árvore Filogenética de cepas industriais de Saccharomyces cerevisiae, e usado Saccharomyces paradoxos como grupo externo. Os pontos coloridos indicam a divisão basal de cinco linhagens industriais.....	43
Figura 5. Fluxograma dos pontos de selecionados para realização da coleta...48	
Figura 6. Etapas de inoculação dos pontos de coletas nos meios YPD 2%, Bancadas esterilizada com álcool 70%, inoculação atrás da chama do bico de Bunsen.....	52
Figura 7. Modelo de inoculação de leveduras sobre condições diversas para avaliação de crescimento.....	57
Figura 8. Modelo de inoculação de leveduras sobre condições de crescimento a 25°P.....	58
Figura 9. Painel de produção de mosto cervejeiro.....	59
Figura 10. Laudo técnico do extrato de malte Dry-brew Liotécnica.....	62
Figura 11. Descritivo do produto e cálculos para dosagem Isohop®.....	64
Figura 12. Fermentação experimental realizada em frascos Schott estéreis com um mosto comum de 11°P e variando a cepa de levedura inoculada F1.1, F1.2, F1.6, F2.5, GP2 e S04.....	65
Figura 13. Fermentador cônico.....	66
Figura 14. Lab de degustação- Sensorial (cervejaria - multinacional de um município do interior paulista).....	69
Figura 15. Regiões ITS amplificadas das cepas isoladas na indústria cervejeira comparadas com amostras comerciais de cerveja S04 (Saccharomyces), de etanol CAT (Saccharomyces) e Cândida (Não Saccharomyces).....	73

Figura 16. Distribuição das espécies por pontos de coleta.....	76
Figura 17. Árvore filogenética das espécies não <i>Saccharomyces</i> , inferidas por máxima verossimilhança.....	78
Figura 18. Genotipagem das linhagens isoladas do processo fermentativo (GP-garrafa pasteurizada; F1-Início de fermentação; F2- meio de Fermentação; AF- Antes da filtração).....	80
Figura 19. Leveduras <i>Saccharomyces</i> comerciais utilizadas pelas cervejarias e a linhagem isolada em dornas de produção de álcool.....	81
Figura 20 Crescimento das linhagens em situação 3 condições de concentração de açúcares e 3 (2%, 20 °P e 25°P) temperaturas (10, 18 e 30°C). Na condição de menor extrato houve crescimento f1.1 e f1.6 com maior performance a 30 °C e F2.5 em 18°C, já nos outros extratos o destaque foi f1.2.....	82
Figura 21. Crescimento das linhagens em situação estresse 30°C e 25°P.....	83
Figura 22. Fermentação do mosto cervejeiro com inoculação da cepa F1.1.....	85
Figura 23. Perfil sensorial comparando as cepas inoculadas com o controle S04.....	89
Figura 24. Genotipagem das linhagens GP2 isoladas do processo fermentativo utilizada para uma produção de 10L de cerveja.....	90
Figura 25. Fermentação com a cepa GP2 em tanque cônico de 35L (polietileno).....	92
Figura 26. Perfil sensorial comparando as cepas inoculadas com o controle comercial.....	92
Figura 27. Heat map da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de cerveja utilizando as cepas S04 (cepa comercial-fermentis) e GP.2 isolado encontrado em barris de cerveja após final de produção. Em vermelho a expressão gênica é maior e a escala de cores diminui até atingir a cor azul (menor expressão gênica).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperaturas e pH ótimos para ação enzimática.....	28
Tabela 2. Genes utilizados na análise da expressão gênica, funções e referência.....	71
Tabela 3. Resultados Físico-químicos e voláteis das cepas selecionadas e do controle S04 (Fermentis).....	90
Tabela 4. Resultados Físico-químicos e voláteis da cepa selecionada GP2 e do controle S04 (Fermentis).....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Referência de Estilos de Cervejas.....	34
Quadro 2. Pontos de coleta dentro do processo produtivo.....	50
Quadro 3 Crescimento e caracterização das leveduras como Lagers ou Ales.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)</i>
SICUBE	Sistema de Controle de Produção de Bebidas
Abracerva	Associação Brasileira das Microcervejarias
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
CervBrasil	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
BA	Brewers Association
BJCP	Beer Judge Certification Program
LGBA	Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada
DGE	Departamento de Genética e Evolução
CIP	<i>Clean in place</i>
MP	Malte-Pilsen
LP	Lúpulo Perle
LT	Lúpulo Tettmanger
BS	Bagaço da Superfície
BF	Bagaço do Fundo
DC	Descarte Centrifuga
GP	Garrafa Pasteurizada
YPD	<i>Yeast extract – Peptone – Dextrose</i>
WLN	<i>Wallerstein Laboratory Nutrient agar</i>
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
PCR	Proteína C-reativa
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Cervejas artesanais: panorama histórico e atualidades	23
1.2 Processo de produção de cerveja	27
Processo de Malteação	28
Processo de moagem	29
Tina de mostura	29
Tina de clarificação	30
Tina de fervura e <i>Whirpool</i>	31
Resfriamento (<i>Chiller</i>)	31
Fermentação	32
Cerveja em maturação	32
Descarte da centrífuga e filtração	32
Cerveja em barril	33
Cerveja pasteurizada em garrafa	33
1.3 Estilos de cerveja	33
1.4 Pesquisas nacionais envolvendo produção de cervejas	36
1.5 Leveduras para a produção de cervejas	36
1.6 Técnicas moleculares de identificação de leveduras	44
1.7 Justificativa	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Coleta e propagação de leveduras	48
3.1.1. Seleção e identificação dos pontos de coleta	48
3.1.2. Resumo dos pontos de coleta	50
3.1.3 Seleção de leveduras	51
3.1.4. Controle do crescimento das leveduras	53
3.2 Sequenciamento genético da região ITS para caracterização molecular das leveduras	54
3.3. Seleção de leveduras com potencial produtivo	56

3.3.1. Alinhamento e análises filogenéticas das cepas isoladas	56
3.3.2 Caracterização e desempenho das leveduras <i>Saccharomyces</i> Ale ou Lagers	56
3.3.3 Seleção de <i>Saccharomyces</i> sobre condições diversas de temperatura e extrato	57
3.3.4 Seleção de <i>Saccharomyces</i> por análises em microproduções de cerveja	60
3.4 Produção de cerveja com a levedura selecionada	67
3.4.1 Produção de um lote de cerveja com a levedura escolhida pelo painel sensorial	67
3.4.2 Análise físico-químicas, voláteis (cromatografia gasosa) e sensorial (painel sensorial-treinado)	69
3.4.3 Análise da expressão gênica qPCR da produção de cerveja	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1. Banco de Leveduras	73
4.2 Identificação após o sequenciamento	74
4.3 Caracterização e desempenho das <i>Saccharomyces</i> selecionadas	82
4.4 Seleção de <i>Saccharomyces</i> por fermentação em bancada	86
4.5 Produção de um lote maior de cerveja com a inoculação de levedura selecionada no teste de bancada	92
5. CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com 13,8 bilhões de litros por ano, ficando atrás apenas da China e Estados Unidos. Essa produção tem seguido um crescimento do consumo que apresentou um aumento de 5% ao ano na última década, sendo que as cervejas artesanais apresentaram uma evolução ainda maior, em torno de 20% ao ano (VASCONCELOS, 2017).

A cervejaria artesanal tem como foco a qualidade do produto, ou seja, apresenta uma grande preocupação com seus insumos, resultando em um produto final mais elaborado conferindo melhor aroma e sabor à bebida (KLEBAN; NICKERSON, 2012).

Essa procura crescente por um produto diferenciado começou por volta do ano de 1970 nos Estados Unidos, chamado de “revolução cervejeira”, um movimento dedicado a cultura artesanal e exaltação das cervejas artesanais. Com isso, houve o surgimento de inúmeros rótulos com diferentes características, aromas, sabores e cores (MORADO, 2009).

As cervejas artesanais, ou cervejas especiais, tem conquistado cada vez mais espaço nas prateleiras dos supermercados, nos bares e restaurantes, e até mesmo, substituindo o vinho em alguns bistrôs. Além disso, têm surgido no cenário nacional e internacional, várias cervejarias de pequeno porte, que prezam por um produto regional diferenciado e de qualidade superior. Por outro lado, os grandes grupos cervejeiros também estão em expansão, como a AB-Inbev e Heineken, que não crescem apenas no que se refere à produção de volumes, mas também na aquisição de microcervejarias para aumentar seu portfólio, como foi o caso da Cervejaria Colorado ser incorporada pelo grupo AB-Inbev e da Cervejaria Baden Baden pelo grupo Heineken (VASCONCELOS, 2017).

De acordo com dados de 2005 a 2014 do Sistema de Controle de Produção de Bebidas (Sicobe) e do anuário de 2016 da Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (Cervbrasil), apesar do grande crescimento das cervejas

artesanais e do crescimento de 64% da produção nacional de cervejas, as microcervejarias representam apenas 1% de todo o setor cervejeiro no Brasil (SEBRAE, 2017; VASCONCELOS, 2017; BREWERS ASSOCIATION, 2021; CERVBRAIL, 2021).

Isso representa em números 420 indústrias de cervejas artesanais no país. Esse crescimento tem acontecido ano após ano e, apesar da pandemia no ano de 2020, foi identificado um crescimento de 14,4% em relação ao ano anterior e as projeções para 2025 ainda demonstram a possibilidade do aumento desse setor, com estimativa de 19 a 36% (MAPA, 2021).

Todavia, o crescimento do mercado cervejeiro ainda se encontra em fase de organização e evolução. Muitas empresas estão sendo construídas envolta dessa cadeia produtiva para fornecer equipamentos, insumos, mão de obra e conhecimento a estas empresas emergentes. Porém, as pesquisas ainda se concentram em alguns insumos como grãos maltados, lúpulo, água e adjuvantes, sendo que o isolamento e o uso de novas leveduras para a fabricação de cerveja ficaram para trás (OSBURN et al., 2018).

Apesar de não haver registros legais e científicos, muito provavelmente, grande parte das microcervejarias que existem no Brasil atualmente, não possuem um laboratório completo com tecnologia adequada para o desenvolvimento de leveduras selvagens ou um banco de leveduras, ou ainda que façam com frequência análises laboratoriais de seus produtos para verificar a interferência de microrganismos contaminantes. Isso acontece, provavelmente, pelo fato dessas pesquisas de alto nível ficarem restritas junto as grandes indústrias (LIMBERGER; TULLA, 2017). Portanto, a importância no desenvolvimento e comercialização de leveduras com potencial para esses pequenos produtores torna-se o foco desse estudo.

As leveduras mais comumente utilizadas na produção de cervejas são as *Saccharomyces cerevisiae* (leveduras de alta fermentação) e *Saccharomyces uvarum* (leveduras de baixa fermentação). Devido a sua extrema importância na formação de aromas e sabores produzidos nas cervejas, é essencial que a cultura e/ou a compra destes microrganismos estejam livres de outros

microrganismos contaminantes, podendo ser desde bactérias, até leveduras “selvagens” (MORADO, 2009).

Essas leveduras contaminantes podem trazer “defeitos”, que vão desde a formação de película na superfície da cerveja, até o desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis, ou ainda atraso na fermentação (SILVA, 2005). Porém, algumas leveduras não *Saccharomyces* apresentam grande interesse para a indústria cervejeira, pois, além de possuírem bom desempenho na formação de álcool e gás carbônico, também tem apresentado compostos aromáticos e organolépticos diferentes dos encontrados normalmente (VASCONCELOS, 2017).

O potencial de leveduras não convencionais está sendo explorada em diversos produtos, sejam eles como agentes de uma fermentação completa ou uma fermentação secundária (fermentações mistas), ou seja, utiliza-se uma levedura iniciadora no processo fermentativo e, no meio ou no final da etapa, é inoculada uma outra ou várias leveduras, com a finalidade de desenvolvimento de novas características de interesse do mercado (PEREIRA, 2020).

Diversos estilos de cerveja foram acrescentados recentemente ou ainda serão descobertos devido a utilização de leveduras não convencionais ou microrganismos fermentadores. Devido a isso, na última década, foi possível identificar uma crescente atenção da área científica envolvendo a realização de testes de produção com leveduras não *Saccharomyces*.

Nesse sentido, Basso et al. (2016) descreveram a utilização de linhagens do gênero *Dekkera/Brettanomyces* na formação do perfil sensorial de cervejas azedas e obtiveram grandes concentrações de ésteres frutados; Methner et al. (2019) utilizaram várias cepas dos gêneros *Cyberlindnera* (grandes quantidades de acetato de isoamila), *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *kluveromyces*, *Lachancea*, *Saccharomycopsis*, *Metschnikowia*, *Nakazawae*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Zygotorulaspota* para fermentação de cerveja e observaram que todas elas apresentaram grande produção de álcool superior e vários compostos aromáticos.

Assim também, Bellut et al. (2018) testaram a produção de cervejas com cepas que produzem cervejas com baixo teor alcoólico (sendo elas *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces Kombuchaensis*). Os resultados demonstraram bom desempenho em todas essas cepas citadas quando comparadas com a levedura comercial testada. Todavia, eles verificaram que a temperatura de fermentação ideal ainda deveria ser testada para as diferentes cepas.

Osburn et al (2018) trabalharam na produção de ácido láctico em cervejas do estilo sour com as cepas *Hanseniaspora vineae*, *Lachancea fermentati*, *Schizosaccharomyces japonicus* e *Wickerhamomyces anomala*. Eles verificaram por meio dessa pesquisa, que todas essas cepas apresentaram o fenótipo para fermentação heterolática, com exceção da *Lachancea thermotolens*, que não apresentou essa característica, podendo ser justificada por ser um indicativo de leveduras mais recentes e evoluídas que perderam tais características.

Além dessas pesquisas relacionadas à fermentação completa, é importante ressaltar estudos relacionadas às fermentações mistas, como os de Souza et al. (2021). Estes pesquisadores utilizaram fermentações mistas com comunidades de microrganismos presentes no Kefir, com bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras do gênero *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Kazachstania*, *Lachancea* e *Yarrowia*; e também, microrganismos presentes na Kombucha, sendo esta conhecida como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*).

Todos esses estudos e seus resultados alcançados mostraram que o cenário de utilização de leveduras não convencionais tem potencial para se expandir. Além disso, a utilização associada de uma ou mais leveduras pode apresentar resultados ainda mais complexos, pois tais aromas e sabores produzidos durante a fermentação dependem do processo metabólico do cultivo de cada levedura (OLIVEIRA, 2011).

Devido a esses inúmeros fatores, a presente pesquisa teve como tema a seleção de leveduras personalizadas e a criação e caracterização de um banco de leveduras de todo processo produtivo e suas relações com as características

sensoriais da cerveja e quais vias metabólicas são ativadas por aquela levedura de potencial produtivo desejável.

1.1 Cervejas artesanais: panorama histórico e atualidades

A história da cerveja é deslumbrante, rica de detalhes e quase sempre está associada a grandes eventos históricos da sociedade. Todavia, não existe uma datação correta do seu surgimento e muitos acreditam que o processo de fabricação da bebida tenha sido descoberto por acaso.

Alguns historiadores datam a primeira evidência química da fabricação de cerveja entre 3.100 e 2.900 anos a.C. na região do Irã, em escavações realizadas na cidade pré-histórica chamada Godin Tepe, com a descoberta de um vaso de cerâmica contendo Oxalato de Cálcio (CaC_2O_4), um precipitado que tende a acumular-se em recipientes, barris e outros reservatórios utilizados no processo de fermentação da cerveja (MUXEL, 2018).

Porém, demais historiados descrevem registros dessa bebida nos povos sumérios a 4.000 a.C. sobre oferendas de cerveja a Deusa Nin-Harra tendo como base citações, pinturas e cerimônias egípcias com a bebida, marcadas nas pinturas rupestres, além do código de Hamurabi a 1.770 a.C, o qual previa punições aos cervejeiros que adulterassem sua bebida (MORADO, 2009; SILVA; LEITE; PAULA, 2016).

Na Idade Antiga, a cerveja foi muito difundida por seu poder nutritivo e pelo seu efeito inebriante, entretanto, em determinado momento histórico ela foi despopularizada devido a política dos conquistadores romanos em impor seus costumes dando lugar ao vinho. Todavia, isso não durou muito tempo, tendo em vista que os insumos para a produção da cerveja eram abundantes e baratos (MORADO, 2009). Nesse período histórico, surgiu o primeiro uso da palavra “cerveja”, que foi utilizado pelos povos celtas, muito provavelmente tendo como finalidade a referência e a homenagem a Deusa Ceres (Deusa da colheita e da fertilidade), que em latim é grafada como *Cerevisiae*, designando hoje a levedura da cerveja *Saccharomyces cerevisiae* (BELTRAMELLI, 2012).

Na Idade Média, embora a produção de cerveja fosse uma atividade caseira, de responsabilidade das mulheres e para o consumo da família devido ao baixo custo servindo de complemento à alimentação, a cerveja ficou institucionalizada através dos mosteiros, que fundamentaram as técnicas para produção de cervejas, criaram amplas instalações fabris, elaboraram várias receitas, se tornaram pesquisadores do assunto e contribuíram para a formação de um produto importante para o comércio local (MORADO, 2009; FERREIRA et al., 2011).

Esse comércio passou a ser cobiçado pelos governantes da época, já que era uma ótima fonte de taxação de toda a cadeia produtiva, inclusive dos seus aditivos (mel, especiarias, gengibre, anis, alecrim, Artemísia, entre outros), que eram usados para a saborização da cerveja, estimulando a competitividade entre os produtores. Esses aditivos eram denominados de Gruit, que foi sendo substituído aos poucos pelo lúpulo devido às suas propriedades de conservação do produto (MUXEL, 2018), sendo este amplamente mais aceitável por aumentar o tempo de vida e qualidade da cerveja.

No Século XIV, para que houvesse a padronização da cerveja afim de manter sua qualidade, foi decretada pelo Duque Guilherme IV da Baviera, a Lei da Pureza da Cerveja (Lei Reinheitsgebot), instituindo que esta utilizasse em sua produção apenas água, malte de cevada e lúpulo (ressalta-se que naquele momento a levedura ainda não era conhecida). Isso foi um marco histórico, tendo em vista este ser um dos mais antigos decretos alimentares da Europa que permanece até hoje na Alemanha (FERREIRA et al., 2011).

Com isso, o mercado cervejeiro da época, que se encontrava em expansão, apresentou aumento da produção, o que interferiu no consequente aumento da taxação dos cereais e dos impostos que chegavam a 50% do valor da bebida (MORADO, 2009).

Depois de anos em crises históricas e declínio da sua produção, o século XIX foi marcado pelo renascimento da cerveja devido ao avanço tecnológico e às mudanças no processo de produção industrial. Essa mudança no processo de produção está relacionada à proibição da fabricação da bebida nas cervejarias alemãs durante o verão, decretada pelo Duque Albrecht V da

Baviera, que permitia apenas a produção durante o inverno. Isso, felizmente, repercutiu de forma positiva, pois essa exigência de produção apenas no inverno, sendo necessária guardá-la para ser consumida no verão, possibilitou o surgimento das cervejas tipo Lager (significa “guardada, armazenada”), que apresentavam sabor acentuado e aparência mais clara e leve. Dessa forma, foi descoberta a fermentação a frio (MORADO, 2009; FERREIRA et al., 2011). Ressalta-se ainda, que nessa época, não eram conhecidas as leveduras, as quais hoje sabe-se que são responsáveis por tonar estas cervejas diferentes, e que no caso das Lagers, são chamadas de leveduras de baixa fermentação, que vivem melhor em ambientes frios (MORADO, 2009).

Outro avanço tecnológico que pode ser citado, é referente a secagem do malte, sendo usado a partir de 1642 o coque (carvão betuminoso), permitindo que os grãos fossem secos sem serem torrados, resultados nas cervejas claras (“*Pale Ale*”). Afinal, o processo mais comum era a secagem em fornalhas, deixando os grãos torrados, resultando em uma cerveja escura e com notas de fumaça; ou secos naturalmente (não muito comum), para produção de cervejas claras (BELTRAMELLI, 2012).

Já o desenvolvimento científico e industrial mais importante da época foi a fabricação da primeira Pilsen (ou Pilsener) em 1842, fruto do empenho do mestre cervejeiro Josef Groll, que produziu uma nova cerveja clara e carbonatada, com sabor acentuado e refrescante, advindo de uma necessidade de evitar possíveis contaminações que estavam ocorrendo nas cervejas naquele momento (MORADO, 2009).

Com a Revolução Industrial, muito se desenvolveu no que se refere a produção de cerveja, deixando de ser uma atividade doméstica para uma escala industrial, como: melhoria dos sistemas de refrigeração; desenvolvimento dos meios de transporte; uso de microscópios e termômetros no acompanhamento do processo de fermentação e controle de temperaturas; descobertas da fórmula de fermentação por Gay Lussac e da pasteurização por Louis Pasteur, proporcionando melhor entendimento no processo de fermentação; e o isolamento das primeiras culturas puras de leveduras pelo dinamarquês Emil

Christian Hansen, influenciando na estabilidade organoléptica (MORADO, 2009). Sendo este último, de maior interesse nesse estudo.

Em suma, o mercado cervejeiro encontrava-se em ascensão, todavia, no final do século XIX e início do século XX houve uma nova retração do mercado devido à Lei Seca, que reprimiu o consumo de álcool, principalmente nos EUA, Inglaterra, Bélgica e Reino Unido, pelo fato da população estar vivendo um assustador crescente alcoolismo. Com isso, a produção caseira foi proibida, sendo possível beber apenas nos *Public Beers Houses* (Pubs), o que aumentou o incentivo à produção de cerveja industrial e a aberturas de muitos estabelecimentos cervejeiros (BELTRAMELLI, 2012).

Isso também aconteceu nos EUA (Estados Unidos da América), entretanto, essa preocupação com o consumo de álcool data desde o século XVII na época da colonização, sendo muito antes da promulgação da “Lei Seca”. Antes dessa lei, foram surgindo movimentos antialcoólicos, que perduraram de 1870 a 1880, o que gerou mais um aumento da produção de cerveja, do que da população que não cresceu no mesmo ritmo, sendo a Lei Seca promulgada em 1918 e abolida em 1933 (FERREIRA et al., 2011).

Após as duas grandes guerras mundiais, o cenário do mercado cervejeiro reiniciou sua ascensão, sendo estimulado o renascimento das cervejarias europeias e um *boom* no número de microcervejarias norte-americanas, resgatando a criatividade e o dinamismo oferecendo novidades para um novo mercado cervejeiro que estava surgindo (MORADO, 2009).

A procura crescente por um produto diferenciado começou por volta do ano de 1970 nos Estados Unidos, chamado de “revolução cervejeira”, um movimento dedicado a cultura artesanal e a exaltação das cervejas artesanais, que se espalhou para a Europa, Estados Unidos, Ásia e mais recentemente, América Latina (FERREIRA et al., 2011).

Essas últimas duas décadas apresentaram um grande crescimento do mercado cervejeiro, tanto na área industrial como, principalmente, no que se refere a produção de cervejas artesanais. A preocupação com cervejas diferenciadas, com diferentes características, aromas, sabores e cores, são consequência do uso de diferentes insumos, que se preocupam com qualidade

e, principalmente, o estudo e desenvolvimento de leveduras, que influenciam no processo de fermentação dessa bebida apreciada pela humanidade.

1.2 Processo de produção de cerveja

O processo produtivo de cerveja consiste na submissão da mistura de água e malte a ações enzimáticas para transformação do amido em açúcares fermentescíveis; na filtração do mosto para a separação da parte sólida da líquida; na fervura para melhorar a estabilidade coloidal e dar os aromas e o amargor do lúpulo; no resfriamento e inoculação da levedura para fermentação, formação do álcool e outras substâncias; na maturação, momento onde ocorre a estabilização da bebida por meio do resfriamento; na centrifugação e filtração para retirar sólidos em suspensão e deixar a cerveja mais límpida; e no envasamento e distribuição.

A Figura 1 apresenta os equipamentos utilizados no processo produtivo da cerveja. A seguir, segue a descrição detalhada em tópicos referente as etapas desse processo.

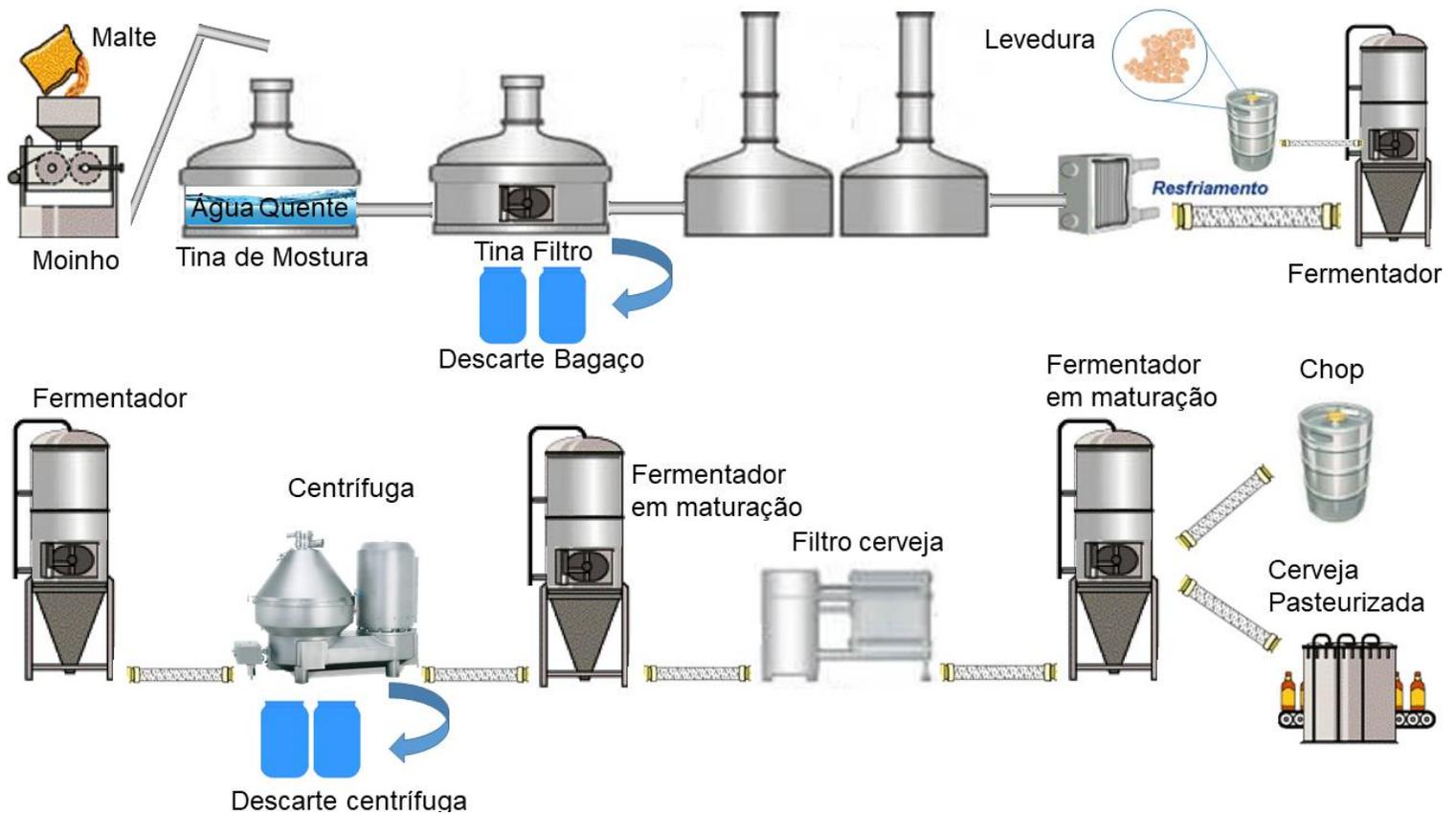


Figura 1. Fluxograma do processo produtivo de cervejas. Fonte: Elaborada pelo Autor.

Processo de Malteação

O processo de malteação antecede o processo produtivo da cerveja. Os grãos de cevada que chegam às cervejarias já são malteados, porém, isso acontece em um processo industrial a parte que também se encontra em grande crescimento com aumento do consumo de cervejas puro malte no mercado nacional e internacional.

O processo de malteação consiste em intumescer os grãos de cevada com água para quebrar a dormência do embrião e forçar a germinação, a qual possibilita a formação das enzimas e modificação dos grãos. Em seguida, essa modificação é interrompida até o ponto desejado por meio de secagem e, por último, ocorre a crivagem, que é a retirada das radículas formadas.

Na malteação, há a quebra de estruturas internas dos grãos através de ação enzimática disponibilizando componentes mais simples de serem clivados e disponibilizados no processo de fermentação.

Processo de moagem

O processo de moagem consiste na quebra dos grãos de malte para facilitar o acesso ao amido. Para a cervejaria, esse processo é de extrema importância para o rendimento final, pois uma moagem ineficiente deixará os grãos inchados e o amido não irá se misturar a água.

Além do mais, uma moagem muito fina pode entupir o sistema, já que as cascas que ajudam na filtração foram trituradas, paralisando a etapa de filtração e causando prejuízos em tempo de processo. Além disso, essa moagem também pode favorecer o aumento da adstringência e o aumento da cor da bebida.

Nas cervejarias, são utilizados dois tipos de moinhos, o de rolos ou o moinho martelo. Estes são escolhidos de acordo com o sistema de filtração adotado pela cervejaria. O moinho de rolos é utilizado, geralmente, para tina filtro, já o moinho martelo, é utilizado quando há um filtro do tipo prensa.

Tina de mostura

Mosturação, ou brasagem, é a cocção do malte em água cervejeira (água com ajuste de pH para melhor ação enzimática e adição de sais). Nesta etapa, as enzimas sintetizadas durante a malteação, que estão presentes nos grãos de cevada entram em ação convertendo o amido do malte em açúcares fermentescíveis, além de proteínas e vitaminas (Tabela 1).

Tabela 1. Temperaturas e pH ótimos para ação enzimática.

Enzima	Atuação	pH	Temperatura [°C]
Hemicelulase	Decomposição da hemicelulose para glucanos de baixa e média massa molar	4,5 a 4,7	40 a 45
Exo-Peptidase	Decomposição das proteínas de alta e média massa molar	5,2 a 8,2	40 a 50
Endo-Peptidase	Decomposição das proteínas para produtos intermediários de alta e média massa molar	5,0	50 a 60
Dextrinase	Desagregação do amido para maltose e maltotriose pela desagregação das combinações 1-6	5,1	55 a 60
β - amilase	Decomposição do amido para maltose pela desagregação das combinações 1-4	5,4 e 5,6	60 a 65
α -amilase	Decomposição do amido para dextrinas inferiores pela desagregação das combinações 1-4	5,6 e 5,8	70 a 75

Fonte: Tshope (2001).

Após a ação enzimática e a total transformação do amido, o mosto é aquecido até a temperatura de *mash-out* (77°C). Essa temperatura possui duas funções: a de inativação enzimática e a de transformação para um líquido mais fluído.

A inativação enzimática é um fator importante para o controle do perfil de açúcares e de proteínas do mosto. A elevação da temperatura também diminui a viscosidade do mosto, facilitando a extração de açúcares presentes no bagaço.

Tina de clarificação

Na tina de clarificação, o bagaço do malte se direciona para o fundo que contém uma malha fina vazada. A união dessa cama de malte e o fundo torna-se um substrato filtrante que auxilia a clarificar a parte líquida por meio de recirculação do mosto sobre essa camada filtrante. Além disso, essa tina tem por objetivo extrair o máximo de extrato com a lavagem do substrato com água cervejeira. Após a clarificação, a fase líquida é direcionada para a tina de fervura e o bagaço de malte é retirado do processo.

Tina de fervura e *Whirpool*

A tina de fervura tem como finalidade garantir a esterilidade do mosto através da própria fervura; eliminar alguns aromas indesejáveis do processo de cozimento dos grãos; concentrar os açúcares para o volume previsto destinado a fermentação; promover o amargor e aromas do lúpulo; e coagular proteínas de alto peso molecular (substâncias que prejudicam a estabilidade coloidal da cerveja).

O lúpulo adicionado nesta fase libera, através de reações de calor, o alfa e beta ácidos, os quais são responsáveis pelo amargor da cerveja. Além de inserir sabores e aromas deste vegetal, este composto apresenta ação bacteriostática promovendo maior conservação do produto.

Após a fervura, o mosto é submetido a uma força centrífuga por bombeamento para que as proteínas e o resto de lúpulo se concentrem no fundo da tina, para que então, fiquem separados da parte líquida. Essa parte sólida é chamada de *trub* e não é aproveitada para a etapa seguinte. Esse bombeamento, geralmente, ocorre em uma tina de fundo plano chamada de tina *Whirpool*.

Resfriamento (*Chiller*)

Antes do mosto ser direcionado para os tanques fermentadores, ele é resfriado até a temperatura de inoculação (temperatura ótima de trabalho do micro-organismo).

O *Chiller* é um equipamento que realiza a troca de calor através de canais de passagem que apresentam contrafluxo do líquido aquecido com outro líquido com baixa temperatura. Ele apresenta várias camadas para que a superfície de contato seja a maior possível e aumente a agilidade do processo. Além do CIP (*Clean in place*), esse sistema é desinfetado com frequência por passagem de água acima de 80°C.

Fermentação

A fermentação¹ é um processo bioquímico realizado por alguns microrganismos para obtenção de energia, sendo utilizados pelo homem para o desenvolvimento de combustíveis, bebidas, alimentos e medicamentos.

O piruvato gerado pela glicólise, que ocorre independentemente entra na fermentação alcoólica é convertido em acetaldeído e, em seguida, é transformado em álcool.

Esse processo ocorre durante a fabricação da cerveja no período de dois a sete dias, em seguida, o tanque fermentador é resfriado para cessar qualquer atividade fermentativa. A união da temperatura, o formato do tanque e a pressão interna contribuem para a decantação das leveduras que são retidas do tanque para então, iniciar o processo de maturação.

Cerveja em maturação

A maturação é um processo de guarda fria que não possui um tempo determinado, pois depende do estilo da cerveja. Esse processo é basicamente um arredondamento ou a estabilização da cerveja. Nesse momento, ocorre uma etapa mais longa de clarificação da cerveja, redução de aromas indesejáveis e correção da carbonatação

Descarte da centrífuga e filtração

A centrifugação é um processo de retirada de sólidos insolúveis da cerveja. A centrífuga é usada após a fermentação para retirada de leveduras e de lúpulo que tenham ficado em suspensão, agilizando o processo de maturação. Esse procedimento aumenta também, a estabilidade coloidal da cerveja devido a esta retirada.

A filtração é outro processo para garantir a estabilidade de sabor e estabilidade coloidal da cerveja, que consiste na passagem da cerveja por poros

¹ O processo de fermentação será aprofundado no item 1.5.

de filtros muitas vezes envoltos por sílica, ou outras substâncias, para adsorção de proteínas de alto peso molecular e leveduras que possam alterar o sabor da cerveja após o seu envase.

Cerveja em barril

Após a filtração, a cerveja que se encontra no taque está pronta para ser envasada. O embarrilhamento é processo de trasfega da cerveja do tanque para barris de diferentes volumes por um sistema de contrapressão.

Inicialmente, a pressão do tanque e do barril são igualadas e, em seguida, por uma válvula de alívio, a pressão do barril é diminuída e a cerveja é escoada até o preenchimento final. Esses barris são direcionados à câmara fria.

Cerveja pasteurizada em garrafa

A cerveja é envasada também através de um sistema de contrapressão em garrafas de vidro, porém, ao invés de serem guardadas a frio, as garrafas passam antes por um processo de pasteurização e, posteriormente, são guardadas em temperatura ambiente.

Esse processo consistente em um tratamento térmico que reduz, sem uso de produtos químicos, a quantidade de microrganismos a uma condição confiável e à inativação de enzimas. Isso resulta em uma maior durabilidade das bebidas.

1.3 Estilos de cerveja

A elaboração de uma receita de cerveja é uma atividade muito específica e requer o conhecimento de todos os insumos e as técnicas de produção, todavia, alguns manuais podem auxiliar no direcionamento dessa atividade, como por exemplo, os de Strong (2011), Mallet (2014), Randy-Mosher (2015), Palmer (2006), White e Zainasheff (2013) e Kunze (2011).

Esses guias de cervejas auxiliam na organização de diversos tipos de cervejas em grupos que se assemelham em característica produtiva, ingredientes característicos (matéria prima), característica sensorial (aparência, aroma, sabor e sensação na boca), história e a faixa de perfil de características físico-químicas (densidade original, densidade final, cor, amargor e álcool).

Geralmente, algumas cervejas comerciais também são citadas como exemplo do estilo. É importante ressaltar que todos os guias se atualizam ao longo do tempo devido a descoberta de novas tecnologias de produção, incorporação de novos ingredientes, entre outros. Abaixo, o Quadro 1 apresenta a referência para categorização de estilos de cervejas segundo o *Beer Judge Certification Program* (BJCP, 2015).

Quadro 1. Referência de estilos de cervejas.

Categoria	Etiqueta	Significado
Intensidade		
	Intensidade Session	<4% ABV
	Intensidade Standard	4-6% ABV
	Intensidade Alta	6-9% ABV
	Intensidade Muito Alta	>9% ABV Color
Cor		
	Clara	palha a dourado
	Âmbar	âmbar a marrom acobreado
	Escura	marrom escuro a negro
Fermentação / Acondicionamento		
	Fermentação Alta	Levedura Ale
	Fermentação Baixa	Levedura Lager
	Qualquer Fermentação	Levedura Ale ou Lager
	Fermentação Wild	Levedura selvagem (sem ser <i>Saccharomyces</i>) ou por bactérias.
	Lagered	Acondicionamento a frio
	Envelhecida	Grande acondicionamento prévio (Guarda)
Região de Origem		
	Ilhas Britânicas	Inglaterra, Gales, Escócia, Irlanda
	Europa Ocidental	Bélgica, França, Países Baixos
	Europa Central	Alemanha, Áustria, República Tcheca, Escandinávia
	Europa Oriental	Polônia, Estados Bálticos, Rússia
	América do Norte	Estados Unidos, Canadá, México
	Pacífico	Austrália, Nova Zelândia
Família de Estilo		
	Família-IPA	
	Família-Brown-Ale	
	Família-Pale-Ale	
	Família-Pale-Lager	
	Família-Pilsner	
	Família-Amber-Ale	
	Família-Amber-Lager	
	Família-Dark-Lager	
	Família-Porter	
	Família-Stout	
	Família-Bock	
	Família-Strong-Ale	
	Família-Wheat-Beer	
	Specialty-Beer	
Época		
	Estilo Artesanal	desenvolvido na era moderna da cerveja artesanal
	Estilo Tradicional	desenvolvido antes da era moderna de cerveja artesanal
	Estilo Histórico	Atualmente não elaborar ou produção muito limitada
Aroma / Sabor dominante		
	Maltado	pronunciado aroma e/ou sabor de malte
	Ácido	amargor do lúpulo pronunciado
	Equilibrado	intensidade semelhante de malte e amargor
	Lupulado	lúpulo de aroma e/ou sabor
	Torrado	malte e/ou grãos torrados
	Doce	dulçor residual evidente ou sabor de açúcar
	Defumado	aroma/sabor de grão ou malte defumado
	Sour	caráter cítrico evidente ou acidez elevada intencionalmente
	Amadeirado	caráter de envelhecimento em madeira ou barril
	Frutado	Notável aroma e/ou sabor de frutas
	Condimentado	Notável aroma e/ou sabor de especiarias

Fonte: BJCP (2015).

1.4 Pesquisas nacionais envolvendo produção de cervejas

O movimento de abertura de microcervejarias no Brasil foi impulsionado no início desse século (século XXI), sendo registrado em 2020 um número em torno de 1383 estabelecimentos, que passaram, a partir de meados de 1990, a ampliar a fabricação de novos estilos de cerveja. Esse fato impulsionou o aumento do portfólio de bebidas brasileiras com diferentes teores alcoólicos, ingredientes, sabores e aromas e, em 2020, o Brasil ultrapassou a marca de 33.963 registros de produtos para cerveja (VASCONCELOS, 2017; MAPA, 2021). Isso sugere o aumento do interesse na qualidade e viabilidade de insumos para a produção dessa bebida, como por exemplo, o interesse na produção de leveduras para a fermentação de cerveja.

Nesse sentido, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos nos últimos dez anos com a finalidade de acompanhar o crescimento do mercado cervejeiro, o qual ainda se encontra em fase de organização e evolução. Assim, muitas empresas particulares e universidades estão investindo tecnologia e ciência no que se refere a equipamentos, insumos, mão de obra e, principalmente, conhecimento científico tanto para empresas de pequeno, como de grande porte.

De modo geral, o cervejeiro é quem faz o mosto, mas quem faz a cerveja é a levedura, afinal, o cervejeiro apenas controla os parâmetros para que a levedura faça seu trabalho da melhor forma.

O tema envolvendo o desenvolvimento ou isolamento de novas leveduras ainda é pouco explorado nesse cenário por se tratar de um organismo complexo. Poucos são os casos de produção de cepas comerciais desenvolvidas no país e a nível mundial e, no que se refere a utilização de leveduras selvagens, esse número ainda é menor (RIJSWIJCK et al. 2017).

1.5 Leveduras para a produção de cervejas

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota, tendo como características principais apresentarem formas

ovais ou esféricas com tamanho aproximado de 3 a 4 μm de diâmetro. Sua divisão celular ocorre por brotamento (fase assexual), crescem em habitats ricos em açúcares, são normalmente aeróbias facultativas e se desenvolvem bem por fermentação (SILVA, 2019).

A fermentação é uma rota metabólica para a produção de ATP (adenosina trifosfato). Os açúcares fermentescíveis são degradados pela levedura em aerobiose e anaerobiose quando há disponibilidade de açúcar no ambiente, sendo quebrado por meio da via Glicolítica, pois o carbono excedente é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase (VOET et al., 2000).

O piruvato, sob a ação da enzima piruvato descarboxilase, é dirigido para a formação de acetaldeído liberando CO_2 . Em seguida, ele é reduzido pela ação da enzima álcool desidrogenase, gerando álcool e regenerando o NAD^+ . O balanço energético gerado pela fermentação é a formação de duas moléculas de álcool, duas de CO_2 e duas ATP, que são originados de uma molécula de glicose (VOET et al., 2000), como mostra a Figura 2.

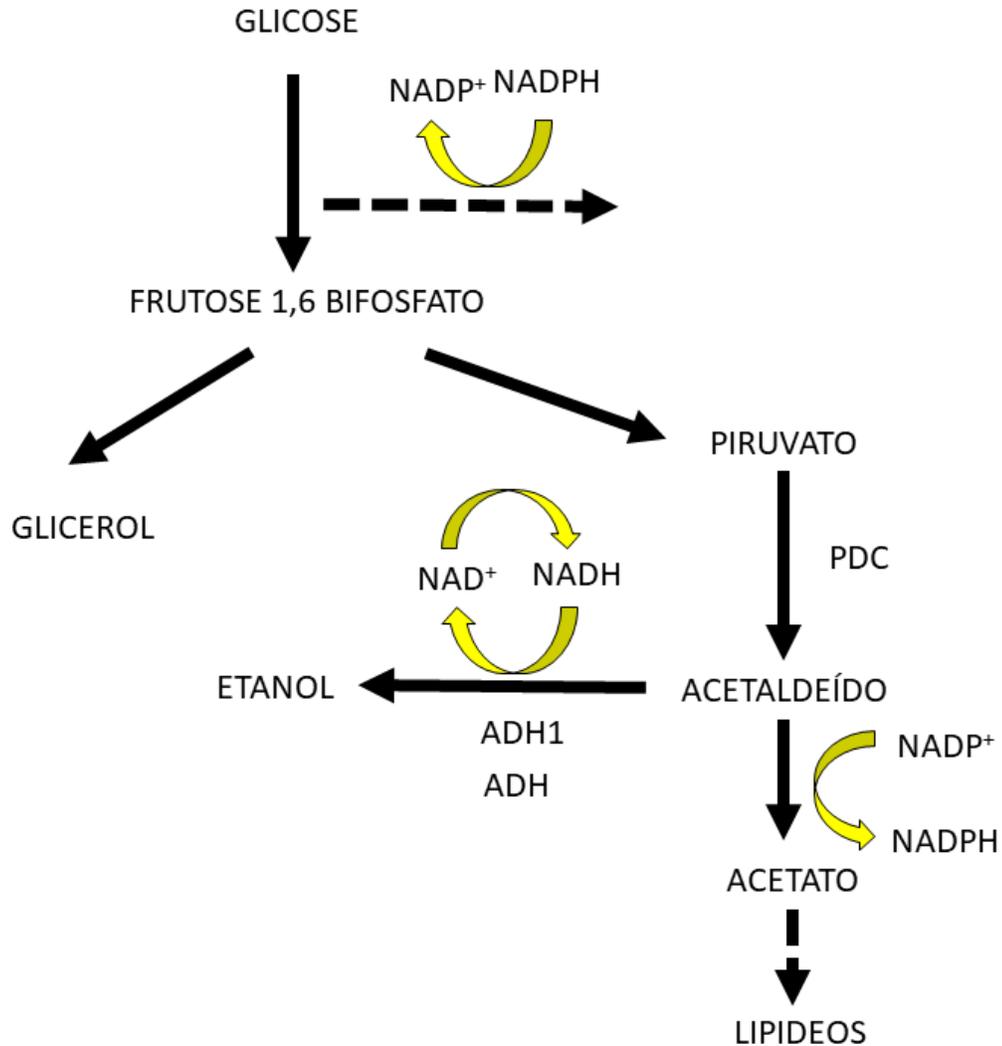


Figura 2. Vias metabólicas para a fermentação alcoólica. A molécula de Piruvato é descarboxilada para formação de Acetaldeído, em seguida ele é reduzido pela ação da enzima Álcool desidrogenase formando álcool e regenerando o NAD+. Fonte: Adaptado de Tilloy et al. (2015).

As leveduras no processo de produção de cerveja, não somente fermentam os açúcares, como também acrescentam *flavors* (sensação fisiológica da interação do paladar e olfato) específicos à cerveja, advindos de seus metabólitos secundários, os quais são: ácidos orgânicos, álcoois alifáticos de cadeia longa (álcoois superiores), álcoois aromáticos, ésteres, carbonilas, compostos sulfurados, compostos fenólicos, polioliol e dicetonas. Essas substâncias são produzidas durante a fermentação ou formadas pelo

agrupamento de substâncias presentes no meio (WALKER, 2016; BOKULICH; BAMFORTH, 2013; OLIVEIRA, 2011). Esses compostos observados durante a produção de cerveja têm origens diversas e podem gerar *on* e *off-flavours*², os quais são importantes na indústria cervejeira.

Os ácidos orgânicos estão relacionados diretamente a assimilação de aminoácidos e ao surgimento de aromas frutados, de queijo e amanteigados (KUCK, 2008). Já os álcoois superiores, podem ser influenciados por altas temperaturas e pelo baixo pH do mosto (HORAK et al., 2008), e também são subprodutos da assimilação de aminoácidos, podendo promover aromas alcoólicos e de solventes (KUCK, 2008; SILVA, 2019; WHITE ZAINASHEFF, 2010).

A união dos compostos acima forma os ésteres, que conferem a cerveja aromas frutados e florais. Estes compostos ocorrem pela transferência de grupo acetil para um de álcool superior (VERSTREPEN et. al., 2003) e são influenciados também, pela cepa da levedura, pelas temperaturas altas, pelo pH básico e pela concentração de nitrogênio alto (KUCK, 2008; SILVA, 2019; WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Outro aroma importante, o de maçã verde, ou os *off-favours* de amônia e verniz, são conferidos pelos aldeídos (principal-acetaldeído), os quais são formados pelo metabolismo da levedura e, também, pela degradação de aminoácidos (KUCK, 2008).

O dimetilsulfureto (DMS), que é evaporado durante uma fervura vigorosa do mosto, apresenta um aroma de milho ou vegetais cozidos. Uma fervura diminuta ou um resfriamento demorado podem favorecer estes compostos, pois ele deriva de um precursor da germinação da cevada e pode surgir também, pelo metabolismo de leveduras pela oxidação do dimetilsulfóxido (DMSO) (SILVA, 2019; ANNESS, 1982).

O diacetil (DA, 2,3-butanodiona) e a 2,3- pentanodiona são compostos que conferem aroma amanteigado e são encontrados durante a fermentação de cervejas e vinhos. Estes são ruins em altas concentrações (*off-flavours*) (SILVA, 2019).

² *On-flavours* são aqueles aromas e sabores desejáveis para determinados estilos de cerveja e os *off-flavours*, são aqueles indesejáveis

Os ácidos graxos, geralmente, conferem a cerveja um aroma de mofo, odor rançoso e estão relacionados, principalmente, a características das cepas. Assim como os aromas de ácidos graxos, os aromas fenólicos, gerados pelo metabolismo da levedura, são os 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiacol, os quais são produtos da descarboxilação dos ácidos p-cumárico e ferúlico e possuem aroma de cravo (SILVA, 2019).

Um mosto cervejeiro dividido em vários lotes e sob as mesmas condições de fermentação, porém inoculado por cepas de diferentes leveduras, irão apresentar características organolépticas totalmente diferentes no produto final devido às características de cada cepa no teor desses metabólitos secundários (Figura 3).

por outros microrganismos ou leveduras não *Saccharomyces* ou *Saccharomyces* selvagens.

A cerveja geralmente, é resistente à contaminação e a multiplicação de muitos microrganismos, inclusive a patogênicos devido a alguns fatores de proteção, como a presença de etanol, a ação bacteriostática dos lúpulos, o baixo pH(4,3), a elevada concentração de CO₂ e a baixa concentração de O₂ (SILVA, 2019).

Alguns fatores de produção também auxiliam nessa resistência, como o *mash* (mistura de água quente e os grãos macerados), a fervura, a pasteurização, a filtração e a estocagem a frio. Todavia, alguns fatores como os açúcares residuais (que são aqueles que não foram consumidos pelas *Saccharomyces*), as matérias primas, as tubulações, válvulas, mangueiras, fermentadores e envase, podem contribuir para a proliferação de microrganismos, especialmente com variedades que sejam prejudiciais à qualidade da sua cerveja (SILVA, 2019).

Os cervejeiros devem tratar com cuidado e atenção suas leveduras. Algumas cervejarias são justamente conhecidas por isso, pois as contaminações por outros microrganismos podem gerar lotes muito diferentes, podendo prejudicar a matriz. Devido a sua extrema importância na formação de aromas e sabores produzidos nas cervejas, é essencial que a cultura ou a compra destes microrganismos estejam livres de outros microrganismos contaminantes, que podem ser desde bactérias, até leveduras “selvagens” (MORADO, 2009).

O gênero *Saccharomyces* é o gênero mais comum utilizado no processo cervejeiro (BOULTON; QUAIN, 2008). As leveduras mais comumente utilizadas na produção de cervejas são as *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de alta fermentação) e *Saccharomyces uvarum* ou *Saccharomyces pastorianus* (levedura de baixa fermentação) (MORADO, 2019).

As leveduras de alta fermentação (Ale) se desenvolvem acima de 37 graus, porém são utilizadas na cervejaria em temperaturas de 18 a 22°C. Já as leveduras de baixa fermentação (Lager) não apresentam crescimento acima de 34°C e são providas de um gene MEL1 que produzem a melibiase, que permite a utilização dos dissacarídeos melibiose (glicose-galactose). Além disso, as

cervejas tipo lager são produzidas na faixa de temperatura de 7 a 15°C (VIDGREN et al., 2010).

Com relação às leveduras selvagens, estas apresentam crescimento em várias temperaturas e uma ampla capacidade de utilização de diversos açúcares. Essas leveduras contaminantes podem trazer “defeitos”, como a formação de película na superfície da cerveja, o desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis e o atraso na fermentação (SILVA, 2005). Todavia, algumas leveduras não *Saccharomyces* apresentam grande interesse para a indústria cervejeira, pois, além de possuírem bom desempenho na formação de álcool e gás carbônico, também podem apresentar compostos aromáticos e organolépticos diferentes dos encontrados normalmente (VASCONCELOS, 2017).

Alguns estilos cervejeiros utilizam leveduras selvagens e bactérias em seu processo produtivo e são caracterizados como fermentação do tipo Lambics ou selvagens. Galone et al. (2016) demonstraram que algumas leveduras comerciais cervejeiras derivaram de leveduras selvagens domesticadas durante a seleção humana, mostrando uma forte seleção específica da indústria para cepas tolerantes ao estresse, para a utilização de açúcares e na produção de diferentes sabores. A Figura 4 apresenta a relação de algumas cepas comerciais com suas origens, suas proximidades com leveduras selvagens e o seu uso na indústria.

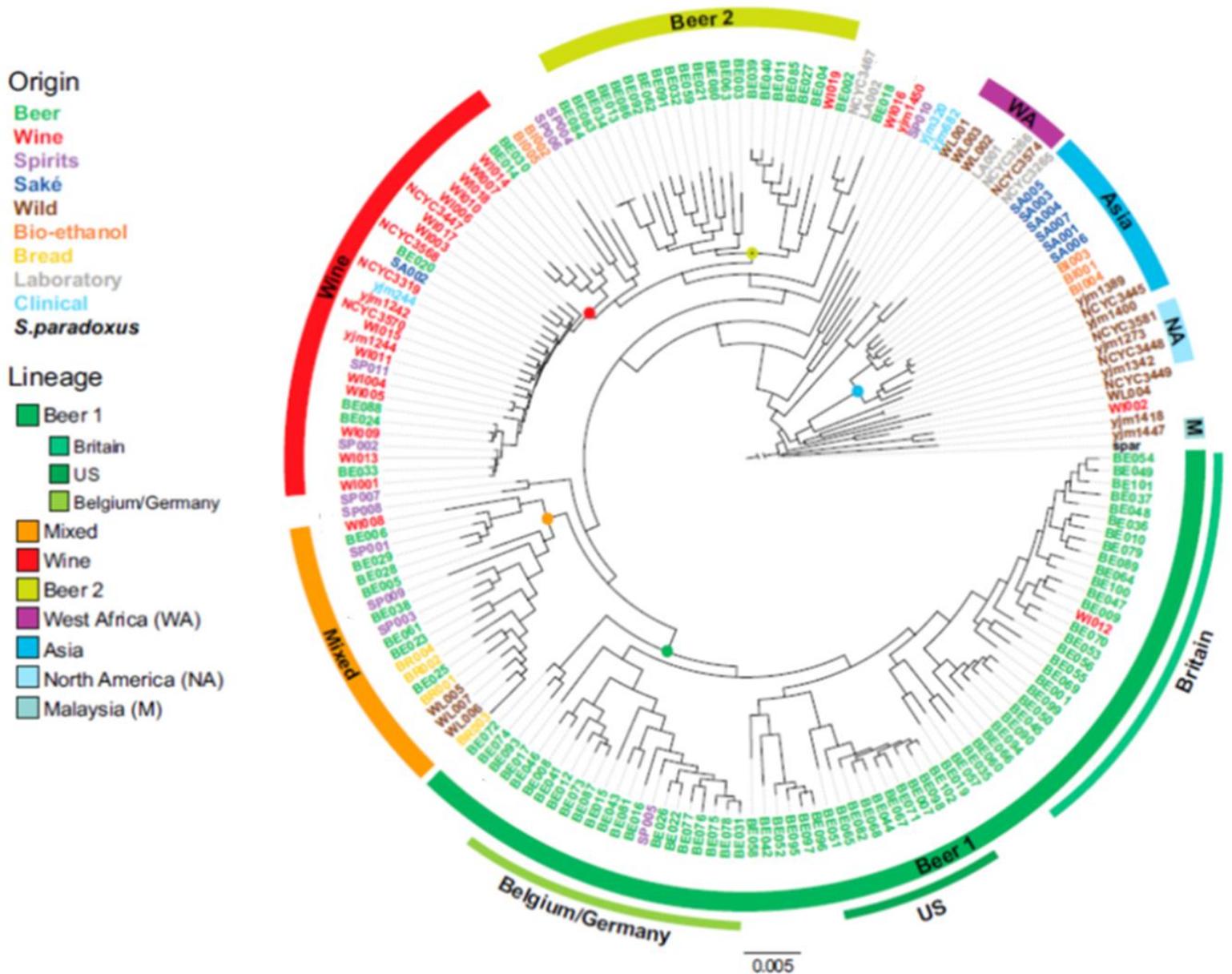


Figura 4. Árvore Filogenética de cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, e usado *Saccharomyces paradoxus* como grupo externo. Os pontos coloridos indicam a divisão basal de cinco linhagens industriais. Fonte: Galone et al, (2016).

1.6 Técnicas moleculares de identificação de leveduras

As metodologias utilizadas para a classificação taxonômica para identificação de leveduras consideram as características macro-morfológicas das

linhagens como formato e cor e testes em meios para verificar a assimilação de substratos, aspectos fisiológicos e bioquímicos (ANCHORENA-MATIENZO, 2002).

A classificação de leveduras ainda é uma grande dificuldade na área científica, porém, a classificação filogenética é a mais indicada, pois permite verificar a similaridade entre os microrganismos e uma melhor compreensão do seu processo evolutivo (KURTZMAN, 1988).

Assim, após o sequenciamento completo de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (S288C) (GOFFEAU et al., 1997), outras leveduras também foram sequenciadas e a representação de um grupo monofilético apresentou não ser mais usual, sendo a atual divisão caracterizada por: subfilo Saccharomycotina de Ascomycota ao qual pertence a *S. cerevisiae*, grupo monofilético mais bem sucedido de leveduras (quase dois terços de todas as leveduras conhecidas); subfilo Basidiomycota (representando ao todo cerca de um terço de todas as leveduras conhecidas); subfilo Taphrinomycotina de Ascomycota (~ 3% do total); e subfilo de Pezizomycotina, que são unicelulares ou dimórficos, nos quais a forma unicelular (levedura) é restrita a condições ambientais específicas (*Hortaea werneckii* e *Talaromyces marneffeii*) (DUJON; LOUIS, 2017; KURTZMAN et al. 2011).

Algumas técnicas atuais têm facilitado essa identificação e agilizado a montagem de bancos de leveduras, como por exemplo, as técnicas de Cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a amplificação de sequência microssatélite inter-delta e repetições em tandem intragênicas de minissatélites (CARVALHO-NETTO et al., 2013)

Porém, a técnica mais simples, rápida e de ampla identificação de leveduras é a utilizada por Esteve-Zarzoso et al. (1999), que utiliza a restrição da região rRNA do gene 5.8s rRNA e suas regiões intragênicas (ITS1 e ITS2), pelo fato dessas regiões apresentarem maior diferença interespecífica do que o rRNA 18s e 25s (KURTZMAN, 1993).

Conforme explanado no capítulo acima, uma das maiores preocupações dos cervejeiros é a contaminação do processo produtivo, pois podem gerar lotes diferentes de uma mesma cerveja. Sendo assim, metodologias como as de

Carvalho-Netto et al. (2013) podem revelar polimorfismos entre as cepas de leveduras industriais e os contaminantes autóctones, através dos primers SPA2c, MNN4c, PIR3c e EPL1, desenhados para identificação de cepas de produção de etanol que apresentaram sucesso para cepas de outros processos industriais como por exemplo os processos produtivos de cerveja, vinhos e sakês.

1.7 Justificativa

O presente trabalho tem como finalidade o desenvolvimento de leveduras e cervejas personalizadas com a identificação de toda a microbiota presente no processo produtivo para criação e caracterização de um banco de leveduras de uma microcervejaria. Além disso, propõem-se a relacionar determinadas linhagens e algumas características sensoriais da cerveja, identificando por mecanismos de expressão gênica, possíveis vias metabólicas ativadas nestas leveduras de potencial produtivo desejável.

O mercado de cervejarias brasileiras está em expansão e necessitado de novos produtos, por isso o presente trabalho tem um enorme potencial de aplicação neste segmento, uma vez que o grupo de empresas nacionais formadas para atender e fornecer os insumos necessários ainda estão em desenvolvimento. Adicionalmente, os produtos atualmente fornecidos ainda não apresentam a qualidade necessária, o que dificulta a investigação sobre os problemas ou a padronização de lotes do mesmo produto final.

Outro ponto importante a ser considerado é em relação ao custo elevado envolvido na compra de leveduras importadas e sua limitação de uso, que pode ser alterada através de isolamento de colônias e manutenção de bancos personalizados.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral conhecer e identificar novas leveduras para o comércio de cervejas artesanais. E como objetivos específicos:

- a) Identificar a diversidade de leveduras participantes do processo produtivo em uma microcervejaria;
- b) Caracterizar essas leveduras e entender a dinâmica de sucessão e quais as contribuições sensoriais dessas cepas;
- c) Relacionar a contribuição sensorial com as características territoriais que estão presentes naquela cervejaria;
- d) Identificar e reproduzir levedura(s) brasileira(s) de potencial para a indústria de bebidas e a montagem de um banco de microrganismos personalizado que pode ser usado para a produção de cervejas personalizadas;
- e) Verificar a eficiência produtiva e as características sensoriais de cervejas produzidas com os isolados;
- f) Identificar através do estudo da expressão gênica destas leveduras possíveis alterações em vias metabólicas que sejam de interesse da indústria cervejeira e desenvolver essas leveduras para contribuir para o processo produtivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LGBA) do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e a coleta dos mostos para o desenvolvimento do banco de leveduras foi realizada em uma cervejaria artesanal de pequeno porte na cidade de Ribeirão Preto no interior de São Paulo (-21.174917723229786, -47.835732897277055).

O presente estudo foi dividido em cinco etapas: (I) Coleta e propagação de Leveduras em treze pontos de produção englobando todo processo produtivo; (II) Análises e criação do banco de leveduras baseado inicialmente na morfologia; (III) Caracterização do banco através do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal; (IV) Seleção de leveduras com potencial produtivo; e (V) Produção de cerveja com a levedura selecionada em escala piloto.

3.1. Coleta e propagação de leveduras

3.1.1. Seleção e identificação dos pontos de coleta

Foi selecionada uma cervejaria artesanal de um município do interior paulista, que apresentasse um ambiente organizado, limpo e um processo produtivo padronizado e que gerassem lotes comerciais de cervejas com um padrão consistente, ou seja, que não houvesse grandes variações nos lotes produzidos e que fossem relevantes no cenário nacional. Nesses conformes, foi selecionada a Cervejaria Invicta.

A cervejaria Invicta foi fundada em 2011 pelo mestre cervejeiro Rodrigo Silveira. Ela apresenta distribuição para todo país, sua produção média varia de 70 a 100 mil litros de cerveja por mês, apresenta um portfólio com mais de 30 estilos de cerveja com inúmeras premiações nacionais e internacionais, além de possuir participação com outras cervejarias (*All Beers*, *Velhas Virgens*, *2 Cabeças*, *Urbana* e *Repense*). Atualmente, possui uma unidade fabril e um bar em Ribeirão Preto.

Os processos utilizados na produção de cerveja vão desde a formação do mosto (concentrado de açúcares provenientes do malte com a adição de água e lúpulo), até a transição para os tanques fermentadores, a inoculação da levedura, a fermentação, as purgas, a centrifugação, a trasfega, a filtração e o envase (garrafa ou barril). Foi necessário a seleção dos diferentes pontos de coleta de maior importância no processo de produção e nos insumos cervejeiros para seleção de leveduras com potencial para fermentação comercial e identificação da microbiota fermentativa. Esses processos estão representados na Figura 5 abaixo.

Ressalta-se que esta coleta foi realizada em um dia de produção de uma cerveja do tipo Lager (baixa fermentação) e a inoculação de um fermento comercial W34/70 (Fermentis).

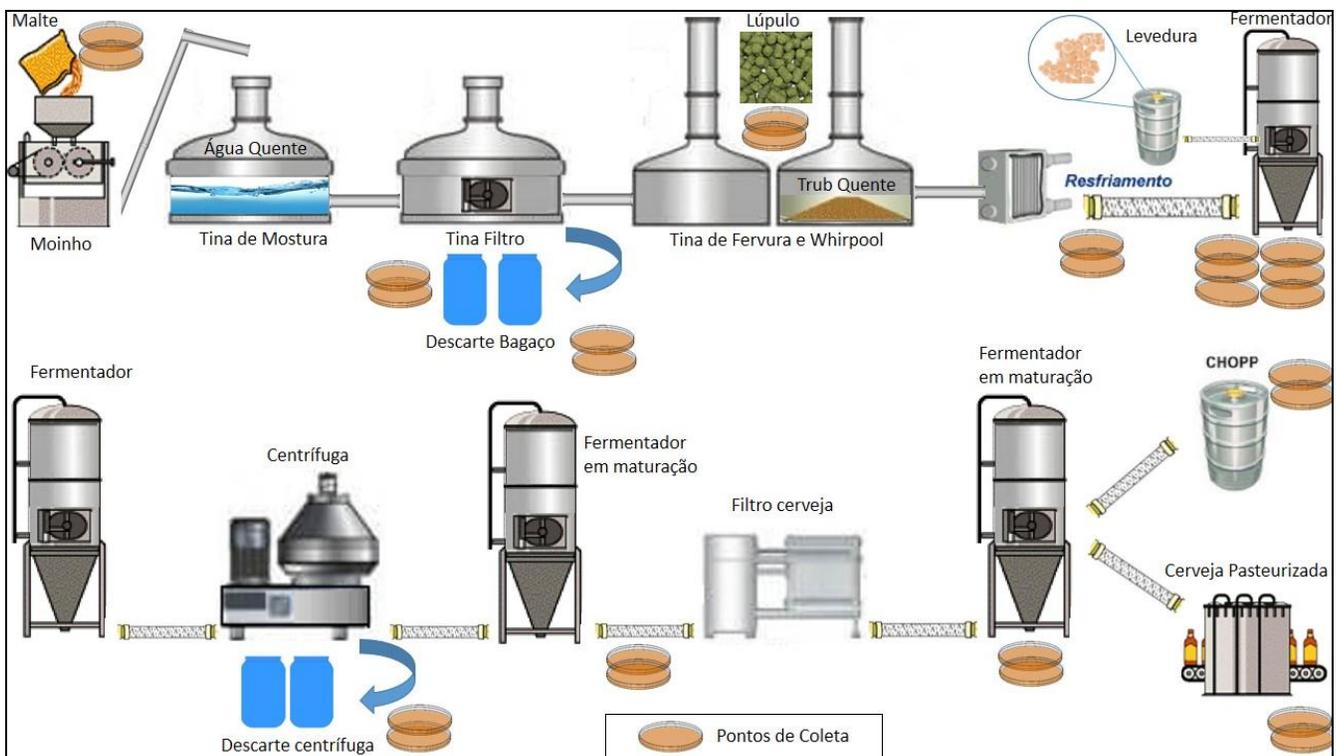


Figura 5. Fluxograma dos pontos de selecionados para realização da coleta.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Foram coletadas duas amostras de cada ponto em de tubos cônicos (15 ml) e diluídos com água estéril. Na sequência, essas amostras foram inoculadas em duas placas de Petri para cada ponto amostrado.

Na etapa de moagem, foram retirados alguns grãos do moinho. Já na tina filtro, foram coletadas amostras na parte superior e inferior da cama de malte moído que ficam próximas à peneira.

Também foi coletada uma amostra do lúpulo utilizado na produção antes de sua inserção na fervura. Outro ponto amostrado foram as mangueiras de transferência com o uso de uma pipeta estéril e, durante o resfriamento, foi realizado um esfregaço com o auxílio de um Swab.

Nas etapas seguintes, por se tratar da coleta de um meio líquido, estes foram retirados com a ajuda de pipeta estéril e colocadas em tubos cônicos (15ml) sem adição de qualquer diluente.

Durante a fermentação, foram coletadas amostras de cerveja: 24 horas após a inoculação do fermento; 72 horas após a inoculação (após 60% do extrato consumido-próximo); e outra no final da fermentação (extrato já consumido, acionamento do sistema de frio, 9 dias após a inoculação).

Após a fermentação e início da maturação, acontece o processo de centrifugação (média de cinco dias após a fermentação) para retirada de partículas em suspensão. Nesta etapa foi retirada uma amostra do descarte. Após a centrifugação, aproximadamente três dias, a cerveja é destinada a filtração, momento no qual foi retirado uma amostra na torneira de prova do filtro.

Ao finalizar o processo produtivo, foram obtidas duas embalagens, os barris de chope, que foram coletados através de extratora, e as garrafas de 600 ml, após pasteurização. Em ambos foi retirado os líquidos com pipeta e destinado a tubos cônicos (15 ml) estéreis e, em seguida, inoculados em placas de Petri, sem diluições

3.1.2. Resumo dos pontos de coleta

Foram selecionados um total de treze pontos de coleta que abordaram todos os processos produtivos e os insumos utilizados na produção de cerveja, totalizando vinte e seis placas de Petri inoculadas (Quadro 2).

Quadro 2. Pontos de coleta dentro do processo produtivo.

N° Ponto de Coleta	Pontos de Coleta	Abreviatura
1	Malte Pilsen	MP
2	Lúpulo Perle	LP
3	Lúpulo Tettnager	LT
4	Bagaço Superfície	BS
5	Bagaço Fundo	BF
6	Resfriamento	R
7	Fermentação 1	F1
8	Fermentação 2	F2
9	Fermentação 3	F3
10	Descarte Centrifuga	DC
11	Antes do Filtro	AF
12	Garrafa Pasteurizada	GP
13	Barril	B

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

3.1.3 Seleção de leveduras

Foram utilizados seis tubos cônicos (15ml-estéril) nos quais uma pequena (4grãos de malte, para os descartes cerca de 3g) porção dos insumos e dos rejeitos foram misturadas a 10 ml de água estéril (água autoclavada), sendo esta utilizada para diluir o inóculo e facilitar a extração. Em seguida, esses tubos foram fechados sobre a esterilização da borda do frasco em bico de Bunsen, deixando o inóculo em contato com a água durante dez minutos e agitando manualmente por um minuto.

Antes de iniciar a coleta do Resfriamento do Mosto (R), foi realizada a passagem de água a 80°C pela mangueira de transferência de mosto para sua esterilização. Logo após, o bombeamento do mosto resfriado foi interrompido, a mangueira foi desconectada e, com o auxílio de um Swab³, foi realizado um esfregão dentro da mangueira. Na sequência, o Swab foi colocado dentro do

³ Swab (Marca-ABOVE) consiste em uma técnica realizada com cotonete longo e estéril geralmente utilizado para coleta de secreção.

tubo Falcon contendo 10 ml de água estéril e foi realizado o procedimento conforme descrito anteriormente.

Já as coletas oriundas da fermentação (Fermentação 1, 2 e 3), após a filtração, envase em Barril de Chope (Barril-B) e o envase de garrafas (Garrafa Pasteurizada-GP), foram coletadas amostras de 50ul de cerveja e colocadas em tubos cônicos estéreis e vazios, totalizando seis tubos, os quais foram fechados conforme esterilização do bocal.

Foram inoculadas amostras com volume de 30ul (amostras que foram submetidas a agitação manual) e 50ul (amostras de cerveja coletada diretamente nos tubos Falcon) com o auxílio de pipetas do tipo Pasteur (estéreis) em placas de Petri e espalhadas por uma alça de *Drigalski* flambada.

Cada ponto de coleta foi inoculado no meio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose), meio usualmente utilizado para o crescimento de leveduras, contendo 1% de extrato de levedura, 2% de dextrose (D-glicose) e 2% de peptona. Quando utilizado para crescimento em placas (meio semi-sólido), foi adicionado 2% de ágar. Ressalta-se que em todas as placas foi adicionado ampicilina na concentração de 10µg/ml para evitar o crescimento de bactérias.



Figura 6. Etapas de inoculação dos pontos de coletas nos meios YPD 2%, Bancadas esterilizada com álcool 70%, inoculação atrás da chama do bico de Bunsen. Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.

3.1.4. Controle do crescimento das leveduras

As placas de Petri foram levadas ao Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) da UFSCar, onde foram incubadas a 30°C e, posteriormente, foram avaliadas a 48h.

Foram utilizados como controle positivo para o gênero *Saccharomyces* as linhagens: W34/70 (Lager) e S04 (Ale) - leveduras comerciais (Fermentis); e CAT- Linhagem comercial utilizada na produção de etanol. Para o controle negativo não *Saccharomyces*, foram utilizadas *Cândida albicans*.

Após o tempo decorrido, houve uma seleção fenotípica (morfológica) das unidades formadoras de linhagens que apresentaram crescimento nos diferentes meios e uma seguinte inoculação foi realizada referente as já selecionadas. Assim, de um total de vinte e seis placas, foram selecionadas 119 linhagens.

Essas linhagens de leveduras que se formaram foram isoladas e transferidas para novas placas também contendo meio YPD 2% e novamente incubadas à 30°C por 24 horas.

Após a incubação, elas foram transferidas para crescimento em tubos cônicos com meio YPD 2% líquido e submetidas a crescimento *overnight* a 30°C e 180 rotações por minutos dentro de uma incubadora com rotação.

Essas 119 amostras então, serviram para a formação e manutenção do banco de leveduras. Para isso, as amostras foram aliquotadas e estocadas em freezer a - 80°C após a adição de glicerol na concentração final de 30%.

3.2 Sequenciamento genético da região ITS para caracterização molecular das leveduras

O protocolo de extração de DNA foi realizado pela técnica de fenol clorofórmio (ESTEVE-ZARZOSO, 1999). Essa técnica consiste inicialmente em realizar a centrifugação do meio de cultura com as leveduras que foram submetidas a crescimento *overnight*, conforme descrito no item anterior, por 5 min, a 12°C e 4000 RPM.

Em seguida, foi realizado o descarte do sobrenadante e adicionado 500 microlitros de **solução tampão** de extração de levedura. Após a homogeneização, a amostra foi transferida para tubos cônicos de 1,5 mL contendo cinco pérolas de vidro. Esses tubos cônicos foram deixados por dez minutos em agitador do tipo vórtex na força máxima.

200 ul deste preparo foram transferidos para outros tubos cônicos de 1,5 mL, nos quais foram pipetados 100 microlitros de fenol e 100 microlitros de clorofórmio. Esses novos tubos cônicos de 1,5 mL foram colocados no vórtex por 10 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 4 °C e 12000 RPM.

Após a retirada das amostras da centrífuga e com auxílio de uma pipeta, foi retirado o DNA sobrenadante. Após a transferência dos respectivos DNAs para novos tubos cônicos de 1,5 mL, foi adicionado nos mesmos, 300 microlitros de isopropanol e o imediato armazenamento por 30 minutos no freezer a - 20 °C.

Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por cinco minutos a 4 °C e 12000 RPM.

O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300 microlitros de etanol aos pellets formados. Em seguida, efetuou-se uma nova centrifugação por um minuto nas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado novamente e as amostras foram deixadas na capela de fluxo laminar para secar em temperatura ambiente por vinte minutos. Por fim, foi adicionado 50 microlitros de água deionizada as amostras de DNA, seguido da homogeneização e armazenadas no freezer a - 20 °C.

A identificação de gênero *Saccharomyces* foi realizada através de amplificação por PCR, das regiões ITS-1 (Internal Transcribed Spacer), ITS1-F (5'ACGGTGAGAGATTTCTGTGC3') e ITS1-R (5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG3'). Essas regiões são espaçadores internos dos genes que codificam para o RNA ribossômico nuclear em eucariotos (18S, 5.8S e 28S), importantes na diferenciação intergenérica de leveduras (NILSSON, 2008).

Essas amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999), e visualizadas em luz ultravioleta. Ao mesmo tempo, é possível uma comparação com DNAs de controle não *Saccharomyces* (*Cândida albicans*) e *Saccharomyces* (W34/70, SO4) previamente identificados. Com esse passo, foi possível comparar os amplicons de DNA, com os correlacionados ou não ao gênero *Saccharomyces*.

As leveduras caracterizadas como *S. cerevisiae*, conforme comparação, foram submetidas a teste de genotipagem, baseado na metodologia descrita por Carvalho-Netto et al (2013), tendo como finalidade a verificação de quantas leveduras encontradas seriam iguais entre si, para que não fosse realizado o sequenciamento de organismos idênticos. Em seguida, as amostras do banco foram enviadas para o sequenciamento genético, utilizando o método Sanger.

3.3. Seleção de leveduras com potencial produtivo

3.3.1. Alinhamento e análises filogenéticas das cepas isoladas

Os resultados dos sequenciamentos foram ajustados utilizando o programa Bioedit v.7.0.5.3 (KATOH; STANDLEY, 2013) e a identificação e análise dos indivíduos no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para analisar a relação evolutiva das não *Saccharomyces* isoladas, inicialmente foi realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos de cada isolados com MAFFT (POSADA, 2018), utilizando configurações predefinidas. Posteriormente, foi utilizado o jModelTest (GUINDON et al., 2010) para estimar o modelo de substituição nucleotídica mais adequado para inferir relações filogenéticas de máxima probabilidade entre OBPs com PhyML (SANTOS et al., 2017).

3.3.2 Caracterização e desempenho das leveduras *Saccharomyces*

Ale ou Lagers

As *Saccharomyces* foram submetidas à análise microbiológica para verificar se eram leveduras de alta fermentação (Ale) ou de baixa fermentação (Lager), por meio do método EBC (European Brewery Convention). Essa metodologia consiste no crescimento das leveduras em meio Worth MERCK® (15g/L de extrato de malte, 0,75g/L de peptona, 12,75g/L de maltose, 2,75g/L Dextrina, 2,35g/L de Glicerina, 0,4g/L de dihidrogenofosfato de potássio, 1g/L Cloreto de Amônio, 20 g/L de ágar-ágar) a 30°C e 37°C. Ressalta-se que as leveduras que crescem apenas a 30°C são do tipo Lager e as que crescem nos dois ou acima de 37°C, são do tipo Ale.

3.3.3 Seleção de *Saccharomyces* sob condições diversas de temperatura e extrato

Para o teste de crescimento, foram utilizadas as seguintes condições de temperatura: a 18°C e a 10°C e meios com condições de grandes concentrações de açúcares (extrato de malte) 20 e 25°P (YPEM) ou 20 e 25 % de açúcar

As cinco linhagens selecionadas e cinco controles comerciais foram submetidos a um pré-inóculo em meio YPEM a 2% e crescido a 30°C por 12h. Em seguida, todas foram submetidas a diluições para atingir a $DO_{600nm}=0,1$ (densidade ótica $\rightarrow 10^6$ cél/ml) e inoculadas nos meios YPD; YPEM 2%; YPEM 20°P e YPEM 25°P, e colocadas para crescer nas diferentes temperaturas citadas acima (10, 18 e 30 °C) em 24h e em 48h.

Essa condição foi utilizada para realizar o *dropout* e plaqueamento nos diferentes meios em 5 diluições 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 e 10^2 . A condição de crescimento em 30°C e meio YPEM 2% foi considerada a condição controle (Figura07).

Inicialmente, foi realizado um pré inóculo para ativação da levedura que estava em freezer e glicerol a -80°C . Após crescimento por 12 horas, a amostra foi diluída para deixar todos sobre a mesma condição e, em seguida, foi inoculado nos meios YPD; YPEM 2%; YPEM 20°P e YPEM 25°P sob a condição controle de crescimento (30°C) e as condições de teste 10 e 18°C.

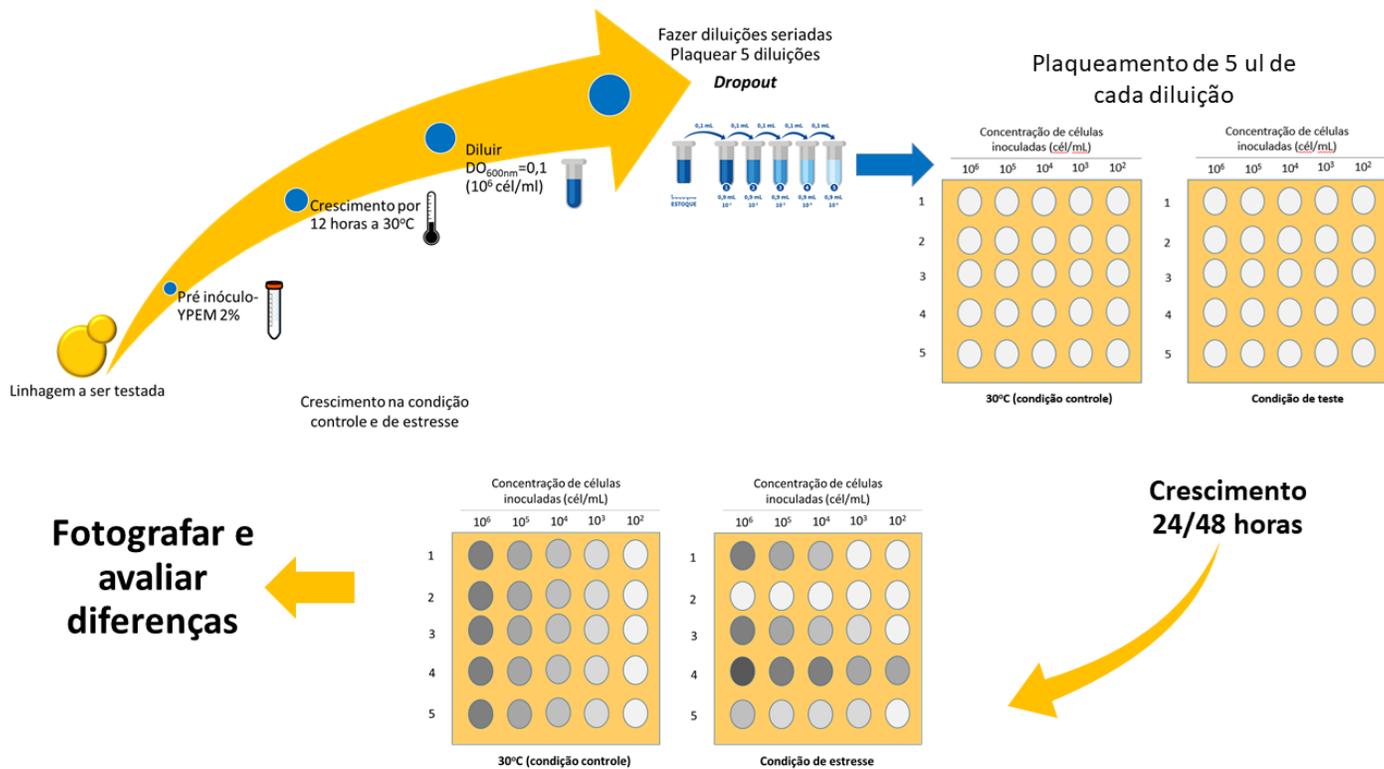


Figura 7. Modelo de inoculação de leveduras sobre condições diversas para avaliação de crescimento. Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.

Para a condição de crescimento em extrato de malte a 25°P foi realizado outro teste, o pré-inóculo saiu do freezer -80°C e foi ativado e crescido por 12 horas em YPEM 2%. Em seguida, foi medida a D.O e diluída a amostra para D.O de 0,1 e inoculada em meio líquido já contendo a condição teste (extrato de malte a 25°P) por 24h e 48 h e, na sequência, foi realizada a diluição seriada e inoculada em meio sólido contendo as mesmas características e avaliado o crescimento em 24h e 48h (Figura 08)

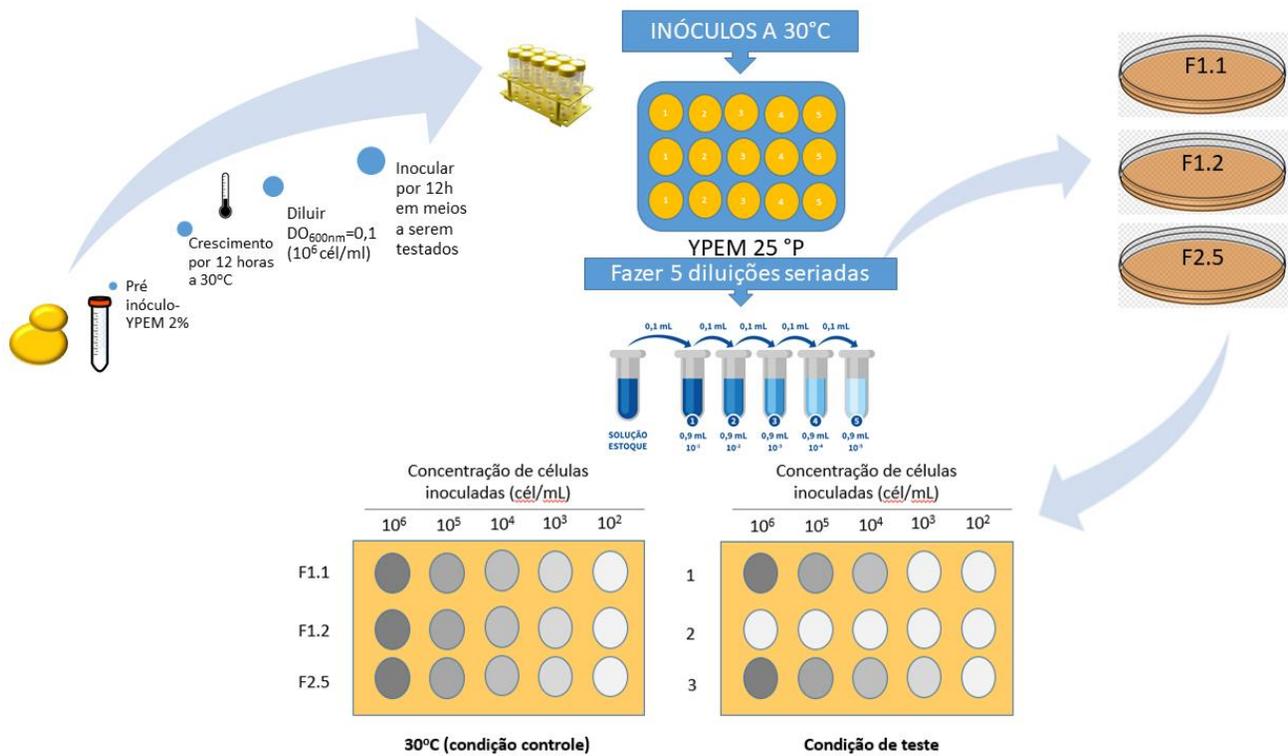


Figura 8. Modelo de inoculação de leveduras sobre condições de crescimento a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.

3.3.4 Seleção de *Saccharomyces* por análises em microproduções de cerveja

Todas as cinco linhagens selecionadas foram submetidas a uma fermentação em ambiente controlado para a produção de cerveja em escala de laboratório. De modo a exaltar o perfil sensorial da levedura, foi definida a produção de um mosto cervejeiro do tipo *American Pale Ale* (APA), sem *dry-hop*⁴, sendo este um estilo padrão com maior neutralidade e equilíbrio. Ou seja, com pouco perfil da levedura e do lúpulo e sem adições de adjuntos, para que então, qualquer perfil de aromas produzido pela levedura pudesse ser ressaltado.

Tal estilo é descrito pelo BJCP (2015, p. 69) como:

“18B. American Pale Ale Impressão Geral: Uma Ale clara, refrescante e lupulada, contudo com sustentação de malte suficiente para fazer uma cerveja equilibrada e de drinkability. A presença de lúpulo de perfil limpo pode ser reflexo da utilização de clássicos ou modernos varietais de lúpulos americanos ou do Novo Mundo, com uma vasta gama de características. Uma intensidade média de lúpulos transmitida por cervejas americanas claras está presente, geralmente equilibrada, para ser mais acessível que as modernas American IPAs. Aroma: Moderado a forte, de varietais de lúpulos americanos ou do Novo Mundo, com uma vasta gama de possíveis características, incluindo cítricos, floral, pinho, resina, especiarias, frutas tropicais, frutas de caroço, berries ou melão. Nenhuma dessas características específicas é necessária, mas o lúpulo deve ser aparente. Baixa a moderada maltosidade dá sustentação à apresentação dos lúpulos e pode apresentar, opcionalmente, pequenas quantidades de caráter de maltes especiais (de pão, tosta, biscoito, caramelo). Ésteres frutados variam de moderado a ausente. Dry hopping (se usado) pode adicionar notas gramíneas, embora este caráter não deva ser excessivo. Aparência: Dourado claro a âmbar claro. Colarinho branco a bege claro, moderadamente volumoso, com boa retenção. Geralmente bastante límpida, embora as versões em que é realizado dry hopping podem ser um pouco turvas. Sabor: Sabor de lúpulos moderado a alto, geralmente indicando um caráter de lúpulos americanos ou Novo Mundo (cítrico, floral, pinho, resinoso, picante, frutas tropicais, frutas de caroço, berries, melão, etc.). Baixo a moderado caráter maltado de grãos limpo dá suporte à apresentação dos lúpulos, e pode mostrar, opcionalmente, pequenas quantidades de caráter de maltes especiais (pão, tostado, biscoito). O equilíbrio é normalmente em direção aos lúpulos de adição tardia e ao amargor, mas a presença de malte deve ser sólida, não perdida ao fundo. Os sabores de caramelo são muitas vezes ausentes ou bastante restritos (mas são aceitáveis), desde que eles não colidam e suporte à apresentação atenuem a presença dos

⁴ *Dry-hop* é termo utilizado quando ocorre a infusão do lúpulo a frio para obtenção de aroma (colocado dentro dos tanques por meio de um hopgun ou um aparato que equilibra as pressões colocado sobre a válvula superior e em seguida despejado dentro do fermentador

lúpulos. Ésteres frutados derivados da levedura podem variar de moderados a ausentes, embora muitos varietais de lúpulos sejam bastante frutados. O amargor de lúpulo varia de moderado a alto, com um final semi-seco a seco. O sabor de lúpulo e de amargor, muitas vezes permanece no final, mas o retrogosto geralmente deve ser limpo e sem aspereza (harsh). Dry hopping (se realizado) pode adicionar notas gramíneas, embora este caráter não deva ser excessivo. Sensação na Boca: Corpo médio-baixo a médio. Carbonatação moderada a alta. Final geralmente macio, sem adstringência e aspereza. Comentários: Novas variedades de lúpulo e métodos de seu uso continuam a ser desenvolvidos. Os juízes devem admitir como correto o emprego de lúpulos modernos neste estilo, assim como as variedades clássicas. A American Pale Ale tornou-se um estilo de cerveja artesanal internacional, com adaptações locais surgindo em muitos países que experimentam um crescimento vertiginoso do mercado de cerveja artesanal. A maneira de adição de lúpulo pode variar desde a clássica adição massiva para amargor até os modernos exemplares com adições tardias de lúpulo; todas as variações são aceitáveis. História: Uma adaptação da English Pale Ale pela moderna Escola Americana de cerveja artesanal, revelando ingredientes de terroir americano (lúpulo, malte, levedura e água). Antes da explosão da popularidade das IPAs, foi tradicionalmente a mais conhecida e popular das cervejas artesanais americanas. Ingredientes Característicos: Malte Pale Ale, tipicamente o norte-americano, duas fileiras. Lúpulos americanos ou do Novo Mundo, com uma ampla gama de características aceitáveis. Levedura Ale americana ou inglesa (neutra a levemente frutada). Grãos especiais podem adicionar caráter e complexidade, mas geralmente correspondem a uma porção relativamente pequena do grist. Grãos que acrescentam sabor de malte e riqueza, leve dulçor, e notas de pão ou leve tostado são frequentemente usados (juntamente com lúpulo final) para diferenciação das marcas. Comparação de Estilos: Normalmente de cor mais clara, com subprodutos de fermentação mais limpos, e tendo menos sabores de caramelo do que as contrapartes inglesas. Pode haver alguma sobreposição na cor entre American Pale Ale e American Amber Ales. As American Pale Ale geralmente serão mais limpas, com menor perfil de maltes caramelados, menos corpo, e muitas vezes com lúpulos de finalização. Menos intensidade de amargor no equilíbrio e intensidade de álcool do que uma American IPA. Mais equilibrada e com maior drinkability, e menos intensidade de lúpulos de amargor do que uma American IPA de potencial alcoólico reduzido, com intensidade de sessão (Session IPA). Estatísticas Vitais: OG: 1.045 – 1.060 FG: 1.010 – 1.015 IBUs: 30 – 50 SRM: 5 – 10 ABV: 4.5 – 6.2% Exemplos Comerciais: Ballast Point Grunion Pale Ale, Firestone Walker Pale 31, Great Lakes Burning River, Sierra Nevada Pale Ale, Stone Pale Ale, Tröegs Pale Ale Etiquetas: Intensidade Standard, Cor Clara, Fermentação Alta, América do Norte, Estilo Artesanal, Família-Pale-Ale, Amarga, Lupulada” (BJCP, 2015, p. xxx).

Para isso, foi utilizado uma panela de inox elétrica (50L), com controle de temperatura e de tempo, para produção de mosto da marca SOLUBEER-Smart Brew I (Figura 9).



Figura 9. Painel de produção de mosto cervejeiro. Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.

Para a formação do mosto cervejeiro foi adicionado 6,400L de água sem cloro e com características brandas (poucos sais dissolvidos) da marca Crystal-Coca-Cola, com pH de 7,5. Foi adicionado 1 g de Cloreto de Cálcio (que auxilia na floculação da levedura e precipitação de proteínas) e 0,5 μ l ácido fosfórico 85% para reduzir o pH para 5,1 (pH ótimo utilizado na fervura para coagulação protéica).

Foi adicionado a esta água 732 g de extrato de malte *Dry-brew* (Marca-Liotécnica (Figura 10)). Em seguida, foi elevada a temperatura até 98 °C e a mistura fervida por 20 min (4% de perda de volume). Na sequência, foi adicionada à mistura 5 ml de Isohop® (BarthHaas), 30% de alfa-ácido para obtenção de 45 IBU (International Bitterness Units) conforme descritivo do produto e cálculos abaixo (Figura 11).

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Certificado Nº 284101/21

Descrição do Produto:	EMS 100 EXTRATO MALTE SECO - DRY BREW 10x1KG		
Código do Produto:	120070657	Lote:	236977
Data de Validade:	12/07/2022	Data Fabricação:	12/07/2021
Quantidade:	5,00 (CX)		

ITENS ESPECIFICADOS

ANÁLISES	UNIDADE	MÉTODO	ESPECIFICADO	RESULTADO
MATERIAS ESTRANHAS		MTA3.0048	AUSENTES	Ausente
PH 4,5 - 6,0	Sol 10%a20°C	MTA3.0052	4,50 - 6,00	5,40
UMIDADE 4,0 M	%	MTA3.0054	0,00 - 4,00	2,50
ACIDEZ 25,0 M	mL NaOH 0,1N	MTA3.0003	0,00 - 25,00	16,10
ASPECTO		MTA3.0056	Característico	ok
ODOR		MTA3.0058	Característico	ok
SABOR		MTA3.0059	Característico	ok
SALMONELLA/25g		MTA3.0073	Ausente/25g	Ausente
E.COLI	UFC/G	MTA3.0068	0,00 - 10,00	0,00
COLIFORME 45°C	UFC/G	MTA3.0068	0,00 - 10,00	0,00
BOLORES / LEVEDURAS	UFC/G	MTA3.0070	0,00 - 100,00	10,00
COLIFORMES 35°C	UFC/G	MTA3.0068	0,00 - 10,00	0,00
CONTAGEM TOTAL M 10.000	UFC/G	MTA3.0069	0,00 - 10.000,00	2.700,00
B.CEREUS M 1000	UFC/G	MTA 3.0066	0,00 - 1.000,00	0,00
PROTEÍNA	%	MTA3.0029	5,00 - 8,00	7,89
CARBOIDRATOS TOTAIS	%	MTA3.0061	85,00 - 100,00	88,63
MALTOSE	%	MTA3.0055	60,00 - 100,00	83,20

OBSERVAÇÕES

--

APROVAÇÃO

Responsável:	Kelly Cristina Martins -
Data:	14/07/2021

Este certificado de análise foi gerado eletronicamente e é válido sem assinatura

Fábricas 1 e 4: Av. Joao Paulo I, 900
 Jd. Santa Barbara - Embu das Artes
 CEP: 06818-901 - São Paulo - SP

Fábrica 3: Av. Joao Paulo I, 1098
 Morro do Camargo - Embu das Artes
 CEP: 06817-000 - São Paulo - SP

Fone: 55 11 4785-2300 e-mail: qualidade@liotecnica.com.br www.liotecnica.com.br

Figura 10. Laudo técnico do extrato de malte Dry-brew Liotécnica. Fonte: Liotécnica.

Isohop®

CHARACTERISTICS:

Iso- α -acids are the native bittering acids found in traditionally hopped beer. Isohop® is a standardised solution of iso- α -acids (30% w/w) produced from CO₂ hop extract using an all-aqueous process. Isohop® is used to replace kettle bittering hops to improve hop utilisation or to adjust bitterness in beers that may have been under-hopped in the kettle. For precise control of beer bitterness, Isohop® should be added post-fermentation to adjust the bitterness of the beer to the target bitterness units (BU). It may also provide an economic alternative to kettle hopping when performing high-gravity brewing. When hopping does not go according to plan, Isohop® will help to get back on target. Isohop® will contribute to foam stand and cling similar to that of traditional bitter hopping (whole hops, pellets, or CO₂ extract). Isohop® will also act as a natural antimicrobial agent when added to beer. Isohop® provides a very good utilisation along with comparatively low costs. Isohop® is classified by the U.S. FDA as a modified hop extract that may be safely used in beer in accordance with US FDA regulation 21 CFR 172.560 (b) (2-5).

PRODUCT SPECIFICATIONS

Description: A pale yellow to amber aqueous solution of the potassium salts of iso- α -acids

Concentration: Standard concentration is 30.0% \pm 0.5 of iso- α -acids by HPLC

pH: 8.0 - 10.0

Density: 1.075 g/mL (approximately) at 20 °C (68 °F)

Viscosity: 10 - 20 mPas at 20°C (68°F)

Solubility: Soluble in pH-adjusted de-mineralised water, and in alcohol

α -acids: < 0.7%

β -acids: < 0.3%

QUALITY AND FOOD SAFETY:

Barth-Haas maintains quality management systems registered to the ISO 9001 standard, as well as food safety management programs based on internationally recognised (HACCP) principles. Please refer to our web site (www.barthhaas.com) for more information on our systems and programs.

$$\begin{aligned} \text{Desired Sensory Bitterness Units} &= \text{BU} \\ \text{Dosage IAA in mg/L (80\% utilisation)} &= \text{BU} \times \frac{100}{80} \\ \text{Dosage in grams IAA per hL of beer} &= \text{BU} \times \frac{100}{80} \times \frac{100}{1000} \\ \text{Dosage amount of Isohop® (30\% IAA) in g/hL :} \\ \text{BU} \times \frac{100}{80} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{30} \text{ g/hL} &= \text{BU} \times 0.42 \text{ g/hL} \\ \text{Amount of Isohop® (30\% IAA) in mL/hL :} \\ \text{BU} \times \frac{100}{80} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{30} \times \frac{1}{1.075} \text{ mL/hL} &= \text{BU} \times 0.39 \text{ mL/hL} \end{aligned}$$

Figura 11. Descritivo do produto e cálculos para dosagem Isohop®. Fonte: BarthHaas (2021) (acesso <https://www.barthhaas.com/en/product/isohopr>).

O mosto final foi elaborado com 11,5 °Platos (concentração em massa das diversas substâncias presentes no mosto, açúcares, dextrinas, proteínas-m soluto/m solução) ou 1,0467 de densidade. Em seguida, foi transferido para 18 frascos Schott de 500 ml com um volume final de 400 mL e resfriados até 20 °C para inoculação das leveduras. Antes de inocular, foi realizada a contagem das leveduras e verificada sua vitalidade. Logo após, foi inoculado $1,65 \times 10^{10}$ células/mL correspondentes a cada linhagem, em triplicata.

As leveduras coletadas foram retiradas do freezer - 80°C e os crio-tubos (tubos cônicos com levedura e glicerol para evitar ruptura celular) foram deixados para descongelar por alguns minutos dentro da capela de fluxo laminar. Com o auxílio de uma alça, foi retirada uma pequena porção e colocada em tubos cônicos de 50ml contendo meio YPD 2%. Em seguida, estes ficaram sob agitação constante em shaker com 150 RPM e controle de temperatura a 30°C por 24h. Após esse período, foi verificada a quantidade e a viabilidade das células pelo método EBC e uso de microscópio, para que estão fosse separado o volume para inoculação de cada produção.

Os frascos foram incubados com controle de temperatura a 24°C e sem agitação. As tampas ficaram entreabertas e recobertas por uma bexiga com um pequeno furo, para criar uma atmosfera positiva e evitar a entrada de microrganismos. Os frascos também, foram identificados quanto à cepa de

levedura selecionada, F1.1, F1.2, F1.6, F2.5 e GP2 e S04, sendo esta última de linhagem comercial (Figura 12).



Figura 12. Fermentação experimental realizada em frascos Schott estéreis com um mosto comum de 11°P e variando a cepa de levedura inoculada F1.1, F1.2, F1.6, F2.5, GP2 e S04. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

O acompanhamento da fermentação foi realizado no início e no final por meio da avaliação da densidade e do álcool. Após doze dias de fermentação (sem agitação), a temperatura foi reduzida até 2 °C. Em seguida, foi deixada a amostra em guarda fria por mais dez dias e, então, o precipitado de levedura e de proteínas foi retirado com auxílio de uma seringa e agulha, ambas estéreis para não contaminar o meio.

Após a maturação, as amostras foram transferidas para garrafas pet esterilizadas (autoclavadas) (300ml) e carbonatas com CO₂ classe 5 e o auxílio de uma válvula do tipo carbonator com 2,2 de vol. CO₂.

Em seguida, essas amostras foram pasteurizadas em túnel pasteurizador Krones, modelo Sander Ransen, com capacidade para 50.000 garrafas/hora e destinadas a análises físico-químicas, voláteis e sensoriais em uma cervejaria multinacional de um município do interior paulista. A amostra que apresentou melhor perfil sensorial foi selecionada e destinada a uma produção com volume de dez litros.

3.4 Produção de cerveja com a levedura selecionada

3.4.1 Produção de um lote de cerveja com a levedura escolhida pelo painel sensorial

Para a produção de um lote maior de 10L, foram utilizada as mesmas condições do experimento descrito anteriormente. Todavia, foi utilizado um fermentador cônico de 30L com ajuste de pressão da marca Fermenzilla – Kegland, como mostra a Figura 13.

Inicialmente, este equipamento foi esterilizado por um espumamento com solução detergente com o auxílio de uma bucha virgem para a retirada de qualquer incrustamento. Logo após, foi realizado um enxágue com água abundante a 80°C. Em seguida, foi adicionada ao fermentador uma solução com auxílio de ácido peracético 0,3% e deixada em contato com o equipamento por quatro horas. Por último, esta solução foi enxaguada com água a 80°C e álcool 70% para a finalização da sanitização.



Figura 13. Fermentador cônico.

Fonte: <https://brewheadshop.com.br/fermentador-conico-fermzilla-35l-completo>

Para que o mosto fosse produzido com as mesmas características do experimento acima, com 11,5°P ou 1,0467 de densidade, foi necessário adicionar 10,400L de água. A água utilizada foi sem cloro e com características brandas (poucos sais dissolvidos) da marca Crystal-Coca Cola, com pH de 7,5, sendo adicionado 1,6 g de Cloreto de Cálcio e 0,8 µl ácido fosfórico 85% para reduzir o pH para 5,1.

Foi adicionado a essa água 1.220g de extrato de malte *Dry-brew* e, em seguida, foi elevada a temperatura até 98 °C, para que a mistura fosse fervida por 20 min. Logo após, foi adicionada à mistura 8,5 ml de Isohop® 30% de alfa-ácido para obtenção de 5 IBU.

O mosto produzido foi resfriado através de um *Chiller* de placas (20 placas), também submetido às mesmas condições de sanitização do fermentador. Foram produzidos dois lotes de cerveja com as mesmas características, entretanto, um lote foi produzido inoculando a levedura selecionada nesse presente estudo e o outro lote, foi utilizada a levedura comercial S04, da marca Fermentis.

A inoculação da levedura foi realizada com um pitching rate (quantidade de inóculo) normalmente utilizados em cerveja do tipo Ale ($0,75 \times 10^9$ cél/ml/platô). Sua propagação foi realizada segundo método descrito acima. A fermentação foi acompanhada com medições de densidade no primeiro dia, logo após a inoculação da levedura, e no final da fermentação, sendo esta realizada sete dias após o início da produção.

Para as análises de expressão gênica qPCR, foram coletadas amostras do início, do meio e do final da fermentação, ou seja, um dia após a inoculação da levedura (24h), três dias após a inoculação (72h) e sete dias após o início da fermentação (168h). Ressalta-se que essas amostras coletas foram centrifugadas (Centrífuga Baby® I 206-BL) a 3000 RPM e submetidas a freezer - 80°C para posterior avaliação.

Assim, como os testes em micro-produções, também foram separadas amostras de cerveja pronta. Após a pasteurização em pasteurizador de túnel da Kronos (Sander Ransen - K574392), essas amostras foram destinadas ao

laboratório de qualidade de uma cervejaria multinacional no município de Araraquara, para a realização de análises físico-químicas, voláteis e sensorias.

3.4.2 Análise físico-químicas, voláteis (cromatografia gasosa) e sensorial (painel sensorial-treinado)

Para as análises físico-químicas, voláteis e sensoriais foram separadas três garrafas de 300 ml contendo as amostras já carbonatadas de cada produção acima descrita e destinadas ao laboratório do controle de qualidade de uma cervejaria multinacional de um município do interior paulista.

As análises de extrato original, extrato aparente, extrato real, % de atenuação e álcool foram realizadas no DMA™ 4500 M da Anton Paar, com o Alcolyser. Já as análises de cor foram realizadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Shimazu UV1900i e medida no comprimento de onda de 430nm. Quanto as análises de Ph, foi utilizado o phmetro da Orion modelo 330.

Para as análises de voláteis, a metodologia foi embasada em Piovezan (2018), que consiste em uma separação de compostos químicos em matrizes complexas onde a fase móvel é composta por um gás. Dessa forma, a amostra é injetada e em seguida, vaporizada, onde um gás inerte arrasta a amostra pela coluna cromatográfica e a fase estacionária é responsável para que cada componente tenha um tempo de retenção diferente. Para tanto, um detector é responsável pela identificação e conversão em picos cromatográficos representados por um software.

A técnica de Cromatografia Gasosa (CG) utilizada neste trabalho foi a do *headspace* (HS), segundo metodologia interna dessa multinacional de um município do interior paulista. As determinações de ésteres (acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila), de álcoois superiores (n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico), de acetaldeído e de diacetil foram realizadas por cromatografia gasosa, em cromatógrafo gasoso Agilent 8890, instalado para colunas capilares equipadas com injetor split/splitless e Detector de ionização de chama (FID), computador com software e impressora de cromatografia, coluna

capilar - 50 m * 0,53 mm (i.d.) sílica fundida, WCOT CP Sil 8 CB, $df = 1,0 \mu\text{m}$ (CP7696Agilent); coluna capilar - DBWaxETR, 60 m * 0,32 mm ID, sílica fundida FD de $1 \mu\text{m}$ (Agilent 123-7364); coluna capilar, 50 m, 0,5 mm (diâmetro interno), CP-Wax 52CB (Agilent CP7698).

É importante ressaltar que todos os equipamentos são calibrados diariamente e ficam sob controle rigoroso atendendo às normas da ISSO 9001 e 22000, e as metodologias usadas são metodologias internas que seguem as normas da EBC (*European Brewing Convention*).

Para as análises sensoriais, as amostras foram ordenadas e sorteadas por um Software Qualass Sensory Analysis (QSAV2.0.15). Essas amostras foram verificadas quanto a temperatura para não ter diferença significativa entre elas. Em uma sala a parte (Figura 14), os copos foram preparados por um analista da área de sensorial da unidade dessa multinacional. Ressalta-se que foram utilizados copos pintados na cor preta para que não houvesse influência da aparência em sua análise. Assim, essas amostras dispostas nesses copos foram submetidas à avaliação de um painel de degustadores treinados, que imputaram suas notas no sistema, junto com o perfil sensorial. Por fim, a amostra foi comparada com o perfil sensorial de uma amostra padrão, que geralmente é uma amostra comercial da própria empresa.

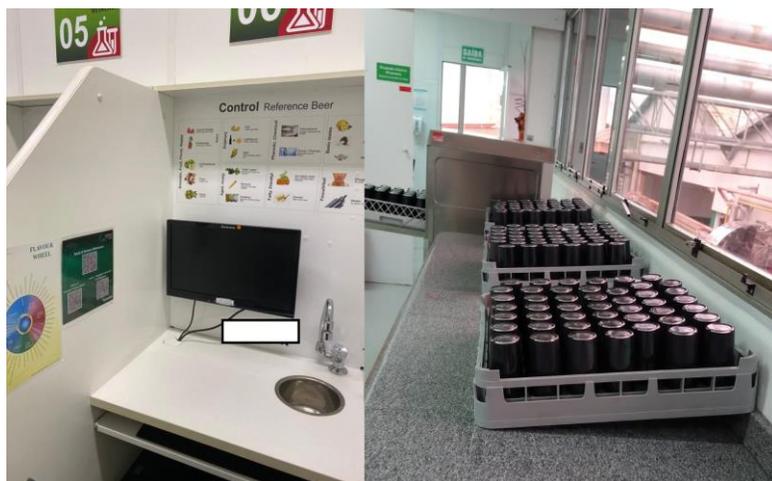


Figura 14. Lab de degustação - Sensorial (cervejaria multinacional um município do interior paulista). Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

3.4.3 Análise da expressão gênica qPCR da levedura de produção de cerveja

As amostras coletadas após o processo descrito no item acima foram analisadas conforme os genes mais importantes na fermentação relacionados ao transporte de açúcares, a repressão catabólica e a produção de aromas indesejáveis na cerveja, conforme mostra a Tabela 2 abaixo.

As amostras de leveduras coletadas em fermentação foram processadas para extração de RNA e a síntese de cDNA por PCR quantitativo (extraídas pela metodologia do Trizol-Thermo Scientific). A integridade eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2%, sendo posteriormente quantificadas e tratadas com *DNAse* (Invitrogen).

A síntese de cDNA foi realizada pelo kit comercial high capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante (10 minutos a 25 °C, seguida de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C).

Para a análise da expressão gênica as reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e com auxílio do Kit SYBR green master Mix (GoTAq Promega). Os dados de expressão foram avaliados pelo software do equipamento, após normalização de acordo com o gene endógeno utilizado Beta Actina (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os genes analisados, sua principal função na fermentação, a sequência dos iniciadores e as concentrações utilizadas estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2. Genes utilizados na análise da expressão gênica, funções e referência.

Gene	Sequência primers	Relação Concentração FW/RV (nM/nM)	Threshold	Eficiência %	Expressão	Referência
GPD1	FW: CATTGCCACCGAAGTCGCTC	150/150	0,1	98	Enzima importante na síntese do Glicerol GPD1 + diminui %alcool	SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004
	RV: GCCCTCGCTCTGAAATCCT					
GPD2	FW: TTCGAGTTGGGCTCCAAGGG	150/150	0,1	100	Enzima importante na Síntese do Glicerol GPD2 + diminui %alcool	SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004
	RV: ACCAATGCTCCTTGGCCACT					
ADH1	FW: CGGTGCTGTTCTAAAGGCCAC	100/100	0,111	96	Enzima importante na geração e consumo de etanol ADH1+ produção de etanol /ADH2+ consumo de etanol	DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003
	RV: GCATACCGACAAAACGGTGG					
PDC1	FW: CGCCGCTAAGGGTTACAAGC	150/150	0,22	104	Enzima principal na descarboxilação do piruvato eficiência da fermentação alcoólica	PRONK; YDE STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996; SCHMITT; ZIMMERMANN, 1982
	RV: TAGAAGCTGGGACAGCAGCG					
ALD6	FW: CCTTAGCCCGTGGGGATGTT	300/300	0,097	95	desvio de rota acetaldeído →acetato	ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN et al., 1997
	RV: GCCGTACCCGGTGTGATTG					
ALD4	FW: GCGGACGCCGAGTTGAAAAA	150/150	0,109	98	desvio de rota acetaldeído →acetato	ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN et al., 1997
	RV: TGAACCCGACAAACAGACCT					
ACS2	FW: TGGTTCTGCTACCGTCCAT	150/150	0,099	96	sínteses de AcetilCoA →crescimento em glicose sob condições anaeróbicas	BERG; STEENSMA, 1995; DE VIRGILIO et al., 1992
	RV: ACGGTCGTGGTGGTTCCAAA					
BDH1	FW: GGGGTCCAAAACCTGTCCCA	150/150	0,26	103	aumenta o uso de 2,3-butanodiol como fonte de carbono nos processo aeróbico	GONZÁLEZ et al., 2000
	RV: TGCTCCGTTGTGGATGGCA					
AGT1	FW: AGGTATGCCACCGACAAGG	150/150	0,078	99	transporte de Maltotriose, sacarose e maltose em <i>S. cerevisiae</i> nível aumentado no consumo de maltose nas leveduras	HAN et al., 1995
	RV: GCGCTGCTCCAGAACAAA					
MAL31	FW: TGGGACAGGCATTGTGTGGT	150/150	0,2	103	permeabilidade da maltose é capaz também de transportar sacarose ativação na presença de glicose atuaria melhorando a capacidade fermentativa	CHOW; SOLLITTI; MARMUR, 1989
	RV: GTTGACCGAACCCCAACAT					
PAD1	FW: TCCTCCGGTACCTGCGTTTT	150/150	0,072	99	(4-VG) que envolve a formação de sabores e aromas indesejáveis na cerveja Ideal é a baixa expressão destes genes	RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015
	RV: AGTGTACGCGTGGATGCCAA					
FDC1	FW: TTAGGTTGCCACCGGGTTT	150/150	0,07	100	(4-VG) que envolve a formação de sabores e aromas indesejáveis na cerveja Ideal é a baixa expressão destes genes	RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015
	RV: GAGCCCCAGATGATGGGCAA					
HTX1	FW: GCTGGCAGAATCGACGAAGC	150/150	0,7	100	Enzima envolvida no transporte de hexoses principalmente de glicose e frutose	LEWIS; BISSON, 1991
	RV: GCAGTACCAGCGGTCTCAT					
ADR1	FW: ACGAGAGCGTTCGCAAGACA	150/150	0,072	100	necessária para a transcrição do gene <i>ADH2</i> (<i>Alcohol DeHydrogenase</i>) produção de etanol glicerol e utilização de ácidos graxos	YOUNG et al., 2003
	RV: GTTGCAGAGGCCACAGGGAT					

Fonte: Baseado em Lorca Mandujano (2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Banco de Leveduras

A seleção de microrganismos em todo o processo de produção e nos insumos cervejeiros gerou um banco de 119 linhagens isoladas, retiradas do plaqueamento em YPD, as quais foram estocadas em Glicerol e freezer - 80°C. Elas foram mantidas nessas condições para estudos futuros e para a formação de bancos de leveduras.

A triagem realizada nos pontos de coleta gerou uma quantidade significativa de linhagens isoladas desde os insumos: Malte Pilsen (11), Lúpulo Perle (11), Lúpulo Tettnanger (0); no processo de produção da bebida: Bagaço Superfície (2), Bagaço fundo (7), Resfriamento (12), Fermentação 1 (20), Fermentação 2 (16), Fermentação 3 (14), Descarte de centrífuga (9), Antes do Filtro (11); até o produto, Garrafa pasteurizada (3), Barril de chope (12). Segundo Michel (2017), a triagem ou bioprospecção de leveduras em qualquer fonte de carboidratos com semelhança ao mosto e os processos cervejeiros são bons candidatos para encontrar uma levedura com potencial para indústria.

Na triagem dessa presente pesquisa, um dos insumos cervejeiros, o Lúpulo Tettnager, não apresentou crescimento de nenhum microrganismo, talvez essa ausência possa ser justificada pelas propriedades químicas dessa família de plantas que possuem alguma ação de inibição de microrganismos (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018; LEITE, 2009).

Já o descarte da centrífuga, este não foi utilizado para a fase de extração de DNA, pois as nove linhagens encontradas não apresentaram características morfológicas de leveduriformes e o crescimento das placas não apresentou potencial, pois o este foi diminuto.

A morfologia de leveduras revelam algumas características específicas como o formato globoso, subgloboso, elipsoidal, ovoidal, obovoidal, cilíndrica, botuliforme, baciliforme, alongada, apiculada, ogival, lunada ou triangular (YARROW, 2011). Além dessas características, os aspectos podem ser cremosos ou seco, rugoso ou liso, as bordas podem se apresentar regulares ou

espécies que não pertenciam a ordem Saccharomycetales: *Candida tropicalis* (7); *Diutina rugosa* (7), *Hanseniaspora pseudoguilliermondi* (1); *Kazachstania yasuniensis* (1); *Pichia Kudriavzeivii* (10); *Pichia myanmarensis* (1); *Wickerhamomyces anomalus* (67).

Dos 111 isolados caracterizados, a maior proporção foi a de *W. anomalus* (60% - ou chamada de *Pichia anômala*), tanto em número como em distribuição nos processos produtivos de cerveja. Indivíduos dessa espécie tem ampla distribuição e capacidade de crescimento em diversas condições, além disso, são capazes de realizar a fermentação em diferentes substratos (CONCEIÇÃO et al., 2021).

Apesar de não ter sido encontrado no grão de malte, esse microrganismo está, geralmente, presente nas maltarias e na microbiota de grãos com alta umidade para inibir o crescimento de fungos filamentosos e produção de micotoxinas durante o processo de malteação, como por exemplo, a fusarium-promove o Gushing (expulsão repentina da espuma ao se abrir a garrafa de cerveja, provocada por presença de certas proteínas oriundas da cevada cultivada em condições úmidas) (LAITILA, et al., 2011).

Esse gênero também está sendo explorado como uma co-inoculação que possui a capacidade de síntese de β -glucosidase, cuja atividade permite a liberação eficaz de compostos de aroma (BASSO et al., 2016). Todavia, não existem muitos trabalhos com fermentação utilizando essa levedura, pois geralmente, ela está associada a degradação da cerveja e à produção, porém uma cepa utilizada em *sour beers* no estudo de Osburn (2018), apresentou atenuação de 83% e produziu um caráter menos azedo e com aromas de pera, maçã e damasco.

O segundo indivíduo com maior número foi a *Pichia Kudriavzeivii* (10), que segundo a bibliografia, essa espécie apresenta um consumo limitado de maltose e maltotriose gerando cervejas com baixa concentração final de álcool, porém, apresentando elevada concentração de ésteres voláteis que podem ser importante em blends (VANRIJSWIJCK et al, 2017; MICHEL, 2016).

A *Candida Tropicalis* (7) está mais relacionada com doenças comuns em seres humanos e deve ser analisada com cuidado (WINGARD; MERZ; SARAL, 1979), entretanto, também produz fermentados de baixo teor alcoólico.

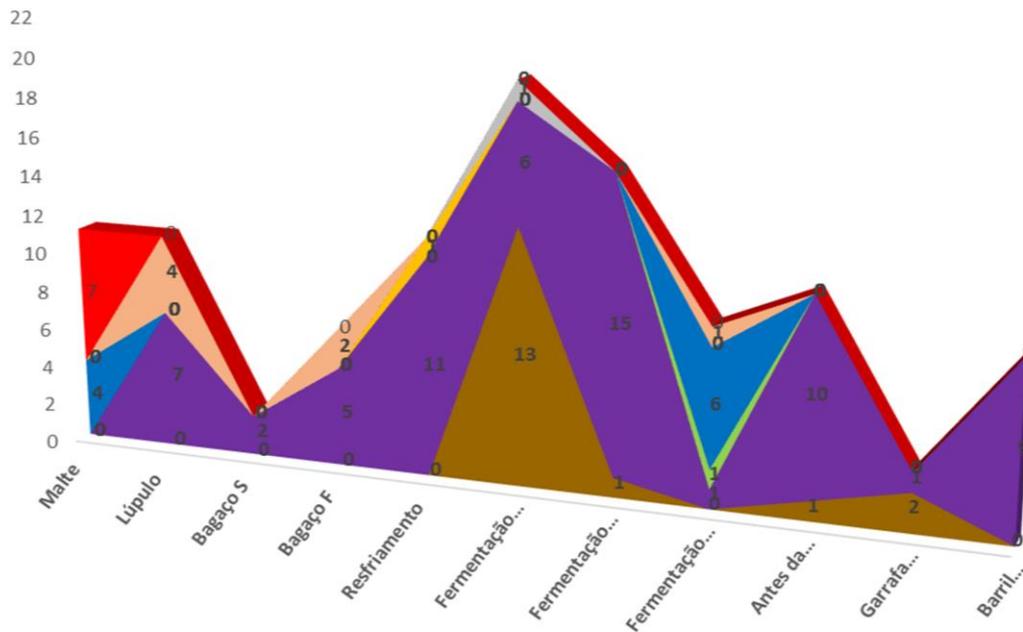
Já os indivíduos *Diutina rugosa* (4 ou *Candida rugosa*), não possui descrição como potencial para produção de cerveja, todavia, encontram-se associados a um substrato oleaginoso (lúpulo) devido a sua capacidade de hidrolisar óleos vegetais (lipases) (DELGADO, 2014).

Por fim, os organismos de menor frequência foram *Hanseniaspora pseudoguilliermondi* (1); *Kazachstania yasuniensis* (1) *Pichia myanmarensis* (1) A *Hanseniaspora pseudoguilliermondi* é uma levedura apiculada que geralmente, aparece nas fases iniciais da fermentação de frutos em geral (SOUSA, 2011) e os outros gêneros também estão sendo cada vez mais estudados na produção de cervejas. Ressalta-se que, alguns desses indivíduos acima são considerados pelos cervejeiros como leveduras deteriorantes que podem levar a “defeitos” importantes na cerveja, como por exemplo, a formação de compostos fenólicos, ésteres, acidez e turbidez, porém, essas leveduras caracterizadas como não *Saccharomyces* (gêneros tais como *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Dekkera*, *Kluyveyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*), podem também se tornar aliadas ao processo produtivo (SILVA, 2019).

Isso sugere a importância no desenvolvimento de mais estudo envolvendo essas linhagens, no entanto os resultados aqui apresentados evidenciaram uma população mista de leveduras durante todo o processo de produção. É importante ressaltar, que a presença de diferentes linhagens no processo fermentativo pode indicar uma relação importante com a qualidade do produto final produzido nesta cervejaria. A conjugação de populações mistas (*Saccharomyces* e não *Saccharomyces*) podem levar a produção de inóculos iniciais que levam a produção de cervejas com características sensoriais interessantes ao mercado cervejeiro.

A distribuição destas espécies ao longo do processo produtivo está demonstrada na Figura 16.

Distribuição das espécies por ponto de coleta



Espécies	% de linhagens participantes
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	15%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	60%
<i>Pichia myanmarensis</i>	1%
<i>Pichia kudriazevii</i>	9%
<i>Kazachstania yasuniensis</i>	1%
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	1%
<i>Diutina rugosa</i>	6%
<i>Candida Tropicalis</i>	6%

Figura 16. Distribuição das espécies por pontos de coleta. Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Esse banco de leveduras não *Saccharomyces* (94) foi submetido a uma verificação de proximidade genética dos indivíduos, através do sequenciamento da região ITS e foi representada através de uma árvore filogenética (Figura 17)(KATOH; STANDLEY, 2013; POSADA, 2008; GUINDON et al., 2010; SANTOS et al., 2017).

A Figura 17 (abaixo) demonstra que houve uma separação bem suportada pelos ramos divididas em dois grandes grupos: antes da fermentação (cor vermelha) e depois ou durante a fermentação (cor preta). Essas seis famílias da ordem Saccharomycetales apresentaram um grupo amplo, que poderiam ser mais explorados em futuras pesquisas. Essas leveduras fazem parte, de alguma maneira, do processo cervejeiro, ou como microrganismos associados ou como coparticipantes do processo produtivo. Dessa forma, elas podem sugerir uma sucessão de comunidades dentro de sistemas fechados de produção ou em sistemas abertos, como na produção de lambics. Independentemente, elas apresentam uma complexa sucessão de microrganismos com características singulares de aroma e sabores a cerveja (SPITAEELS et al., 2014).

Algumas alterações durante o processo produtivo, como a formação de álcool, a diminuição do pH, a produção de CO₂, a diminuição de carboidratos no processo de fermentação e a competição entre microrganismos, exercem uma pressão para o desaparecimento de alguns microrganismos do processo (SILVA, 2019). Por exemplo, a manutenção do pH muito baixa durante a fermentação propicia o crescimento de linhagens selvagens, que pode eliminar completamente a levedura iniciadora do processo (DRAGONE et al., 2010).

Essa separação poderia ser desenvolvida e aprofundada em próximos experimentos, todavia, apesar de haver linhagens distintas de *W. anomalus* em diferentes ramos, essas cepas poderiam ser iniciadoras do processo que permitem a colonização de outras cepas que preparam ou que fornecem as condições para aquele povoamento.

Essa interação entre leveduras e outros microrganismos presentes naquele momento ou naquela cervejaria, podem gerar características sensoriais únicas para o produto, devido a interação de metabólitos secundários dos diversos microrganismos presentes, podendo ser considerado um *terroir*⁵ daquela cervejaria (Gibson et al., 2017).

⁵ Característica sensorial vinculada a individualidade de cada cervejaria/ pertencente apenas àquele local, não sendo possível mensurar.

Figura 17. Árvore filogenética das espécies não *Saccharomyces*, inferidas por máxima verossimilhança. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Dos 111 indivíduos triados e identificados, dezessete indivíduos foram caracterizados como *Saccharomyces*. Esse é considerado o gênero mais importante dentro da indústria cervejeira e de alimentos e é o principal agente de fermentação (BOULTON; QUAIN, 2008). A descoberta de novas leveduras no processo produtivo pode ser muito importante, pois muitas leveduras comerciais hoje utilizadas derivaram de leveduras selvagens domesticadas em processos produtivos, além de apresentarem maior tolerância ao estresse (GALONE et al. 2016).

Dessas dezessete linhagens, treze foram encontrados na Fermentação 1 (um dia após a inoculação); um indivíduo na Fermentação 2 (três a quatro dias após o inóculo); um antes do filtro e dois na Garrafa Pasteurizada. Todas essas linhagens foram submetidas a testes de genotipagem, de modo a distinguir umas das outras pelo padrão dos amplicons obtidos por PCR (CARVALHO-NETTO, 2017). Desse total, cinco linhagens distintas da levedura inoculada inicialmente foram encontradas. As cepas de *Saccharomyces* encontradas apresentaram grande diferença dos amplicons da levedura industrial W34/70 (Fermentis - levedura de baixa fermentação) e de outras leveduras industriais utilizadas comercialmente pela cervejaria (S04, US-05, WB-06 e S-33) (Figura 18 e 19).

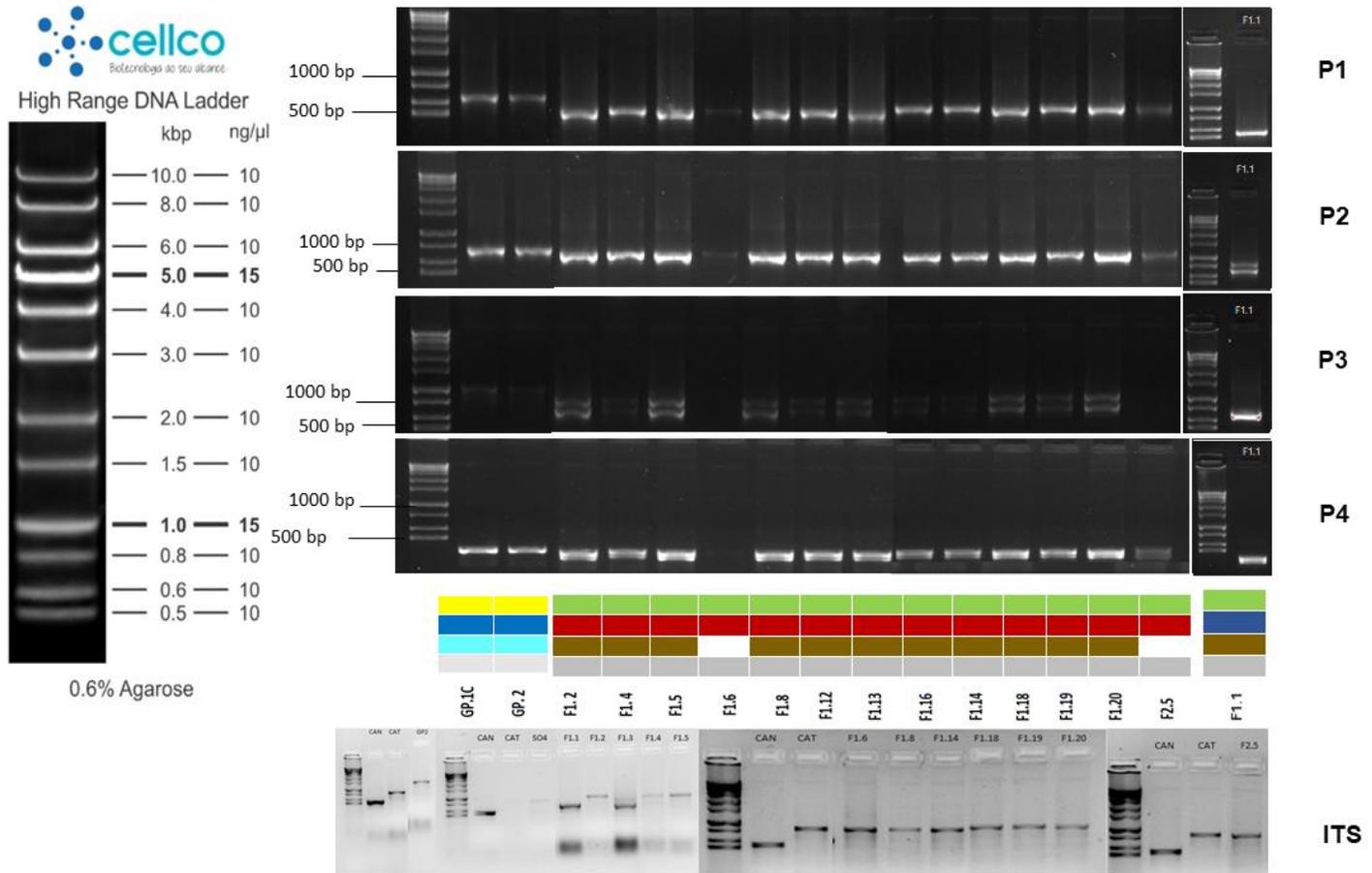


Figura 18. Genotipagem das linhagens isoladas do processo fermentativo (GP-garrafa pasteurizada; F1-Início de fermentação; F2- meio de Fermentação; AF-Antes da filtração). As cores diferenciam os padrões de amplificação os espaços em branco são regiões não amplificadas. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

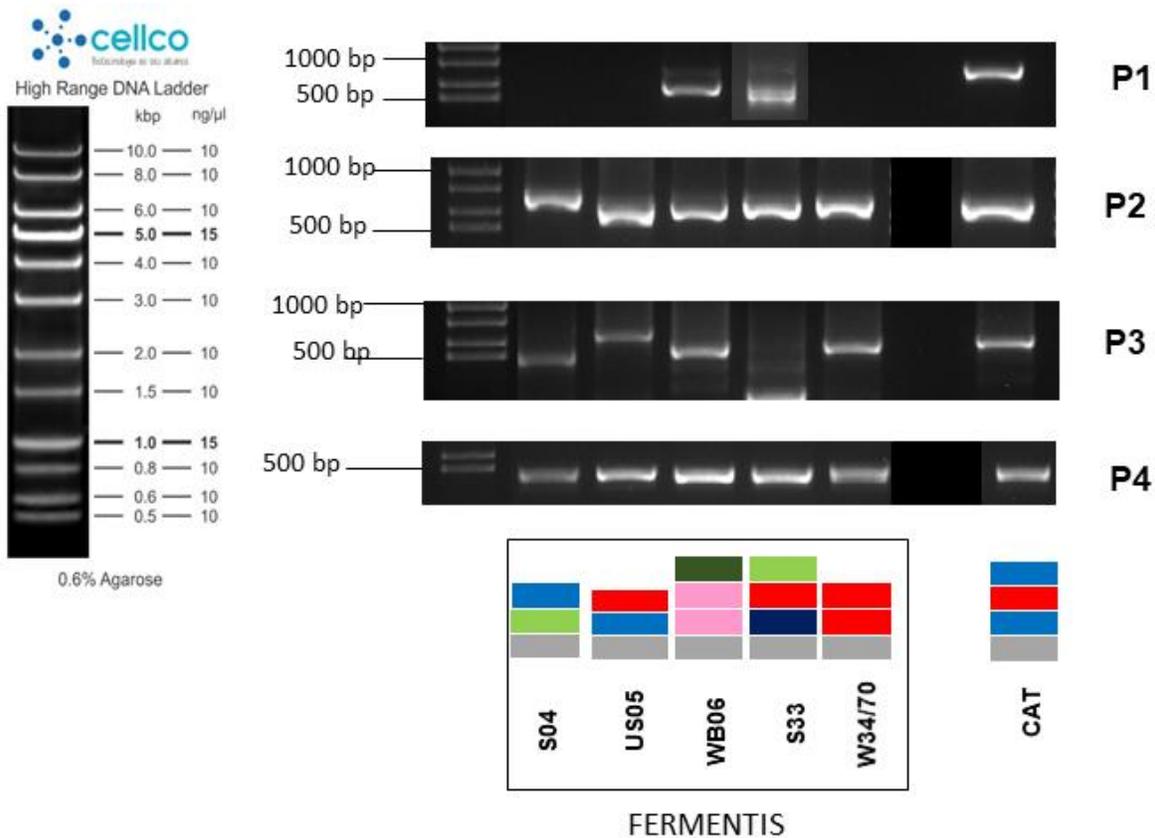


Figura 19. Leveduras *Saccharomyces* comerciais utilizadas pela cervejaria e a linhagem isolada em dornas de produção de álcool. As cores diferenciam os padrões de amplificação os espaços em branco são regiões não amplificadas. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.3 Caracterização e desempenho das *Saccharomyces* selecionadas

As cinco leveduras selecionadas foram submetidas a testes de crescimento em meio Worth sob temperaturas de 30 e 37°C para verificar a condição de fermentação do tipo Ale ou do tipo Lager. As cepas classificadas tradicionalmente como Ale são pertencentes a espécie *S. cerevisiae*, fermentam bem o mosto cervejeiro com temperaturas ótimas de 16 a 25°C. Já as Lagers, são pertencentes a espécie *S. pastorianus* e fermentam bem a temperaturas de 6 a 15 °C (VAN MULDERIS et al., 2010; VIDGREN et al., 2010). Outro método para avaliação de Ale e Lagers é a capacidade de fermentar melobiose, que a

maioria das *S. cerevisiae* comerciais não conseguem, porém, já foram encontrados mais de onze genes MEL em seu DNA (NAUMOVA et al.,2010), o que comprova que Ales também podem realizar tal utilização.

Conforme apresenta o quadro 3, todas elas apresentaram características de Ale (crescimento a 37°C), uma vez que apresentaram crescimento em ambas as temperaturas utilizadas no meio acima citado.

Quadro 3. Crescimento e caracterização das leveduras como Lagers ou Ales.

<i>Sacharomyces</i>	Crescimento		
	30°C	37°C	Tipo
F1.1	Sim	Sim	ALE
F1.2	Sim	Sim	ALE
F1.6	Sim	Sim	ALE
F2.5	Sim	Sim	ALE
GP2	Sim	Sim	ALE

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como as cervejarias artesanais possuem uma ampla gama de produtos e inúmeros estilos de cervejas, as leveduras *Saccharomyces* selecionadas foram submetidas a condições variadas de crescimento em 24 e em 48 horas, para avaliação do potencial para utilização nessas indústrias.

Foram avaliados o crescimento em meios sólidos a 10°C, 18°C e 30°C (controle) e sobre extratos de malte com concentração de 2% e 20°P e 25°P (altas concentrações utilizadas em cervejas mais extremas, aquelas acima de 10% de graduação alcoólica).

Na concentração de 2% de YPEM crescidas a 30°C por 24h, as linhagens F1.1 e F1.6 apresentaram melhor performance, porém, a 18°C o melhor crescimento ocorreu em F2.5. Já em 20 e 25°P sob as três condições de temperatura crescidas em 24h, a linhagem F1.2 foi a que mais se destacou (Figura 20).

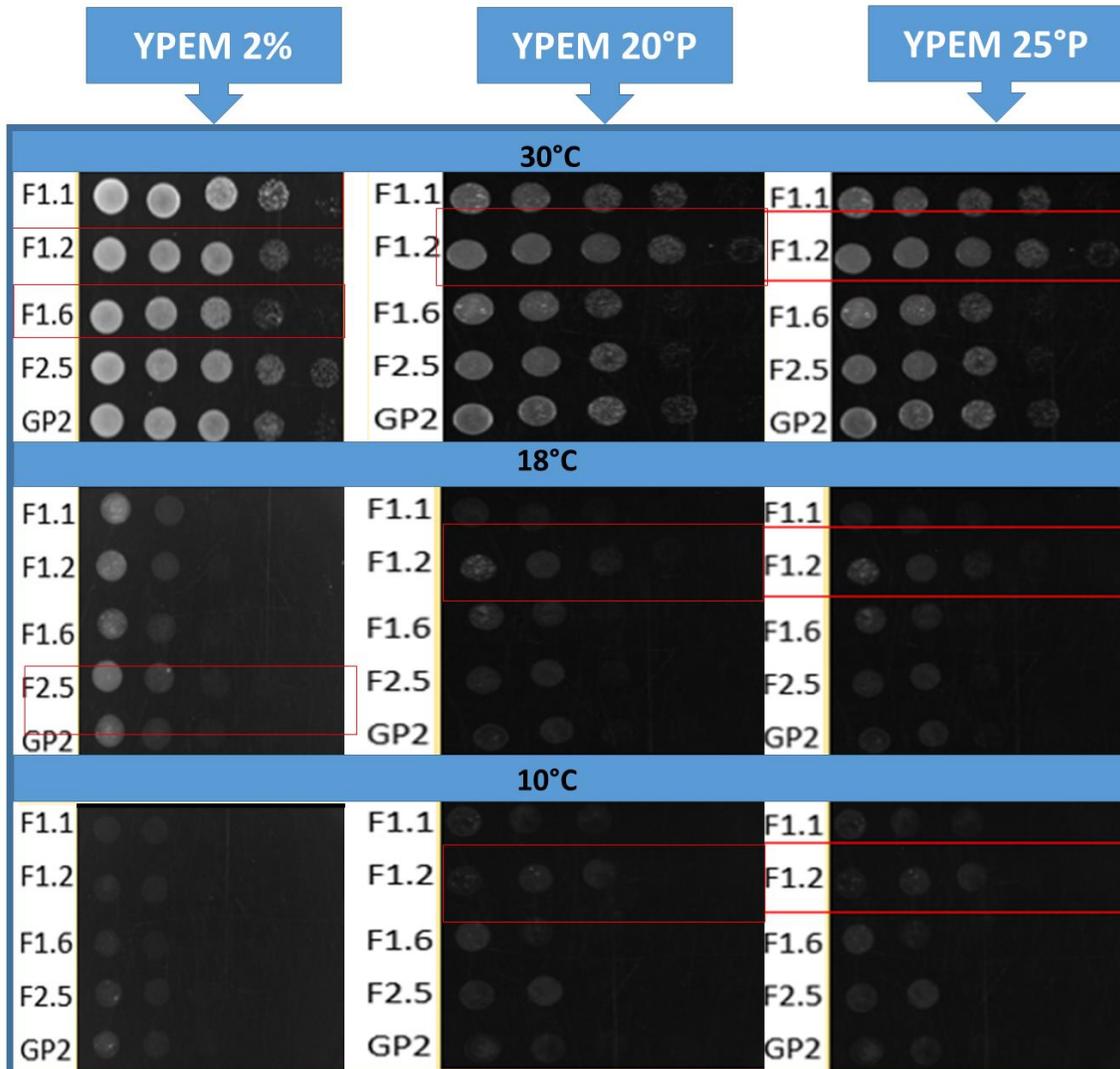


Figura 20 Crescimento das linhagens em situação 3 condições de concentração de açúcares e 3 (2%, 20 °P e 25°P) temperaturas (10, 18 e 30°C). Na condição de menor extrato houve crescimento f1.1 e f1.6 com maior performance a 30 °C e F2.5 em 18°C, já nos outros extratos o destaque foi f1.2. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Outro experimento foi proposto, pois o crescimento em meio sólido impossibilita o deslocamento da levedura e a formação de álcool pode ser suprimida por evaporação ou falta de substrato ao redor da levedura para sua transformação

O experimento foi conduzido então, em meio líquido para verificar a possível supressão do crescimento devido ao estresse osmótico ou a supressão

pela formação de álcool, sendo que o crescimento conduzido dentro de tubos cônicos contendo a condição de 25°P foi a maior testada. Além disso, foi utilizada a temperatura de controle (30°C), pois nessa condição seria possível avaliar a inibição pela fermentação.

Após o crescimento em 24h, essas cepas foram inoculadas em placas sólidas com a mesma condição e avaliadas quanto ao crescimento. Os resultados demonstraram que a cepa F1.1 foi a que apresentou melhores resultados, porém, as outras duas cepas também se desenvolveram bem, como mostra a Figura 21.

A exposição as altas concentrações alcoólicas afetam principalmente a integridade da membrana celular e, com isso, pode haver uma diminuição do crescimento, redução do tamanho celular, redução da fermentação e, conseqüentemente, a absorção de glicose e taxas de respiração (GIBSON et al., 2007).

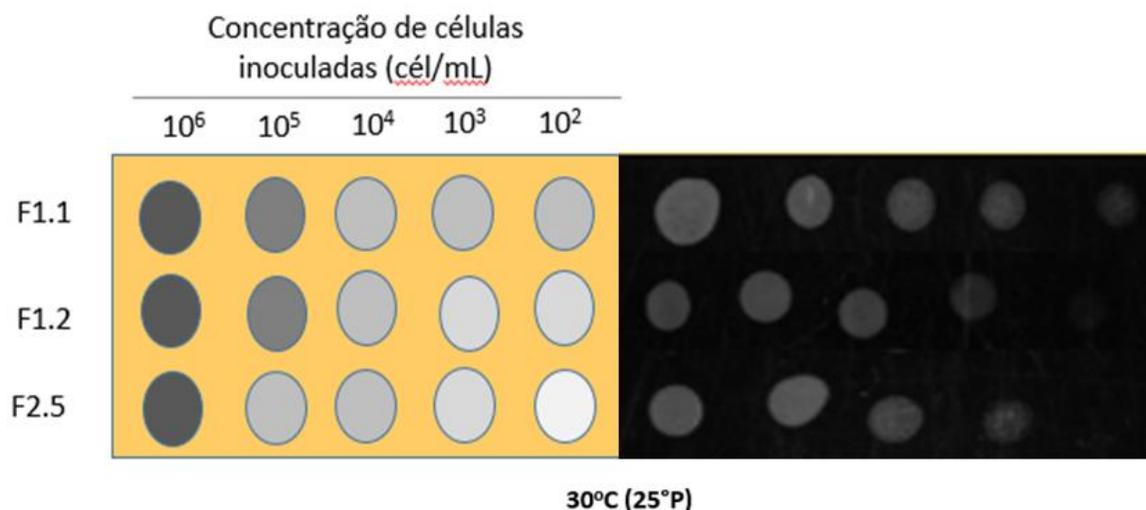


Figura 21. Crescimento das linhagens em situação estresse 30°C e 25°P. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

É interessante verificar que essas leveduras selecionadas foram encontradas em um mosto cervejeiro com inoculação de uma levedura comercial do tipo Lager (w34/70) e, nos testes acima, apesar de haver melhor

desempenho de algumas cepas, todas apresentaram crescimento semelhantes nos testes descritos. Essa relação pode estar associada ao ambiente produtivo que estas leveduras se encontram, pois, os meios com uma grande diversidade de leveduras podem proporcionar o compartilhamento de material genético e uma maior diversidade e, até mesmo, a formação de híbridos naturais (DEQUIM; CASAREGOLA, 2011). Isso poderia corroborar com o que foi apresentado pela árvore filogenética das espécies não *Saccharomyces*, que apresentou as mesmas espécies separadas em dois lados diferentes, talvez devido a essa hibridização e troca de material genético. Todavia, seria importante que mais estudos fossem desenvolvidos envolvendo esse tema para sua confirmação efetiva.

A avaliação do crescimento sobre diferentes condições é importante, pois a velocidade de formação de biomassa também é relativa ao tempo de processo, podendo assim maximizar os processos de fermentação (SAMPAIO et al., 2017). Além disso, qualquer estresse que possa causar alguma alteração no metabolismo ou crescimento afeta diretamente a taxa de inóculo e a viabilidade celular, que está diretamente ligada às mudanças significativas no perfil sensorial da cerveja (VERBELEN, 2009). Em suma, todos os testes de crescimento em diferentes condições auxiliam no conhecimento das cepas e quais as condições que poderiam ser utilizadas futuramente pela indústria.

O desempenho quanto ao crescimento de GP2 deixou algumas curiosidades, pois, pelo fato de ser referente a uma cepa isolada após pasteurização, ou seja, tratamento térmico para diminuir qualquer contaminação, seria esperado um crescimento mais significativo quando comparado aos outros testados.

4.4 Seleção de *Saccharomyces* por fermentação em bancada

A seleção de uma levedura para produção cervejeira é dependente do objetivo, ou seja, do estilo que se pretende produzir. Algumas características como atenuação, perfil sensorial, floculação, fornecimento (capacidade de

produzir) e range de temperatura (WHITE; ZAINASHEFF, 2010) são essenciais para essa produção constante de um produto vendável.

A produção em bancada com os cinco isolados demonstrou uma variação interessante de perfis. O mosto cervejeiro fabricado foi único para todas as inoculações e a quantidade desse mosto foi dividida igualmente entre os frascos fermentadores (400 ml de mosto).

A quantidade de inóculo utilizada obedeceu a mesma taxa (pitching rate) entre todos os inóculos, porém, como o volume utilizado pode variar de uma levedura para outra, e as fermentações ocorreram em um volume pequeno de mosto (400 ml), o extrato original (extrato inicial) pôde variar um pouco em cada produção (F1.1) 11,84 °P a (GP2) 10,93°P.

A legislação Brasileira (BRASIL, 2009) define que a quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto que dão origem às cervejas podem ser classificadas em leve (5 a 10,5%), comum (10,5 a 12,5%), extra (12,5 a 14%) e forte ($\geq 14,5\%$), ou seja, todas as produções realizadas em bancadas são classificadas como cervejas comuns (Figura 22)

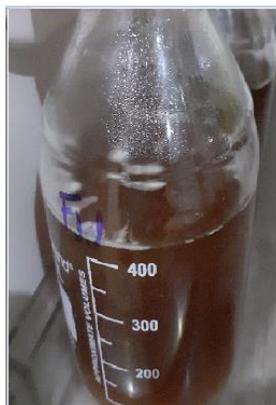


Figura 22. Fermentação do mosto cervejeiro com inoculação da cepa F1.1. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

O extrato aparente já é o extrato fermentado, ou seja, com a presença de álcool formado na fermentação. O extrato real é aquele referente ao corpo da cerveja. Esses são todos os sólidos dissolvidos na cerveja, inclusive os açúcares

e as proteínas que não foram utilizadas na fermentação. Outra correlação importante é a porcentagem de atenuação, ou seja, o quanto de extrato a levedura foi capaz de converter, que é a relação de extrato primitivo menos o extrato aparente dividido pelo extrato primitivo (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Os menores extratos reais e aparentes foram respectivamente as cepas S04 (2,67/4,26%w/w) controle, F1.1 (3,03/4,43%w/w) e GP2 (3,51/5,04%w/w). Consequentemente, essas cepas foram também as que apresentaram melhores performances em atenuação, sendo respectivamente 75,57%, 74,4% e 69,32%. As outras cepas não apresentaram atenuação acima de 65% (F1.2-41,9%; F1.6-62,5%; F2.5-60,6%), o que pode apresentar um risco a produção, pois, estas são cervejas com maior risco de contaminação (SILVA, 2019). Esse risco ocorre devido a um baixo teor alcoólico e a sobra ou fermentação incompleta de açúcares, além disso, é um fator importante na ineficiência do uso do substrato. Essa ineficiência pode estar relacionada aos genes responsáveis da regulação de sacarídeos mais complexos como maltose e maltotriose dextrinas (PIDDOCKE, 2009; STAMBUK et al., 2006).

Conforme descrito anteriormente, a produção de álcool é importante tanto na proteção da cerveja, quanto na eficiência de sua fermentação, todavia, a formação de compostos secundários como o glicerol são diferentes entre cepas de leveduras, podendo alterar a quantidade final de álcool (NEVOIGT, 2008). Em ordem decrescente os resultados foram F1.1(4,69%v/v), S04(4,37%v/v), GP2(4,22%v/v), F1.6(3,77%v/v), F2.5(3,68%v/v), F1.2-(2,54%v/v).

Apesar do controle apresentar a melhor atenuação, a formação de álcool na cepa F1.1 foi maior, indicando que esta cepa é melhor adaptada a esta condição. As leveduras F1.1 e GP.2 apresentaram um bom desempenho na produção de álcool e na atenuação do mosto, podendo ser consideradas leveduras de alta atenuação, utilizadas em cervejas de baixo corpo e baixo residual de açúcar (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Já as demais cepas, podem ser utilizadas em outras situações para cervejas de baixa graduação alcoólica ou em fermentações mistas.

Os resultados de pH descritos na tabela 3 são valores encontrados na maioria dos estilos encontrados e já catalogados, com exceção das *sours beers*

(BJCP, 2015) e, também, com relação as características de proteção do mosto (SILVA, 2019).

A descrição da cor está muito relacionada à produção do mosto e às características dos insumos, porém, a floculação da levedura e o grau de modificação que as cepas realizaram no mosto poderiam contribuir para aumentar ou diminuir essa característica respectivamente.

As análises dos voláteis revelaram que os aromas frutados provenientes de acetato de etila e isoamila, ésteres de grande importância no perfil de cervejas, apresentaram maiores valores na cepa GP2, 580,11 mg/L e 0,57 mg/L. Entretanto, elas também apresentaram uma quantidade significativamente maior de *off-flavours* comparada com o controle S04. Diacetil (83 ug/L) e DMS (33ug/L). Outra levedura que se destacou nas análises de voláteis, foi a cepa F1.1, que apresentou todos os indicadores de *off-flavours* com baixa concentração e os ésteres com alta concentração quando comparadas com o controle.

Para corroborar aos resultados apresentados pelas análises físico-químicas, foi submetida a análise sensorial por painel treinado em uma cervejaria multinacional de um município do interior paulista.

Os perfis sensoriais que mais agradaram os degustadores por nota geral foram respectivamente o F1.2(66), GP2(64), F1.1 (63), F2.5 (63) e F1.6 (62). Além disso, alguns atributos que mais se destacaram foi o perfil esterificado de GP2(45) e o caramelizado (48), já o que, o que mais se aproximou ao padrão, foi a cepa F1.1, figura 23.

O perfil sensorial aumentado para a cepa GP2 pode estar relacionado com a possível utilização em maiores temperaturas, pelo fato de se tratar de um isolado que passou por um stress produtivo.



Figura 23. Perfil sensorial comparando as cepas inoculadas com o controle S04.
 Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 3. Resultados Físico-químicos e voláteis das cepas selecionadas e do controle S04 (Fermentis).

QUALIDADE ASSEGURADA								
Análises Físico-químicas								
Data da Análise: 17/05/2022								
DADOS DA AMOSTRA E RESULTADOS								
Tipo de Guarda:			F.1.1	F.1.2	F.1.6	F.2.5	GP2	S04
Análises	Metodologia	Unidade de medida	Resultados Concentrado					
Extrato Primitivo	PR-COR-LSS-012	°P	11,84	11,31	11,33	11,41	11,44	10,93
Extrato Aparente		%W/W	3,03	6,57	4,25	4,50	3,51	2,67
Extrato Real		%W/W	4,43	7,49	5,62	5,84	5,04	4,26
Atenuação Aparente		%	74,4	41,9	62,5	60,6	69,32	75,57
Álcool		%v/v	4,69	2,54	3,77	3,68	4,22	4,37
pH	PR-COR-LSS-019	—	4,46	4,54	4,55	4,49	4,34	4,31
Cor	PR-COR-LSS-007	EBC	31,62	37,99	28,87	33,98	31,94	26,80
Acetaldeído	PR-COR-TCP-058	mg/l	20,79	28,00	11,67	20,34	15,90	7,95
DMS		µg/l	8,00	38,00	30,00	8,00	33,00	19,00
Acetona (mg/L)		mg/l	0,05	0,02	0,02	0,033	0,023	0,031
Formiato de Etila (mg/L)		mg/l	0,004	0,001	0,002	0,000	0,001	0,003
Acetato de Etila		mg/l	224,00	215,22	239,43	204,65	580,11	175,46
Propionato de Etila (mg/L)		mg/l	0,15	0,09	0,10	0,06	0,29	0,05
N-Propanol (mg/L)		mg/l	12,50	27,82	13,02	8,69	40,75	9,50
Isobutanol (mg/L)		mg/l	8,93	30,24b	23,55	18,24	48,65	28,23
Acetato de Isoamila		mg/l	0,34	0,33	0,49	0,56	0,57	0,18
Álcool Amílico + Álcool Isoamílico (mg/l	48,58	73,07	63,16	99,00	111,06	110,00
Hexanoato de etila		mg/l	0,03	0,18	0,14	0,050	0,070	0,020
Álcoois Superiores Totais		mg/l	70,0	131,1	99,7	125,9	200,5	147,7
Diacetil livre (µg/L)		(µg/L)	9,4	108	23,7	55	83	41,1
Pentanodiona livre (µg/L)		(µg/L)	1,80	23,1	16,11	28	14	5,11

4.5 Produção de um lote maior de cerveja com a inoculação de levedura selecionada no teste de bancada

Foi selecionada uma cepa para a realização de uma produção em maior volume para verificar seu comportamento e avaliar as condições de produção e as vias metabólicas associadas a este produto.

A cepa GP2 apresentou destaque assim como também a F1.1 no que se referem às condições de produção e às avaliações sensoriais, porém, a grande formação de ésteres e a diferenciação quanto ao padrão foram os motivos principais da seleção da GP2 para esta análise.

Inicialmente, foi verificado novamente por meio de PCR e pela genotipagem se os amplicons eram correspondentes à linhagem isolada no início deste experimento. Conforme a figura abaixo (Figura 24), os isolados GP2 e GP2.2 (propagação feita da primeira linhagem) apresentaram o mesmo padrão de amplicons do teste inicial.

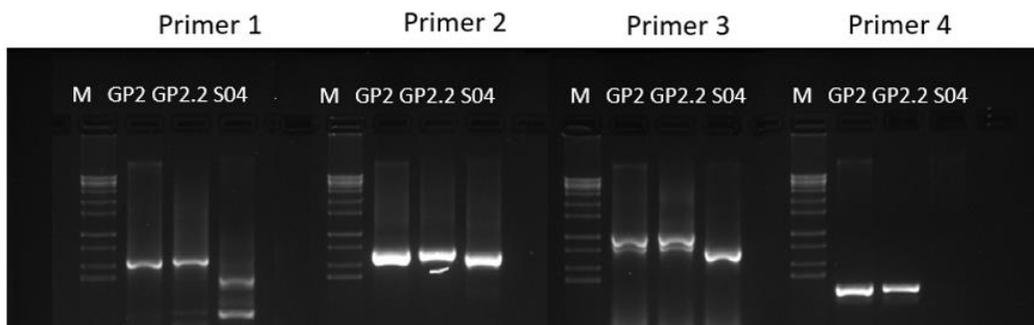


Figura 24. Genotipagem das linhagens GP2 isoladas do processo fermentativo utilizada para uma produção de 10L de cerveja. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A produção do mosto foi conduzida respeitando os mesmos parâmetros realizados nos testes de bancada e foi inoculado, após o resfriamento, com concentração de $0,75 \times 10^9$ cél/ml/°P (pitching rate de cervejas do tipo Ale). A principal diferença comparada com o teste de bancada foi o volume fermentado (10L) e o local de fermentação, sendo utilizado um fermentador cônico com

controle de pressão, com a finalidade de representar o ambiente mais próximo a uma produção industrial (Figura 25).



Figura 25. Fermentação com a cepa GP2 em tanque cônico de 35L (polietileno). Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

A produção apresentou características semelhantes aos testes de bancada e bom desempenho quando comparadas com o controle, tanto nas análises de extrato, álcool e pH, quanto nas análises de voláteis (Figura 26 e tabela 4).

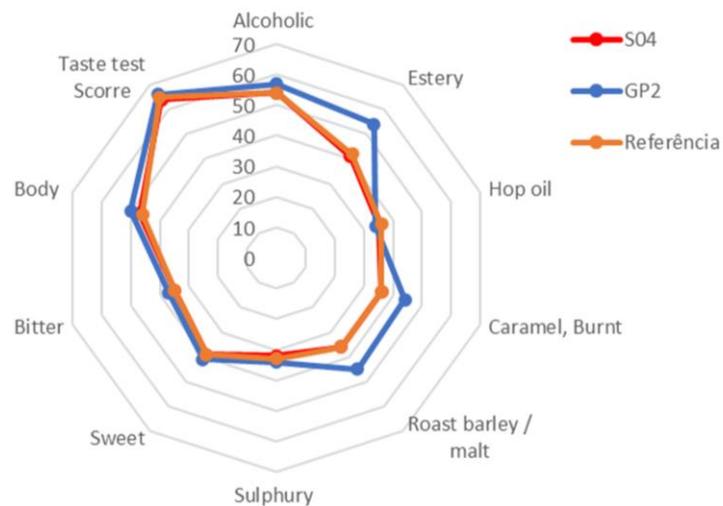


Figura 26. Perfil sensorial comparando as cepas inoculadas com o controle comercial. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 4. Resultados Físico-químicos e voláteis da cepa selecionada GP2 e do controle S04 (Fermentis).

QUALIDADE ASSEGURADA				
Análises Físico-químicas				
SOLICITANTE				
Data da Análise: 02/06/2022				
DADOS DA AMOSTRA E RESULTADOS				
		Tipo de Guarda	GP2	S04
Análises	Metodologia	Unidade de medida	Resultados Concentrado	Resultados Concentrado
Extrato Primitivo	PR-COR-LSS-012	°P	11,48	11,44
Extrato Aparente		%W/W	3,33	2,77
Extrato Real		%W/W	4,34	4,04
Atenuação Aparente		%	70,99	75,79
Álcool		%v/v	4,30	4,50
pH	PR-COR-LSS-019	–	4,43	4,51
Cor	PR-COR-LSS-007	EBC	29,45	27,01
Acetaldeído	PR-COR-TCP-058	mg/l	17,59	9,02
DMS		µg/l	32,41	18,41
Acetona		mg/l	0,02	0,03
Formiato de Etila		mg/l	0,07	0,10
Acetato de Etila		mg/l	588,00	182,57
Propionato de Etila		mg/l	0,39	0,09
N-Propanol		mg/l	45,22	13,97
Isobutanol		mg/l	53,12	31,35
Acetato de Isoamila		mg/l	0,60	0,19
Álcool Amílico + Álcool Isoamílico		mg/l	85,11	82,83
Hexanoato de etila		mg/l	0,01	0,03
Álcoois Superiores Totais		mg/l	183,5	128,2
Diacetil livre		µg/L	70,8	29,61
Pentanodiona livre		µg/L	14,9	6,02

An_02
 PO-CQC-LC-005
 Revisão 0
 Data: 01/11/10

Fonte: arquivo pessoal do pesquisador

Em relação a atenuação aparente, a cepa GP2 (70,99%) apresentou um desempenho mais significativo em relação ao primeiro teste (bancada-69,32%). Esse aumento pode ter relação com o formato do fermentador (cônico), que propicia movimentos de convecção do mosto em seu interior permitindo maior contato da levedura com o meio e, com isso, maior acesso aos substratos necessários para a fermentação (KUNZE, 2004). O mesmo também ocorreu com S04 (75,79% e 75,57%). Provavelmente, devido a essa maior transformação e acionamento de vias metabólicas favoráveis, mais álcool foi gerado conforme descrito (GP2 4,30 %v/v e S04 4,50 %v/v).

Como o mosto foi produzido de forma idêntica para ambas as cepas, a diferenciação de pH (GP2- 4,43 e S04- 4,51) pode ser uma característica intrínseca da cepa. Conforme descreve Basso et al. (2016), as leveduras selvagens se apresentam como boas formadoras de cervejas azedas, ou seja, as cervejas produzidas por essas cepas apresentam pH mais baixos.

A cor da cerveja é uma característica que depende de alguns fatores, como por exemplo, as matérias primas utilizadas, o modelo produtivo, a oxidação e a influência da cepa utilizada. A produção de cerveja em tanques cônicos facilita a extração dos sólidos decantados e as cepas mais floculentas caem mais rápido para o fundo do tanque, facilitando sua extração, deixando a cerveja mais límpida e, por consequência, favorecendo uma redução da cor (KUNZE, 2004; HE et al., 2012) (GP2- 31,94 EBC/29,45 EBC e S04- 26,80EBC/27,01EBC). Todavia, para avaliar a capacidade de floculação da cepa GP2 seria necessário a realização de testes futuros.

Outra característica que pode ser significativamente influenciada pelo modelo do tanque e pelas cepas inoculadas, é o perfil sensorial da cerveja (VENTURINI FILHO, 2010). Esse perfil pode ser descrito pelos voláteis produzidos juntamente com as características físico-químicas citadas anteriormente.

O acetaldeído é um composto carbonílico, geralmente identificado como aroma de maçã verde, porém, acima de 25mg/l pode ser considerado um *off-flavour* (aroma e sabor desagradável) com um aroma gramíneo (OLANIRAN et al., 2017). Na produção atual, a levedura GP2 (17,59mg/l) apresentou uma maior

quantidade do que a S04 (9,02mg/L), todavia, dentro da especificação de cervejas do tipo Ale.

Assim como o acetaldeído, o DMS (aroma de legume cozido) (GP2-32,41ug/l; S04 18,41ug/l) e o Diacetil (aroma de manteiga) (GP2 70,8 µg/l; S04 29,61 µg/L) são considerados *off-flavours* em grande quantidade. Apesar de ambos os compostos se apresentarem em maior quantidade na cepa GP2, eles ainda estão próximos das concentrações típicas em cervejas, que podem variar de 0,008-0,6mg/L para diacetil e 0,01 a 0,15mg/L para DMS (BREWERS ASSOCIATION, 2021).

O acetato de etila na cepa GP2 (588,00mg/l) foi produzido 3,2 vezes mais que a cepa comercial S04 (182,57 mg/L), sendo que o mesmo ocorreu com o acetato de isoamila (GP2-0,6mg/L; S04-0,19mg/L). Assim, ambos são produzidos predominantemente, na presença de álcool e acetil CoA, porém, o acetato de isoamila é produzido em menor escala e, apesar de ter maior contribuição no aroma da bebida, ambos também contribuem com aromas frutados para a cerveja (WALKER; STEWART, 2016). Assim como os ésteres acima, o álcool superior também apresentou maior concentração em GP2 (183,5 mg/L) do que no controle (128,2mg/L), que em certas concentrações estes podem contribuir nos aromas e sabores das cervejas (WALKER; STEWART, 2016).

Durante essa produção, foi avaliada a expressão gênica da fermentação em três etapas: início (T1-24h após a inoculação), meio (Tm-72h após a inoculação) e final (Tf-168h após a inoculação), por meio de PCR em tempo real nas duas linhagens GP2 e S04. Após a normalização dos dados, foi gerado um *heat map* (figura 4.13) para mostrar a expressão relativa a cada gene.

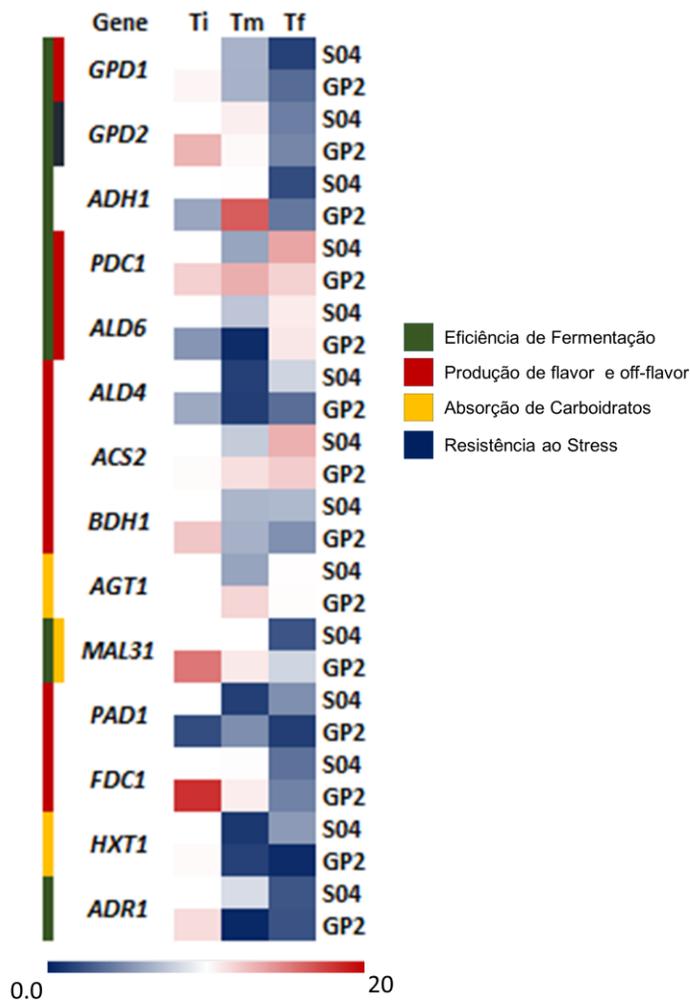


Figura 28. Heat map da expressão relativa de genes relacionados a eficiência fermentativa na produção de cerveja utilizando as cepas S04 (cepa comercial - fermentis) e GP.2 isolado encontrado em barris de cerveja após final de produção. Em vermelho a expressão gênica é maior e a escala de cores diminui até atingir a cor azul (menor expressão gênica). Fonte: Elaborado pelo próprio autor).

As amostras foram analisadas em diferentes tempos: sendo Ti: tempo inicial da fermentação (24h após inoculação); Tm: tempo médio da fermentação (72h após inoculação) e Tf: final do processo após 7 dias de fermentação (168h após inoculação). A legenda e as cores ao lado do gene indicam a finalidade do gene expresso.

Os genes GPD1 e GPD2 apresentaram sua expressão aumentada no início da fermentação na cepa GP2. Talvez isso explique uma menor produção de etanol no início da fermentação, já que, os aumentos na expressão desses

genes estiveram associados a formação de glicerol (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004). Além disso, a expressão do gene ADR1 foi aumentada no início da fermentação, que direcionou a via metabólica na transformação do álcool em acetaldeído (CIRIACY, 1975).

A rota metabólica desenhada para a cepa GP2 foi direcionada para a síntese de aldeídos, acetatos e acetil CoA (lipídeos), essa afirmação é possível de se verificar observando a expressão aumentada de PDC1 e ACS2 durante toda a fermentação.

O gene PDC1 é responsável pela descarboxilação do piruvato para acetaldeído (ZIMMERMANN, 1982), sendo essa diferença de expressão observada entre o controle e a GP2, que também podem ser identificadas nas concentrações encontradas de acetaldeído entre as cepas testadas. Assim como o acetaldeído, os ésteres acetato de etila e acetato de isoamila apresentaram grande diferença nas concentrações encontradas entre o controle e a cepa GP2, essa diferença pôde ser explicada pela expressão gênica relacionadas a via metabólica descrita para GP2.

Os genes ALD6 e ALD4 são responsáveis pela conversão de acetaldeído em acetato (MEADEN, 1997). Eles são expressos de modo semelhante nas duas cepas, porém a síntese de esteróis de Acetil-CoA, determinada pela expressão do gene ACS2 (BERG; STEENSMA, 1995), foi mais direcionada na cepa GP2. Conforme mencionado anteriormente, a união de acetil-CoA com o álcool é direcionado para a síntese de ésteres (WALKER; STEWART, 2016).

Em relação ao gene ADH1, ele foi mais expresso no meio da fermentação com a cepa GP2. Este gene é responsável por reduzir acetaldeído a etanol, ou seja, por desviar a rota metabólica a síntese de etanol (BAKKER et al., 2001; SMITH, 2004). Talvez, essa expressão tardia possa estar relacionada ao transporte de maltose, maltotriose (AGT1, MAL31) (HAN et al., 1995; CHOW; SOLLITTI; MARMUR, 1989) e transporte de hexoses (HXT1) (LEWIS; BISSON, 1991), que são expressos desde o começo da fermentação.

Talvez a cepa GP2 esteja em processo de adaptação ou domesticação, pois as rotas metabólicas direcionadas a formação de álcool aconteceram no

meio da fermentação e os compostos formados no início foram direcionados a outras vias, como observado no aumento da expressão do gene BDH1 (GONZÁLEZ et al., 2000) durante o início da fermentação, gerando maiores concentrações de diacetil em GP2 do que em S04.

Para os genes PAD1 e FDC1, a rota metabólica é direcionada a síntese de 4-vinilguayacol (4VG) que leva a formação de aromas fenólicos de cravo. A expressão aumentada desses genes revela características de leveduras pouco evoluídas (VANBENEDEN, et al., 2008; RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015).

Na produção atual, foi possível verificar que o gene PAD1 foi pouco expresso em GP2, porém o gene FDC1 é mais expresso no início e diminui com o final da fermentação, demonstrando talvez uma evolução dessa cepa (GALLONE et al., 2016). Em relação a análise sensorial, ressalta-se que a cepa GP2 apresentou no início aromas muito fenólicos voltados a cravo e banana, porém, isso não foi observado no segundo dia, muito provavelmente pela grande formação de CO₂ e eliminação para o meio ambiente.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou identificar uma diversidade de leveduras dentro de uma microcervejaria, que foram obtidas desde os insumos até o final do processo produtivo. O conhecimento destes microrganismos, *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*, e suas aplicações, possibilitaram gerar diversos estilos de cerveja e a formação de um banco de leveduras caracterizando os sabores, os aromas e os perfis sensoriais que irão desenvolver no produto final, e até mesmo no desenvolvimento futuro de indivíduos híbridos.

O entendimento da comunidade existente durante todo o processo produtivo gerou informações relevantes sobre a sucessão ecológica durante a fermentação e o suporte ou participação na formação do perfil sensorial da Cervejaria Invicta, indicando um certo *Terroir*, gerando características únicas daquele local.

Com essa seleção, foi possível identificar e selecionar cepas de potencial produtivo que demonstraram ter características de crescimento, de formação de álcool e de compostos aromáticos com interesse para indústria cervejeira. Além disso, foi possível identificar as vias metabólicas utilizadas pelas cepas selecionadas, sendo isso importante para estudos futuros no que se refere o desenvolvimento de leveduras por meio de cruzamentos e seleções ou domesticação de leveduras selvagens de interesse.

As perspectivas futuras com relação a presente pesquisa envolvem a utilização destas cepas selecionadas para o desenvolvimento de novos produtos e o entendimento de ambientes produtivos com sucessão ecológica e com possível formação de espécies híbridas, selecionando características importantes na produção através de bancos de leveduras como este apresentando nessa tese. Além disso, seria interessante se esse descritivo pudesse ser realizado em outras épocas do ano, para analisar se há mudanças significativas na comunidade de microrganismos presentes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA E SILVA, JB. Cerveja. In: VENTURINI Filho, G. W. **Tecnologia de Bebidas**. Edgar Blucher, Brasil, 2005, p.347-380.

BRAZIL, 2009, Regulamento da Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas, Decreto N°6871, de 4 de junho de 2009

BASSO, R.F.; ALCARDE, A.R.; PORTUGAL, C.B. Could Non-Saccharomyces Yeasts Contribute on Innovative Brewing Fermentations?" **Food Research International** **86**. Elsevier Ltd: pp. 112–20, 2016.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 15-37, 2001. Oxford University Press (OUP)

BERR JUDGE CERTIFICATION PROGRAM-BJCP. (2015). Style Guidelines for Beer, Mead and Cider. <https://dev.bjcp.org/wp-content/uploads/2013/10/Guia-de-Estilos-BJCP-2015-em-Portugue%CC%82s.pdf>, acesso em 03/01/2022.

BELLUTI, K. et al. Application of non-Saccharomyces yeast isolated from Kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, v.4, n.3, p66, 2018.

BELTRAMELLI, M. **Cervejas, brejas e birras**: um guia completo para desmistificar a bebida mais popular do mundo. São Paulo: Leya, 2012, 319p.

BREWERS ASSOCIATION. **Craft Brewer Defined**. Disponível em: <<http://www.brewersassociation.org/statistics/craft-brewer-defined/>>. Acesso em: 21 set. 2013

BOKULICH, Nicholas A.; BAMFORTH, Charles W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013

BOULTON, C.; CHRISTOPHER M.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. Wiley, 2008.

CARVALHO-NETTO, O.V., et al., A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell

population during bioethanol fermentation. **J Biotechnol**, 2013. v. 168, n. 4, p. 701-9.

CONCEIÇÃO, L. E. et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2015, n. 42, p. 237-246.

CIRIACY, M. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. **Mol Gen Genet**, v.138, n. 2, p. 57-64, 1975.

DEQUIN, S.; CASAREGOLA de, S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **Comptes Rendus Biologies**. 334, p. 687–693, 2011.

DELGADO, C.H.O. Obtenção, Caracterização e aplicação de lipases vegetais: utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco
Dissertação de Mestrado UNESP Botucatu, 2014

DOJON, B.A; LOUIS, E.J. Genome diversity and Evolution in te budding yeasts (*Saccharomycotina*), **Genetics**, v. 206, 717–750.

DRAGONE, G. ALMEIDA; SILVA, J.B. In: VENTURINI FILHO, W.G. Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia. V.1. São Paulo: Edgard Blücher, 2010

ESTEVE-ZARZOSO, B., et al., Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Int J Syst Bacteriol**, 1999. 49 Pt 1: p. 329-37.

GALLONE, B.; MERTENS, S.; CRAUWELSE, S.; et al. Genomics and Evolution of Beer Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, 2017. Caister Academic Press

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.R.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 535–569.

GUINDON, S., et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, 2010. V. 59, n. 3, p. 307-21.

HALL, T.A., **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 1999. 41p.

HE, L.Y.; ZAO, X.Q.; GE, X.M.; BAI, F.W. (2012) Identification and functional study of new FLO10-derivative gene from the industrial flocculation yeast SPSC01. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 39:1135-1140.

HOFFMAN, C.S. **Preparation of yeast DNA**. Curr Protoc Mol Biol, 2001. **Chapter 13**: p. Unit13 11.

Water : A Comprehensive Guide for Brewers “, John Palmer & Colin Kaminski 2013; Yeast ;;

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, 2013. v. 30, n. 4, p. 772-80.

KLEBAN, J.; NICKERSON, I. To brew, or not to brew – That is the question: an analysis of competitive forces in the craft brew industry. Journal of the International Academy for Case Studies, v. 18, n. 3, p. 59–81, 2012.

KUCK, L. S. **Cerveja**: sabor e aroma. 2008. 46f. Trabalho acadêmico - Graduação em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 3. ed. Trad. Susan Pratt. Berlin: VBL Berlin, 2004.

KURTZMAN, C.P; Identification and Taxonomy. In: KIRSOP, B.E.; KURTZMAN, C.P. (Ed) **Living resources for biotechnology**: yeasts. New York, Cambridge, 1988.p.99-140

KURTZMAN, C. P. (1993). Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. Antonie Leeuwenhoek 63, 165-174.

LAITILA, et. al. Yeast in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). Antonie van Leeuwenhoek (2011) 99:75–84

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia**: bases científicas e tecnológicas. 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LIMBERGER, S.C.;TULLA, A.F. A emergência de microcervejarias diante da oligopolização do setor cervejeiro(Brasil e Espanha). **Finisterra**, LII, 105, 2017, pp. 93-110

MALLET, J. **Malts**: a practical guide from field to brewhouse. Brewers publication, 2014, 300p.

MAPA (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento) 2021, **Anuário da cerveja 2020**, Disponível em: ``<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-crescimento-de-14-4-em-2020-numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-passa-de-1-3-mil/anuariocerveja2.pdf>``

MEADEN PG, et al. (1997) The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg(2+)-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast* 13(14):1319-27 PMID: 9392076

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; et al. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, v. 33, n. 4, p. 129–144, 2016. John Wiley and Sons Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.3146>>. Acesso em: 20/10/2021.

METHNER, Y et. al. Screening for the brewing ability of diferente non-*Saccharomyces* yeasts. *Fermentation*, v.5, n.4, p.101, 2019.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1.ed. São Paulo: Larousse, 2009, 357p.

NAUMOVA, E.S.; KORSHUNOVA, I.V.; NAUMOV, G.I. (2003). Molecular Analysis of the α -Galactosidase *MEL* Genes in Yeast *Saccharomyces sensu stricto* *Molecular Biology*.37: 699–706.

NEVOIGT, Elke. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

NILSSON, R.H., et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evol Bioinform Online**, 2008. n. 4, p. 193-201.

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 123, n. 1, p. 13–23, 2017.

OLIVER, G. **A mesa do mestre cervejeiro**. Tradução de Anthony Cleaver. São Paulo: Senac, 2012

OLIVEIRA, N. A. M. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da Cerveja.2011. 45f. **Monografia**- Monografia Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial - Universidade Federal de Minas Gerais /UFMG, Belo Horizonte, 2011.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S. R.; et al. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiology*, v. 70, p. 76–84, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.007>>.

OXOID, S.A., Products: Lysine medium, 2021.

How To Brew Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time
John Palmer 2006

PATRICIA, ANCHORENA-MATIENZO. Re-Identificação e Caracterização Genética da Levedura IZ-987 Utilizando Marcadores Moleculares. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos- Piracicaba, 2002. 81f: il

PEREIRA, E. H. S. Avaliação do potencial de leveduras não convencionais isoladas de matrizes brasileiras para fermentação de mosto cervejeiro. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –Bioquímica.. – Curitiba, 2020. 89 f. : il.

PIDDOCKE M. P., KREISZ S., HELDT-HANSEN H. P., NIELSEN K. F., OLSSON L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 453–464. 10.1007/s00253-009-1930-y

PIOVEZAN, M. Cromatografia Gasosa, aula de Análise Instrumental II, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campus Florianópolis- Santa Catarina,2018, “Acesso em:5/05/2022:<https://docente.ifsc.edu.br/marcel.piovezan/MaterialDidatico/AIN%202/Aula%20Cromatografia%20gasosa%20AIN%202.pdf>”

POSADA, D., jModelTest: phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol**, 2008. V. 25, n. 7, p. 1253-6.

Mastering homebrew The Complete Guide to brewing delicious beers Randy-Mosher 2015

REIS, V.R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol, in **ESALQ**. 2011. Universidade de São Paulo: Piracicaba.

RICHARD, Peter; VILJANEN, Kaarina; PENTTILÄ, Merja. Overexpression of PAD1 and FDC1 results in significant cinnamic acid decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, v. 5, n. 1, p. 12, 18 dez. 2015.

SANGER, F., et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, 1977. v. 265, n. 5596, p. 687-695.

SANTOS, A.A. et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2017. N. 20.

SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, Linda; DEQUIN, Sylvie. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*, v. 150, n. 7, p. 2209–2220, 1 jul. 2004.

SAMPAIO, J. P.; PONTES, A.; LIBKIND, D.; HUTZLER, M. Taxonomy, Diversity, and Typing of Brewing Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, 2017. Caister Academic Press. Disponível em: <<http://www.caister.com/brewing>>. Acesso em: 21/10/2021.

SEBRAE. **Microcervejarias**. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/arquivos_chronus/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$file/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/arquivos_chronus/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$file/7503.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2017.

SILVA, C.H.P. M. **Microbiologia da Cerveja**, 1. Ed. São Paulo: Livraria da Física, 2019, 369p.

SMITH MG, et al. (2004) Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol Cell Biol* 24(9):3874-84 PMID: 15082781
SGD PaperDOI full textPMC full textPubMed

SOUSA, P.S., ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE *Polybia ignobilis* (HYMENOPTERA: VESPIDAE), Dissertação de Mestrado Mestre em Ciências Biológicas, UNESP-Rio Claro-SP, 2011

SOUZA H.F.; STRAMANDIONOLI. G.G.; et. al. **Produção de cervejas ácidas com microrganismos não convencionais**. Ensino e pesquisa no campo da engenharia e da tecnologia de alimentos 2. São Paulo: Atena, 34p.

STAMBUK, B.U.; ALVES, S.L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Letter in Applied Microbiology*, v.43, p. 370-376, 2006.

SPITAEELS, F., The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented lambic Beer, *PLos one*, 9(4), pp. e 95384

STROPPIA, C.T.A., S. R.; ANDRIETTA, M. G. S. Caracterização de leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis/SC, 2003.

STRONG, G. **Brewing Better Beer**: Master Lessons for Advanced Home Brewers. Brewers publication, 2011, 316p.

TILLOY, Valentin et al. Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 213, p. 49–58, 2015.

TSCHOPE, E.C. **Microcervejaria e cervejarias**: a história, a arte e a tecnologia. Editora Ad. São Paulo, 2001.

VAN MULDER, S.E.; GHEQUIRE, M.; DAENEN, L.; VERBELEN, P.J.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.R. (2010). Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88: 1321-1331.

VAN RIJSWIJCK, I. M. H. et. al Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewer's yeast for steering ethanol and aroma production. *Microbial Biotechnology*, v.10, n. 6, p. 1591-1602, 2017

VASCONCELOS, Yuri. Inovações cervejeiras: investimento em pesquisa e em novas tecnologias melhora a qualidade da cerveja brasileira e os custos de produção. **Fapesp**, São Paulo, ed. 251, 2017, p. 18-25. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/foelheie-a-edicao-251/>>. Acesso em: 15/09/2021.

VANBENEDEN, N.; GILS, F.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. (2008a). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. 107: 221-230.

VENTURINI FILHO, W.G. Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia. São Paulo: Editora Blucher, 2010, v1, p 14-50.

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

VERSTREPEN, K.J.; JANSEN, A.; LEWITTER, F.; FINK, G.R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*. 37: 986-990.

VIDGREN, V., MULTANEN, J. P., RUOHONEN, L., & LONDESBOROUGH, J. (2010). The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS yeast research*, 10(4), 402-411.

VOET ET AL. **Fundamentos da Bioquímica**. São Paulo Editora Artes médicas Sul LTDA, 2000, p931

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic substances in beer: structural diversity, reactive potential and relevance for brewing processo and beer.

Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety. 2018, v. 17, n. 4, 953-988.

WALKER, Graeme; STEWART, Graham. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, v. 2, n. 4, p. 30, 17 nov. 2016.

WINGARD, J. R., MERZ, W.G., SARAL, R. (1979) *Candida Tropicallis*: a major pathogen in immunocompromised patients, *Annals of Internal Medicine*, 91 (4), pp. 539-543

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