



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



**“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE SELVAGENS PARA PRODUÇÃO CERVEJEIRA.
DESENVOLVIMENTO DE UM SCALE UP INDUSTRIAL”**

Jeferson Geraldo de Oliveira Martins

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

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Coorientador:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

**São Carlos – SP
2024**

JEFERSON GERALDO DE OLIVEIRA MARTINS

**“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE SELVAGENS PARA PRODUÇÃO
CERVEJEIRA. DESENVOLVIMENTO DE UM SCALE UP
INDUSTRIAL”**

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

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Coorientador:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Silva

Departamento de Genética e Evolução/UFSCar

Prof. Dr. Diego Bonatto

Instituto de Biociências/UFRGS

Prof. Dr. Gabriel Gerber Hornink

Departamento de Bioquímica/Unifal

Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha

Departamento de Biologia/UFRJ

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Departamento de Morfologia e Patologia/UFSCar

São Carlos

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Qualificação para Doutorado do candidato JEFERSON GERALDO DE OLIVEIRA MARTINS, realizada em 28/06/2024.

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
DGE/UFSCar

Prof. Dr. Diego Bonatto
IB/UFRGS

Prof. Dr. Gabriel Gerber Hornink
DBQ/Unifal

Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha
DB/UFRJ

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
DMP/UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos,
minha esposa Tatiane e meus filhos Benjamin e Betina.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por me prover de todas as condições para prosseguimento no caminho da sabedoria!

Agradeço, inicialmente, ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, pela oportunidade, paciência, companheirismo e convívio ímpar, ao longo dessa jornada de amizade e pesquisa. À minha coorientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, sempre solícita, pela contribuição em momentos importantes dessa caminhada.

Aos membros da banca examinadora do exame de qualificação, Prof. Dr. Adilson José da Silva (DEQ/UFSCar), Prof. Dr. Diego Bonatto (IB/UFRGS), Prof. Dr. Gabriel Gerber Hornink (DBQ/Unifal), Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha (DB/UFRJ) e Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (DMP/UFSCar), pela participação e contribuição valiosa para aprimoramento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec/UFSCar) e a todos funcionários, à Claudia Pasterga, pela prestatividade, paciência e profissionalismo.

Aos meus pais, Maria das Dores de Oliveira Martins e José de Freitas Martins, tementes a Deus, exemplo de integridade familiar, companheirismo e crença na educação e formação moral de seus filhos!

À minha amada esposa Tatiane, quanta paciência, sabedoria e auxílio. Obrigado por cultivar os nossos sonhos, e me despertar para o romper dos desafios da vida! Pela paciência e abdicção, nunca se esquecendo de que esse período crítico passaria e nossas atividades familiares se normalizariam.

Aos meus queridos e eternos avós, pela convivência, formação e exemplo de unidade familiar! *In memoriam*: Maria Sebastiana de Souza (Vovó Dindinha), Niobelo de Oliveira (Vovô Belo) e Cecília de Freitas (Vovó Cecília).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela excelência de seus programas e apoio financeiro fundamental.

Aos colegas de profissão, pelo suporte nas análises: Paulo André Roversi, Mestre-Cervejeiro, da Indústria Cervejeira de Itu SP, Dr. Bruno Andrion, da Indústria Cervejeira de Araraquara SP e Jeferson Luís Tacão, Mestre-Cervejeiro da Indústria Cervejeira de Araraquara SP.

Ao Prof. Dr. Elias Monteiro Filho (UNESP Araraquara SP), pela parceria e contribuição fundamentais para viabilização de técnicas importantes para esse trabalho;

Ao Prof. Dr. Thiago Ollita Basso e colaboradores do Laboratório de Bioprocessos – BELA – da Universidade de São Paulo – USP – pela colaboração que nos propiciou a investigação por meio de HPLC dos experimentos de fermentação com linhagens de interesse.

Ao Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha (UFRJ) e estimado colega Werner Florentino Brandão, pela parceria e contribuição valiosas, viabilizando uma abordagem inovadora por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e grande contribuição para evolução desse trabalho.

Ao amigo e eterno aprendiz Edmundo Escrivão Neto por apoiar e constituir o grupo de avaliadores sensoriais profissionais na cidade de São Carlos. À equipe de *Beer Sommeliers* Profissionais de São Carlos.

Aos avaliadores do painel constituído por colegas da UFSCar, que gentilmente doaram parte de seu tempo contribuindo para avaliação das cervejas desenvolvidas!

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi pela contribuição científica nesse trabalho, elucidações e contribuições fundamentais.

Ao Prof. Dr. Sam Crauwels, da Universidade Católica de Leuven, Bélgica, pela importante contribuição e avaliação sensorial das cervejas desse estudo.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, pela valiosa contribuição e análise sensorial das cervejas.

Aos colegas do LBGA/DGE pelo convívio e carinho! Ao João Paulo e Olinda pela contribuição e ensinamentos nas técnicas de qPCR e extrações intermináveis de RNA. Ao companheiro Dr. Cleiton Prado Dias pelos ensinamentos e sequenciamento, além das atividades de extensão. À colega Graziela por tantas parcerias em diversas análises e curvas de crescimento. À colega Dr. Emeline Boni Campanini pelas contribuições em Bioinformática. Ao colega Dário, cujas contribuições foram fundamentais para evolução dessa pesquisa. Aos colegas Hosana, Bruno, Gustavo, Manuela e Jéssica que engrandeceram e suportaram esse trabalho, minha singela gratidão.

Muito obrigado!

De Oliveira Martins, Jeferson Geraldo **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SELVAGENS PARA A PRODUÇÃO CERVEJEIRA. DESENVOLVIMENTO DE UM SCALE UP INDUSTRIAL**. 2024. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

RESUMO

Os desafios para o emprego de leveduras selvagens na indústria cervejeira são consideráveis, todavia se justificam pela riqueza da biodiversidade envolvida, além da demanda crescente por cervejas com propriedades sensoriais aprimoradas e aromas distintos. O presente estudo objetivou a caracterização genética e fisiológica de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens para a produção cervejeira, além da obtenção de um *scale up* industrial. Técnicas biomoleculares foram utilizadas para caracterização genética das 5 linhagens selvagens do gênero *Saccharomyces*, nominalmente LBGA-01, 287, 288, Hv8 e Hb1. As relações de filogenéticas de máxima verossimilhança foram inferidas mediante o sequenciamento do produto amplificado das regiões ITS. Crescimentos foram avaliados em diferentes fontes de carbono, assim como na presença de agentes estressores como etanol e iso- α -ácidos do lúpulo. As linhagens foram caracterizadas quanto à produção de *POF*, capacidade de floculação, formação de espuma e resistência à pressão osmótica. Microfermentações foram conduzidas para investigação da cinética fermentativa, atenuação aparente, teor alcóolico e pH. As linhagens apresentaram características fisiológicas semelhantes aos padrões comerciais. Estrategicamente, as cepas LBGA-01, 287 e Hv-8 foram utilizadas para a produção de cervejas em pequena escala (9 litros). Análises físico-químicas, RMN, HPLC e GC apontaram semelhanças e diferenças quanto aos níveis de assimilação de nitrogênio (FAN), rendimento alcóolico, perfil de subprodutos e voláteis. A análise da expressão gênica (qPCR) possibilitou um melhor entendimento dos genes pertencentes às principais rotas bioquímicas. Os resultados das avaliações sensoriais foram tratados por meio da Análise de Componente Principal (PCA) e contribuíram para a formação do inóculo misto entre a cepa 287 e o padrão comercial WB06®. Finalmente, a fase de *scale up* industrial permitiu obtenção de cervejas com características aromáticas e sensoriais de grande interesse para indústria cervejeira.

Palavras-chave: Caracterização, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, *scale up*.

De Oliveira Martins, Jeferson Geraldo. **GENETIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR BEER PRODUCTION. DEVELOPMENT OF AN INDUSTRIAL SCALE UP.** 2024. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

ABSTRACT

The challenges of using wild yeasts in the brewing industry are considerable, but they are justified by the wealth of biodiversity involved, as well as the growing demand for beers with improved sensory properties and distinct aromas. The aim of this study was to genetically and physiologically characterize wild *Saccharomyces cerevisiae* for brewing, as well as to obtain an industrial *scale up*. Biomolecular techniques were used to genetically characterize the 5 indigenous *Saccharomyces*, nominally LBGA-01, 287, 288, Hv8 and Hb1. Maximum likelihood phylogenetic relationships were inferred by sequencing the amplified product from the ITS regions. Growth was evaluated on different carbon sources, as well as in the presence of stressors such as ethanol and iso- α -acids from hops. The strains were also characterized for POF production, flocculation capacity, foam formation and resistance to osmotic pressure. Microfermentations were conducted to investigate fermentation kinetics, apparent attenuation, ethanol production and pH reduction. The strains showed physiological characteristics similar to commercial standards. Strategically, the LBGA-01, 287 and Hv-8 strains were used for small-scale beer production (9 liters). Physical-chemical, NMR, HPLC and GC analyses showed similarities and differences in the levels of nitrogen uptake (FAN), alcohol yield, by-product profile and volatiles. Gene expression analysis (qPCR) allowed a better understanding of the genes belonging to the main biochemical pathways. The results of the sensory evaluations were treated by means of Principal Component Analysis (PCA) and contributed to the formation of the mixed inoculum between strain 287 and the commercial standard WB06®. Finally, the industrial scale up phase allowed to obtain beers with aromatic and sensorial organoleptic characteristics of great interest to the brewing industry.

Keywords: Characterization, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, scale up.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Introdução

- Figura 1.1** Vias metabólicas para fermentação alcoólica e consumo de etanol. Adaptado de Thomson, J. Michael, et al., 2005 21
- Figura 1.2** Representação do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. **A** Estrutura filogenética; **B** Representação genômica; **C** Representação genômica dos híbridos interespecíficos. Fonte: Boreman; Petrorius, 2015..... 24
- Figura 1.3** Principais vias metabólicas e desvios de rotas durante consumo de glicose para produção de etanol. Fonte: Tilloy et al., 2015 25
- Figura 1.4** Adaptado de He et al., 2014 27
- Figura 1.5** Metabolismo celular resultando na formação de álcoois superiores Adaptado de Garcia 2017 28
- Figura 1.6** Diagrama do complexo gênico ribossômico (não em escala). Estrutura contempla: sequência codificadora para subunidade menor rRNA18S, região espaçadora interna 1 (ITS1), região codificadora para subunidade 5.8S, região espaçadora interna 2 (ITS2) e sequência codificadora para subunidade ribossômica 26S. As setas indicam regiões aproximadas de ancoragem dos primers específicos. **Fonte:** Adaptado de Arbefeville et al. (2017); Fonseca (2019)..... 33
- Figura 1.7** Frequência do fenótipo produção de 4-Vinil-Guaiacol observado em leveduras em diversos ramos da indústria e por região de origem. Adaptado de Gallone (2016)..... 35

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

- Figura 2.1** Panela cervejeira elétrica 50 litros – Fonte: Amazon do Brasil (2023).(acesso <https://images.app.goo.gl/CjE4KKYkaMnYD3FQ6>) 60
- Figura 2.2** Fermentador plástico 10 litros provido de selo tipo *airlock*. Fonte: O próprio autor (2023).... 63

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

- Figura 3.1** Amplificação da região ITS de seis diferentes isolados possivelmente *Saccharomyces*. M: marcador de tamanho molecular. Can: *Candida albicans* (não-*Saccharomyces*). C1 e C2: leveduras comerciais *Saccharomyces*, respectivamente S04[®] e WB06[®]. 01 a 06: linhagens estudadas, respectivamente: LBGA01, Hv5, Hv6, Hv8, 287 e 288. **Fonte:** O próprio autor 73
- Figura 3.2** Amplificação da região ITS de cinco diferentes isolados possivelmente *Saccharomyces*. M: marcador de tamanho molecular. CAT-1: *Saccharomyces cerevisiae* (bioetanol).. 01 a 05: linhagens estudadas, respectivamente: LBGA01, 287, 288, Hv8 e Hb1. 07, 08 e 09: leveduras comerciais *Saccharomyces*, respectivamente S33[®], WB06[®] e S04[®]. **Fonte:** O próprio autor 73
- Figura 3.3** Genotipagem de linhagens de interesse. Poço 01: Marcador Molecular; Poço 02: CAT-1 (*Saccharomyces* utilizada para bioetanol); Poços 03 a 07 respectivamente: LBGA1, 287, 288, Hv8 e Hb1. Poço 08: Levedura comercial WB06[®] Fermentis..... 74
- Figura 3.4** Árvore filogenética representando a relação evolutiva das cepas leveduras investigadas para fabricação de cervejas. CAT-1: cepas de levedura utilizada na fabricação de bioetanol; linHV8, lin287, lin288, linHB1, LBGA-01: cepas investigadas no presente estudo; linS04: cepa comercial S04[®] Fermentis

utilizada na fabricação de cerveja; Cepas não-Saccharomyces: LBGA157og, LBGA175og: e Candida.
 Fonte: O próprio autor..... 76

Figura 3.5 Gráficos comparativos do desempenho das leveduras a 30 °C nos meios  YPD 2% e  YPM 2%. Linhagens investigadas (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1. Cepas comerciais utilizadas como padrão: (F) S04® e (G) WB06®. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor..... 78

Figura 3.6 Crescimento a 30 °C das leveduras investigadas: LBGA-01, 287, 288, Hv8, Hb1. Cepas comerciais utilizadas como padrão: S04® e WB06®. Meio de crescimento Extrato de malte (EM) 2%. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: o próprio autor 79

Figura 3.7 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1 e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo: Extrato de malte 20°P e Extrato de malte 25°P. Extrato de malte 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. 82

Figura 3.8 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1 e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo:  Etanol 5% (v/v) e  Etanol 10% (v/v).  YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor..... 84

Figura 3.9 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1 e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo:  Lúpulo 50 ppm e  Lúpulo 90 ppm.  YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo..... 86

Figura 3.10 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1, e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo:  Etanol 5% (v/v) +Lúpulo 50 ppm e  Etanol 5% (v/v) + Lúpulo 90 ppm.  YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo 88

Figura 3.11 Exemplo de teste de formação de espuma acima do líquido para cepas em estudo. A seta azul indica uma linhagem com baixa formação de espuma (cepa LBGA-Hv8), enquanto a seta vermelha indica uma linhagem com alta formação de espuma (cepa LBGA-01). **Fonte:** O próprio autor..... 90

Figura 3.12 Ilustração de aspectos de floculação distintos entre cepas em estudo. A seta em azul indica uma linhagem com alta floculação (cepa LBGA-01), enquanto a seta vermelha indica uma linhagem com baixa floculação (cepa LBGA-Hv5). **Fonte:** O próprio autor 92

Figura 3.13 Evolução do extrato a partir de mosto de cevada 12°P durante processo fermentativo conduzido a 20 °C para as cepas investigadas: LBGA-01, 287, 288, Hv8 e Hb1 nos tempos de 0 a 216 horas. Os controles comerciais S04® e WB06® foram utilizados como referência de leveduras, respectivamente, de média e elevada atenuação. Valores hachurados correspondem às densidades finais para cada cepa, em triplicata. Nível de confiança de 95%..... 96

Figura 3.14 Comparação dos níveis de expressão relativa de genes relacionados à eficiência fermentativa (A), metabolismo de açúcares (B) e produção de aromas (C) durante microfermentação de cervejas. As amostras foram analisadas nos tempos **Ti**: tempo inicial da fermentação, 24 horas após inóculo e **Tf**: final do processo após 216 horas do mosto ter recebido o inóculo de fermento. WB06® foi utilizada como padrão comercial. **Fonte:** O próprio autor. 109

Figura 3.15 Gráfico aranha a partir das médias das intensidades para os diversos atributos qualitativos. Linhagens de interesse: LBGA-01, 287 e Hv8. Linhagem comercial: WB06® Fermentis. Os atributos “Corpo”, “Cítrico” e “Floral” não apresentaram diferença significativa estatisticamente (ANOVA, p<0,05). Fonte: O próprio autor..... 111

Figura 3.16 Mapa de vetores para diversos fatores da Análise de Componentes Principais da análise sensorial de cervejas de interesse. Somente fatores com valor p no teste F menor que 0,05 foram considerados. Fonte: O próprio autor. 113

Figura 3.17 Pontos médios com elipses de confiança ($\alpha = 0,05$) para Análise de Componentes Principais (PCA) para cervejas de interesse sensorial: Linhagens estudadas: 287, Hv8 e LBGA-01. Referência comercial: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor. 114

Figura 3.18 Evolução do extrato a partir de mosto de cevada 12°P durante processo fermentativo conduzido a 20°C para as seguintes proporções entre cepas: **P1** (100% LBGA 287), **P2** (80% LBGA 287 & 20% WB06®), **P3** (60% LBGA 287 & 40% WB06®), **P4** (50% LBGA 287 & 50% WB06®), **P5** (40% LBGA 287 & 60% WB06®), **P6** (20% LBGA 287 & 80% WB06®) e **P7** (100% WB06®) nos tempos de 0 a 240 horas.
Fonte: o próprio autor..... 118

Figura 3.19 Gráfico aranha a partir das médias das intensidades para os diversos atributos qualitativos. Mix de interesse (**P4**) versus Linhagem comercial WB06® Fermentis (**P7**). Não há diferença estatística significativa entre os atributos avaliados. (ANOVA, $p < 0,05$). **Fonte:** O próprio autor.....120

Capítulo 4 - Conclusões

Anexo

Figura 01 Delineamento experimento de crescimento celular em placas 96 poços com disposição de linhagens de interesse: LBGA-01, LBGA-287, LBGA-288, Hv8 e Hb1 e comerciais: S04 e WB06R® (referência) em meio referência: Controle YPEM 2% e agentes estressores: Etanol 5%, Etanol 10%, Lúpulo 50 ppm, Lúpulo 90 ppm e suas combinações: Etanol 5% & Lúpulo 50 ppm e Etanol 5% & Lúpulo 90 ppm..... 135

Figura 02 Receita de mosto para obtenção cervejas para testes sensoriais – parte I. Fonte: O próprio autor. Obtida mediante software: Beersmith 3 v.3.0.8 138

Figura 03 Receita de mosto para obtenção cervejas para testes sensoriais – parte II. Fonte: O próprio autor. Obtida mediante software: Beersmith 3 v.3.0.8 139

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Introdução

Tabela 1.1 Características fisiológicas de linhagens tipo ale e lager	22
Tabela 1.2 Metabólitos secundários da fermentação alcoólica	26
Tabela 1.3 Limiar de percepção, Faixa de concentração e Impressão aromática para álcoois superiores e ésteres	29
Tabela 1.4 European Lager e outros.....	36
Tabela 1.5 British Beer e outros.....	37
Tabela 1.6 European Sour Ale e outros	38
Tabela 1.7 Standard American Beer e outros	39

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Tabela 2.1 Culturas de leveduras e suas origens	44
Tabela 2.2 Genes e respectivos iniciadores	47
Tabela 2.3 Composição de genes, funções, referências e primers iniciadores utilizados para análises da expressão gênica	50
Tabela 2.4 Composição do mosto utilizado para microproduções de cervejas (12,0°P)	58
Tabela 2.5 Temperaturas e coluna utilizada para determinação por GC de subprodutos de fermentação	68
Tabela 2.6 Ensaio sensorial triangular para avaliar possíveis diferenças entre linhagens.....	70

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3.1 Altura média atingida durante fermentação de mosto 12°P	89
Tabela 3.2 Capacidade de floculação (%) após 30 minutos de sedimentação celular	91
Tabela 3.3 Resultados físico-químicos obtidos por HPLC para cervejas obtidas por micro fermentação .94	
Tabela 3.4 Utilização percentual de açúcares do mosto cervejeiro por linhagens-teste e padrões comerciais.....	95
Tabela 3.5 Atenuação aparente (%) de cervejas após micro fermentações em triplicata.....	97

Tabela 3 6 Redução do pH durante a fermentação primária e após maturação	98
Tabela 3 7 Resultados sensoriais do teste de Phenolic Off Flavour (POF)	100
Tabela 3 8 Composição do mosto cervejeiro obtido por processo de mosturação, medida em triplicata antes do processo de fermentação	101
Tabela 3 9 Resultados físico-químicos a partir de HPLC para cervejas de interesse sensorial.....	102
Tabela 3 10 Percentual médio da utilização dos principais açúcares no mosto cervejeiro	103
Tabela 3 11 Resultados físico-químicos, atenuação aparente (%) e tempo de fermentação para cervejas de interesse sensorial	104
Tabela 3 12 Perfil de voláteis obtidos por Cromatografia gasosa (GC) para cervejas de interesse sensorial	105
Tabela 3 13 Teste triangular para cervejas obtidas com linhagens investigadas	115
Tabela 3.14 Características das cervejas produzidas em Scale up pelas linhagens inóculo misto (P4) e WB06® (P7).....	119
Tabela 3.15 Teste triangular para cervejas obtidas após <i>scale up</i>	119
Tabela 3.16 Teste de preferência para cervejas obtidas na fase de <i>scale up</i>	121

Capítulo 4 - Conclusões

Anexo

Tabela 01 Número mínimo de respostas para que exista diferença significativa entre amostras – Teste Triangular para diversos níveis de probabilidade (α)	140
Tabela 02 Disposição de amostras apresentadas ao painel sensorial de forma aleatória e randomizada. Amostras identificadas são representadas por dois códigos distintos.	141
Tabela 03 Resultados do Teste descritivo para julgamentos das Linhagens de interesse: LBGA-01, 287 e Hv8 e Linhagem de referência: WB06® Fermentis. Atributos avaliados: “Frutado”, “Floral”, “Cítrico”, “Condimentado”, “Ácido”, “Retrogosto” e “Corpo”.....	142
Tabela 04 Tabela de valores médios para julgamentos do painel profissional (PP) para os sete atributos iniciais: “Frutado”, “Floral”, “Cítrico”, “Condimentado”, “Ácido”, “Retrogosto” e “Corpo” para as linhagens de potencial sensorial: LBGA-01, 287 e Hv8, além da linhagem comercial WB06® Fermentis	144

Lista de Abreviaturas e Siglas

4-VG	4-Vinilguaiaicol
4-VP	4-Vinilfenol
4-VS	4-Vinilestireno
AA%	<i>Atenuação aparente em %</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BLASTN	<i>Basic local alignment search tool</i>
BU	<i>Bitterness Unit – Unidade de amargor (mg/L de isso-α-ácido)</i>
DGE	<i>Departamento de Genética e Evolução</i>
DMS	<i>DimetilSulfureto</i>
DO	<i>Densidade óptica</i>
FAN	Free Amino Nitrogen – Nitrogênio livre assimilável
FG	<i>Final gravity – Densidade final (extrato pós fermentação primária)</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ITS	Internal transcribed spacer – Região espaçadora interna
LBGA	Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OG	<i>Original gravity – Densidade original (extrato do mosto antes da fermentação)</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PL	Painel leigo (panelistas não treinados previamente)
POF	<i>Phenolic Off Flavor</i>
PP	Painel profissional (panelistas treinados Beer Sommeliers)
qPCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
RMN	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>
SO4®	Linhagem comercial de fermento para cervejas inglesas - Fabricante Fermentis
WB06®	Linhagem comercial de fermento para cervejas de trigo - Fabricante Fermentis
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose medium</i>
YPM	<i>Yeast extract peptone maltose medium</i>

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	13
Anexo.....	14
Lista de Abreviaturas e Siglas	15
1. Capítulo 1 – Introdução	16
1.1 História da cerveja	17
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.3 Leveduras empregadas para produção cervejeira.....	23
1.4 Bioquímica da fermentação	24
1.5 Caracterização molecular de leveduras	32
1.6 Estilos de Cervejas	34
1.7 Justificativas	39
1.8 Objetivos	40
1.8.1 Objetivos gerais.....	41
1.8.2 Objetivos específicos	41
2. Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	43
2.1 Isolados de leveduras.....	43
2.2 Crescimento e manutenção das culturas	44
2.3 Caracterização molecular dos isolados de leveduras	45
2.3.1 Extração do DNA	45
2.3.2 Amplificação da região ITS	45
2.3.3 Genotipagem	46
2.3.4 Análise filogenética dos isolados.....	47
2.4 Análise da expressão gênica por qPCR	48
2.5 Caracterização fisiológica das culturas isoladas.....	52
2.5.1 Teste de crescimento populacional em diferentes meios de cultivo	52
2.5.2 Tolerância ao etanol e compostos do lúpulo	53
2.5.3 Capacidade crescimento sob pressão osmótica.....	54
2.5.4 Capacidade de floculação	55
2.5.5 Capacidade de formação de espuma	56
2.5.6 Teste do <i>Phenolic Off-Flavor (POF)</i>	56
2.6 Microproduções de cerveja	57
2.7 Fermentação de cervejas com cepas pré-selecionadas.....	59
2.8 <i>Scale up</i> combinado com abordagem de Mix de fermentos	64
2.9 Métodos analíticos.....	66

2.10	Análise Sensorial	69
2.11	Análises estatísticas	70
3.	Capítulo 3 – Resultados e Discussão	72
3.1	Caracterização geral de isolados de interesse	72
3.1.1	Identificação molecular das cepas em estudo	72
3.1.2	Caracterização fisiológica das linhagens	77
3.1.3	Caracterização tecnológica das linhagens -Microfermentação	92
3.1.4	Caracterização das linhagens selecionadas para avaliação sensorial	100
3.1.5	Análise da expressão gênica	107
3.1.6	Perfil sensorial das cervejas	110
3.2	Caracterização de mixes de fermentos e desenvolvimento de um <i>Scale up</i> industrial.....	116
4.	Capítulo 4 – Conclusões	122
4.1	Perspectivas futuras	124
	Referências.....	125
	Anexos.....	134
	Anexo A – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM MICROPLACAS 96 POÇOS	134
	Anexo B – RECEITA DE MOSTO CERVEJEIRO INDUSTRIAL (SENSORIAL)	138
	Anexo C -TABELA COM NÚMERO MÍNIMO DE JULGAMENTOS NECESSÁRIOS – TESTE TRIANGULAR.	140
	Anexo D – MODELO DE FICHA ORGANIZADORA PARA TESTE TRIANGULAR	141
	Anexo E – Julgamentos sensoriais obtidos em Teste discriminatório por painel profissional (PP) e tratamento estatístico mediante ANOVA	142
	Anexo F – Modelo de ficha utilizada para condução e coleta de julgamento (Teste triangular).....	145
	Anexo G - SEQUÊNCIA DO ITS DAS LINHAGENS INVESTIGADAS	146
	Anexo H - RECEITA DE MOSTO CERVEJEIRO INDUSTRIAL (<i>SCALE UP</i>)	152

1. Capítulo 1 – Introdução

A produção de bebidas alcóolicas a partir do emprego de leveduras e fontes de carbono fermentescíveis é a mais antiga e relevante atividade econômica dentre todas as práticas biotecnológicas atuais (Walker & Stewart, 2016).

Em especial, a cerveja é a bebida resultante da fermentação dos açúcares provenientes da cevada malteada, em solução adicionada de lúpulo, por ação de leveduras. É uma das bebidas mais conhecidas em todo mundo, ficando atrás somente da água e do chá (Romero *et al.*, 2022).

O Brasil destaca-se no mercado cervejeiro global ocupando a terceira posição no ranking dos maiores produtores da bebida, liderado pelos Estados Unidos e China. Em 2018, segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL), o Brasil industrializou mais de 14 bilhões de litros da bebida, com um faturamento da ordem de R\$ 21 bilhões, correspondentes a 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (DE OLIVEIRA DIAS & FALCONI, 2018).

Segundo Meier-Dörnberg (2017b), o mercado alemão de cervejas tem percebido uma redução por anos consecutivos na participação de estilos tradicionais como *Pilsen* e *Weizenbiers*. (cervejas de trigo). Por outro lado, o crescimento consistente das cervejas denominadas “especiais” ou “artesanais” tem contribuído significativamente para a manutenção do mercado alemão de cervejas.

Globalmente, a popularidade das cervejas artesanais tem aumentado ao longo dos últimos anos e as cervejarias têm concentrado esforços na obtenção de produtos inovadores e diferenciados em suas aparências, aromas e características sensoriais (VIANA *et al.*, 2021).

No Brasil, o número de estabelecimentos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) saltou de 159 unidades em 2012 para 1.759 unidades produtoras de cervejas em 2022, representando um salto de 1.000% (MAPA, 2023).

Claramente, a mudança do padrão de consumo da cerveja nos últimos anos tem levado à criação de novos estilos ou variações dos daqueles tradicionais. Para alcançar tal inovação, a indústria tem introduzido novas combinações de maltes, lúpulos ou mesmo substâncias aromáticas, contanto, entretanto, com uma variedade limitada

de linhagens de leveduras, na sua maioria representantes das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (GARCIA, 2017; BASSO, 2019).

Indubitavelmente, a utilização sistemática e precisa dessas espécies ao longo de anos pela indústria cervejeira elevou os padrões de qualidade e eficiência. Entretanto, tem incorrido na limitação do potencial aromático e sensorial pelo emprego de novas espécies ou linhagens, como *Saccharomyces cerevisiae* selvagens (Steensels & Verstrepen, 2014; Garcia, 2017).

Diante das demandas atuais, o presente trabalho concentra-se na caracterização de leveduras não convencionais com potencial para produção de cervejas de caráter próprio e complexo.

1.1 História da cerveja

A história da cerveja remonta, possivelmente, a pelo menos 9.000 anos, quando o homem pré-histórico abandonou a vida nômade, iniciados os primórdios do que atualmente conhecemos por agricultura. As técnicas de cultivo de grãos como trigo, sorgo e cevada permitiam a obtenção de uma fonte alimentar segura, podendo ser consumida posteriormente, uma vez que eram de simples utilização e de propício armazenamento dos excedentes (Meussdoerffer *et al.*, 2017).

É muito provável que o processo de fabricação da cerveja tenha sido descoberto ao acaso, a partir da fermentação espontânea de cereais ou da própria massa de pão, exposta à água. Inicialmente de responsabilidade feminina, em virtude de a caça ser um papel masculino, a bebida logo se tornou muito apreciada e valorizada pelos povos antigos (Morado, 2009).

Há milhares de anos, as cervejas rudimentares eram obtidas espontaneamente (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a), e, muito provavelmente, a bebida recebeu o caráter divino pelo processo incompreensível de transformação do grão em uma bebida inebriante. Dessa forma, a cerveja ocupou um lugar de importância cultural, social e econômica nas diversas civilizações ao longo do tempo (Romero *et al.*, 2022).

O Império Babilônico, constituído pelos povos que sucederam os sumérios, tinha a cerveja com grande importância social. O “Código de Hamurábi”, escrito por

volta de 2.000 a.C., estabelecia porções diárias da bebida em função da casta do membro social, previa o afogamento do cervejeiro na própria bebida caso ela fosse de má qualidade ou mesmo que o pagamento fosse pela venda de cerveja na forma de grãos de cereais e não diretamente por moedas (Morado, 2009).

No Egito Antigo a cerveja desempenhava um papel fundamental, ocupando lugar preferencial na dieta egípcia. Cerveja e pão eram símbolos de prosperidade, felicidade e satisfação, desempenhando um papel crítico na religião, tanto na decisão sobre a vida eterna quanto no julgamento dos mortos (Meussdoerffer *et al.*, 2017).

Os gregos tiveram contato com a cerveja por meio dos egípcios e, posteriormente, tiveram papel fundamental na propagação da bebida junto aos romanos. Ao contrário do vinho, que depende exclusivamente de uvas, plantio assistido e colheita delicada, a cerveja podia ser obtida a partir de vários cereais, além da cevada, produtos mais facilmente encontrados em territórios conquistados pelo Império. Aos poucos, a cerveja se propagava pelas zonas de influência romana, configurando uma das rotas de expansão da cultura cervejeira pelo mundo antigo.

Inegavelmente, a cerveja era mais popular que o vinho e o hidromel, seja pela facilidade de fabricação, seja por seu caráter socializante. De toda forma, por volta de 500 a.C., os romanos deram preferência ao fermentado de uva como bebida nobre, fazendo com que o vinho fosse cada vez mais prestigiado. A cerveja, dessa forma, começava a ser moldada como bebida das classes mais pobres e dos bárbaros.

Uma segunda e importante rota de disseminação da cerveja a partir da Mesopotâmia pode ser observada graças aos trácios, povos que habitavam territórios que atualmente se situam na Moldávia, Bulgária, Romênia e partes da Grécia, além de Macedônia, Sérvia e Turquia. Muito provavelmente esses povos influenciaram os germânicos e celtas, com subsequente fundação de países como França (Gália), Espanha (Galícia) e Alemanha (Germânia) (Morado, 2009).

Entre os séculos V e XII, a produção de cerveja se passou a ser produzida internamente em conventos, inicialmente como subsistência própria, mas em pouco tempo seu potencial mercante seria explorado, sendo oferecida aos seus hóspedes viajantes temporários (Romero *et al.*, 2022). O lúpulo passa então a ser adicionado à cerveja, perdurando até os dias atuais.

A Lei da Pureza, conhecida como *Reinheitsgebot* foi introduzida na Baviera em 1516 pelo Duque Guilherme IV e surge como um dos primeiros instrumentos de regulação pelo Estado. Seria inevitável, após a crescente demanda cervejeira, que um primeiro contorno da indústria cervejeira na Europa surgisse, atingindo o ponto que houve necessidade de intervenção do Estado (Hornsey, 2003). A *Reinheitsgebot* determinava, dentre vários aspectos, que cerveja deveria ser fabricada mediante o emprego de apenas 3 ingredientes: água, cevada e lúpulo. Somente em 1551, a levedura seria mencionada, pois cervejeiros descobriram que, reutilizando-se a “espuma” ou “decantado” nas produções subsequentes, uma melhor e mais bem controlada fermentação era alcançada (Narziss, 1984).

Uma série de avanços tecnológicos viriam posteriormente fomentar o desenvolvimento da indústria como um todo, inclusive a cervejeira. O emprego, ou mesmo o desenvolvimento intencional de tecnologias no ambiente cervejeiro, contribuíram significativamente para a oferta crescente da bebida, seu padrão de qualidade e uma série de outros impactos nunca antes imaginados.

Em 1765, tinha sido estabelecida a pedra fundamental para novas tecnologias. Em 1846 Gabriel Sedlmayr instalou sua primeira máquina a vapor de 1 cavalo-vapor, em sua cervejaria Spaten, em Munique (Kunze, 1998).

Outro grande marco industrial foi alcançado por Carl von Linde, em 1876, com o desenvolvimento de sua máquina de refrigeração artificial. A partir de então, o homem conquistava sua independência na fabricação da cerveja, não mais restringindo a produção em determinadas estações do ano, ou armazenando gelo natural (neve) em grandes adegas subterrâneas, com intuito de amenizar a temperatura nos ambientes de transformação da bebida (Morado, 2009).

A expansão da rede ferroviária teve, ao mesmo tempo, um grande impacto no desenvolvimento de nações, possibilitando a expansão das grandes cervejarias.

Grandes avanços foram também alcançados quanto à qualidade da cerveja, em especial pelo estabelecimento da chamada microbiologia moderna, por Louis Pasteur (Bamforth, 2009). De maneira genial, Pasteur correlacionou o processo de fermentação à atividade de microrganismos, lançando as bases para controle das fermentações, assim como novos métodos de preservação de alimentos e bebidas (pasteurização).

A influência de contaminações seria cada vez mais reduzida, através do trabalho de Emil Christian Hansen, que em 1883, nos laboratórios da Carlsberg em Copenhague, desenvolveu métodos de cultivo de leveduras, aperfeiçoados por Paul Lindner em 1893. Também nesse contexto, as bases da “cerveja clara” (*Helles*) eram lançadas, seguidas da substituição progressiva da *lager* escura “Cerveja Bávara” (Morado, 2009).

Em 1842 seria obtida, pela primeira vez, na cidade de Pilsen, um novo e revolucionário tipo de cerveja, sendo posteriormente denominado como tipo pilsen. Rapidamente esse novo produto tomaria toda a Europa, avançando em 1875 para novos mercados, como as Américas, com Adolphus Busch, em sua cervejaria Anheuser-Busch. Não demoraria muito para que o novo tipo de cerveja clara e leve conquistasse maior fama, aumentando cada vez mais a demanda por tecnologias que permitissem uma produção nunca praticada, mediante custos decrescentes, além de volumes e qualidade cada vez maiores.

Se por um lado, a utilização de cepas de leveduras domesticadas a partir das técnicas de *Emil Christian Hansen* possibilitou a obtenção de produtos com níveis consistentes de qualidade, por outro, a utilização de linhagens especializadas tem resultado em poucas variações quanto aos *flavors* presentes nas cervejas e na redução da produção de estilos diversos cervejeiros (Meier-Dörnberger *et al.*, 2017a).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é o microrganismo eucarioto mais utilizado em processos fermentativos industriais (Prado *et al.*, 2020). Desde tempos remotos, esse fungo unicelular tem tido sua capacidade de converter açúcar em etanol e diversos aromas explorada com objetivo de se obter alimentos e bebidas de valor agregado consideráveis (Steensels; Verstrepen; 2014).

É um organismo modelo, sendo amplamente utilizado para pesquisas básicas em diversas áreas do conhecimento. Em 1996, a linhagem S288c teve seu genoma completamente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996), trazendo luz à sua constituição de 12.068 kilobases organizadas em 16 cromossomos, responsáveis por aproximadamente 6.000 genes.

Características importantes como tolerância à altas concentrações de açúcar e produção de compostos aromáticos voláteis contribuem para sua aplicação industrial. Em especial, uma habilidade notável é o mecanismo “produção-acumulação-consumo” (Thomson, J. Michael, *et al.*, 2005). É uma levedura *Crabtree* positiva, ou seja, possui a capacidade de produzir etanol mesmo em condições de aerobiose. E como consequência, *S. cerevisiae* produz e acumula etanol no meio, que é tóxico ou agente estático para a maioria de seus possíveis competidores. Após se estabelecer ecologicamente no meio, ela procede ao consumo do etanol como fonte de carbono promovendo seu próprio crescimento, como mostrado no mecanismo descrito na Figura 1.1.

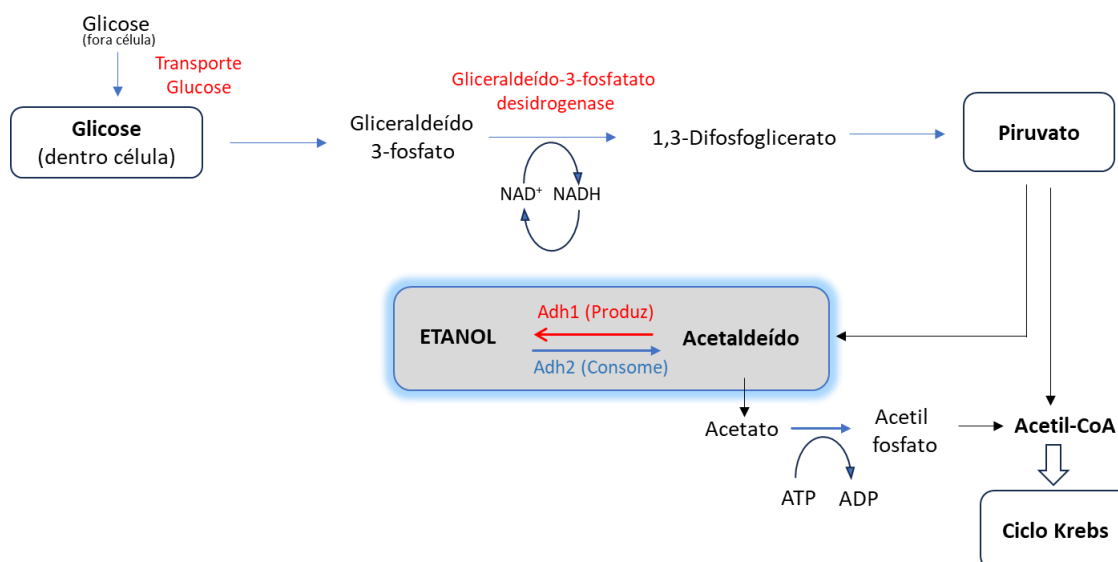


Figura 1.1 Vias metabólicas para fermentação alcoólica e consumo de etanol. Adaptado de Thomson, J. Michael, *et al.*, 2005

As linhagens de leveduras encontradas no meio-ambiente sobrevivem a condições adversas, diferentemente do ambiente de cultivo controlado praticado em laboratório. Essas cepas são, portanto, microrganismos que podem ser encontrados em grande diversidade de ambientes, como em folhas, solos - sob a forma de esporos - ou até dentro do trato digestivo de insetos como espécies de moscas *Drosophila* (Parapouli *et al.*, 2020).

A variedade genética de isolados de *S. cerevisiae* encontrada em ambientes naturais na China descrita por Wang *et al.*, 2012 foi maior do que em ambientes

influenciados ou construídos pelo homem. Muito possivelmente essas linhagens selvagens poderiam demonstrar propriedades interessantes de grande potencial biotecnológico. É sabido, todavia que, diversidade genética não necessariamente corresponde à diversidade fenotípica, o que torna sua aplicação uma tarefa difícil (Parapouli *et al.*, 2020).

Dentre diversas espécies utilizadas no processo cervejeiro, *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida como levedura de alta fermentação ou *ale*, ao passo que a espécie *Saccharomyces pastorianus* é responsável pela obtenção das cervejas de baixa fermentação ou *lagers* (Romero *et al.*, 2022).

A Tabela 1.1 mostra as diferenças típicas entre linhagens de leveduras *ale* e *lager*. Resumidamente, leveduras do tipo *ale* são empregadas preferencialmente entre 18 e 24 °C e não possuem capacidade de metabolizar . Ao passo que, cepas de *S. pastorianus* são utilizadas entre 8 e 15 °C e são providas do gene MEL1, que codifica para melibiase, tornando possível a assimilação do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose), constituindo uma metodologia frequente na diferenciação desses tipos de microrganismos (Andrion, 2022; Basso, 2019; Stewart, 2016).

Tabela 1.1 Características fisiológicas de linhagens tipo *ale* e *lager*

Linhagens <i>ale</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Faixa de temperatura típica de fermentação: 18 a 25 °C
Temperatura máxima para crescimento: 37 °C ou superior
Não fermenta melibiose
Alta fermentação
Linhagens <i>lager</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>
Faixa de temperatura típica de fermentação: 8 a 15 °C
Temperatura máxima para crescimento: 34 °C
Fermenta melibiose
Baixa fermentação

Fonte: Stewart, 2016

Apesar do uso de culturas puras ter sido estabelecido somente no século XIX por *Pasteur* e *Hansen*, padeiros, cervejeiros e produtores de vinhos já entendiam que, inocular uma nova produção com uma pequena porção do alimento fermentado

proporcionava melhores resultados, com previsibilidade e rapidez. Essa prática conhecida como “*backslipping*”, muito provavelmente, proporcionou que diversas linhagens de leveduras perdessem contato com o ambiente externo, constituindo um cenário ideal para a domesticação desses microrganismos (Gallone *et al.*, 2006).

1.3 Leveduras empregadas para produção cervejeira

Dentre mais de 1.500 espécies descritas atualmente, as leveduras de maior relevância empregadas nos processos industriais pertencem ao gênero *Saccharomyces*, taxonomicamente agrupadas em um clado denominado *Saccharomyces sensu stricto* (Boreman; Pretorius; 2015). Dentro desse grupo, as espécies *Saccharomyces uvarum* e *S. eubayanus* posicionam-se na base da árvore filogenética, enquanto as espécies *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* são as mais recentes (Figura 1.2).

Ainda pertencentes a esse clado, a espécie *S. cerevisiae* é responsável pela fermentação de cervejas do tipo *ale*, e empregada na obtenção de vinhos, destilados, saque, bioetanol entre outros produtos fermentados. A espécie *S. bayanus* tem sido utilizada na produção de vinhos, sidra, vinhos de maçã, enquanto *S. pastorianus* e suas diversas linhagens são responsáveis por mais de 90% da produção mundial de cerveja industrial, graças a seu perfil aromático “limpo”, ou seja, baixas concentrações de ésteres e aromas frutados, relacionado às suas baixas temperaturas de fermentação (Romero *et al.*, 2022; Meier-Dörnberg *et al.*, 2017b).

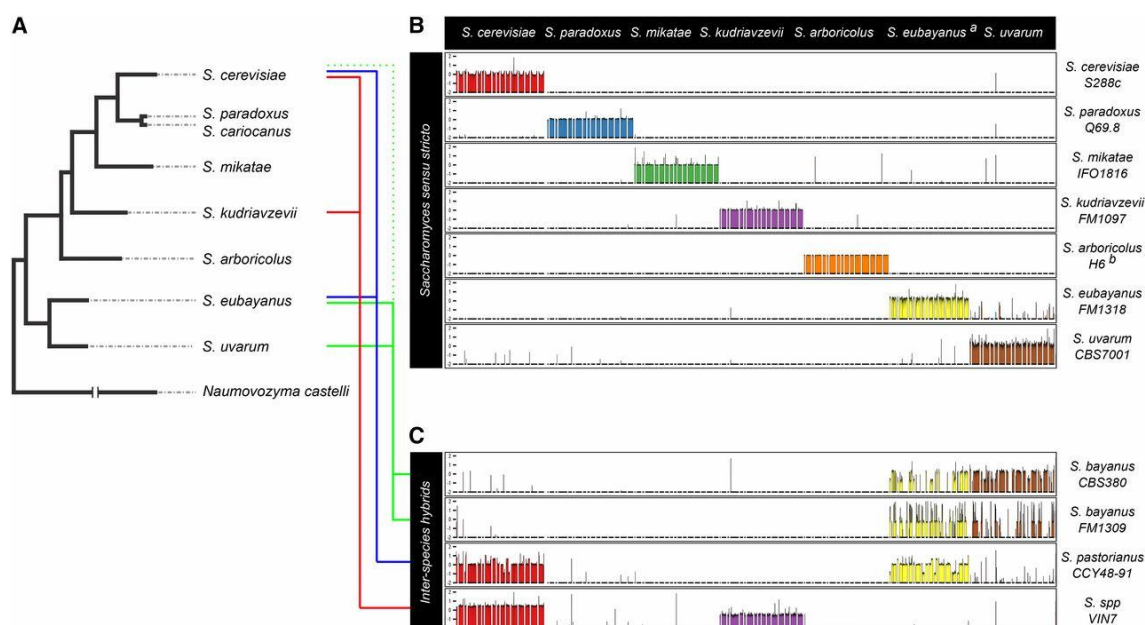


Figura 1.2 Representação do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. **A** Estrutura filogenética; **B** Representação genômica; **C** Representação genômica dos híbridos interespecíficos. Fonte: Boreman; Petrorius, 2015.

A utilização de linhagens de *Saccharomyces* para a condução de fermentações controladas tem se justificado devido a três motivos principais: (i) produção eficiente de elevados níveis de etanol; (ii) predominância da via metabólica da fermentação combinada com o efeito *Crabtree* positivo, ou seja, repressão da respiração pela glicose e (iii) elevada resistência ao etanol e outras condições de estresse do meio (Steensels; Verstrepen, 2014; Basso *et al.*, 2016).

1.4 Bioquímica da fermentação

Fermentação é o processo por meio do qual açúcares são convertidos pela levedura em álcool, gás carbônico e calor (Oliver, 2012).

Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é uma rota metabólica por meio da qual açúcares fermentescíveis são decompostos biologicamente, em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcares, resultando na produção de energia, ou ATP (adenosina trifosfato) (Voet, *et al.*, 2000).

O processo catabólico da fermentação se inicia pela via glicolítica, onde cada molécula de glicose é decomposta em 2 moléculas de piruvato, no citoplasma celular. Posteriormente, o piruvato, sob ação da enzima piruvato descarboxilase, resulta na formação de acetaldeído e gás carbônico (CO₂), conforme anteriormente visto na Figura

1.1. A molécula de acetaldeído é, então, reduzida a etanol pela enzima álcool desidrogenase, reconstituindo a molécula de NAD^+ (Voet et al., 2000; Andrion, 2022). A reconstituição da molécula de NAD^+ é o que garante a continuidade da via glicolítica, mediante manutenção do equilíbrio redox celular (Briggs, 2004).

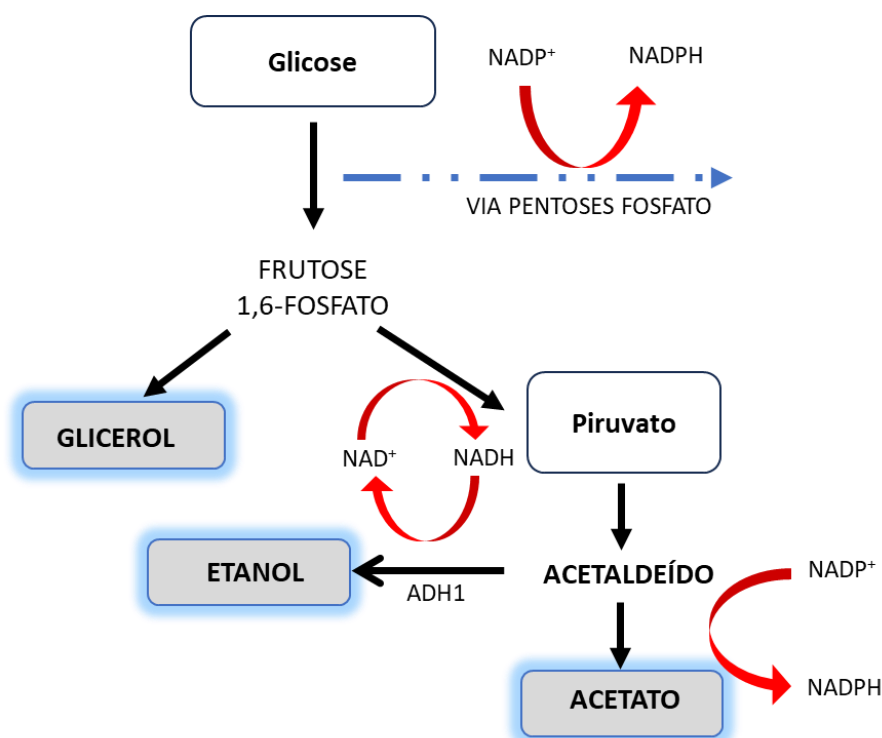


Figura 1.3 Principais vias metabólicas e desvios de rotas durante consumo de glicose para produção de etanol. Fonte: Tilloy *et al.*, 2015

Conforme Figura 1.4, diversos compostos aromáticos são produzidos mediante rotas do metabolismo secundário, isto é, por meio de diversas reações bioquímicas dispensáveis ao crescimento celular. Muitos desses metabólitos são formados como resposta às condições de estresse do meio, mecanismos de adaptação ou ainda como moléculas reguladoras em algumas rotas bioquímicas (Siddiqui *et al.*, 2012; Walker & Stewart, 2016; Garcia, 2017). A presença desses compostos contribui decisivamente para a qualidade sensorial da cerveja como apresentado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Metabólitos secundários da fermentação alcoólica

Classe de metabólito	Exemplo	Descrição
Álcoois superiores	Álcool isoamílico, Álcool fenetílico, Isopropanol	Os álcoois superiores podem conferir aromas desejáveis a bebidas, até determinadas concentrações
Ésteres	Acetato de etila	Correspondem a aromas e sabores frutados
Compostos com carbonila	Acetaldeído	Conferem aroma de gramíneo ou de maçã verde, apesar de serem pós-assimilados na fase de maturação da cerveja
Ácidos orgânicos	Ácido succínico, Ácido cítrico, Ácido acético	Podem contribuir positivamente para adstringência do produto
Polióis	Glicerol	Produzidos normalmente pelo metabolismo da levedura ou em condições de estresse osmótico. Contribui para viscosidade do fermentado
Dicetonas vicinais	Diacetil, 2,3-Pentanodiona	Diacetil é indesejável na maioria das cervejas, conferindo aroma de “manteiga rançosa”. Pode ser pós-assimilado durante o condicionamento da cerveja
Compostos sulfurosos	Sulfeto de hidrogênio, Dimetilsulfureto, Anidrido sulfuroso, Tióis	compostos importantes para aroma e sabor de cervejas. DMS pode ser desejável em baixas concentrações em <i>Lagers</i> . Em altas concentrações correspondem a <i>off flavors</i> .
Compostos fenólicos	4-Vinilguaicol (4-VG)	Algumas leveduras possuem a capacidade de descarboxilar o ácido ferúlico a 4-VG, chamadas POF ⁺ (<i>phenolic off flavor</i>). Em poucos estilos (cervejas de trigo alemãs, por exemplo) são desejáveis

Fonte: Adaptado de Walker & Stewart (2016)

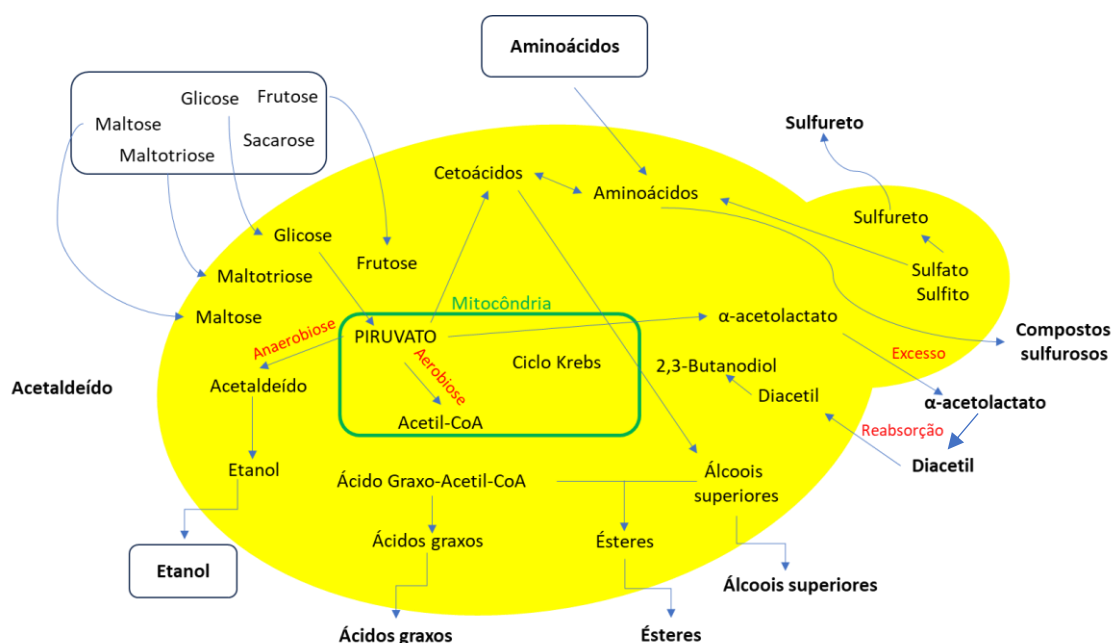


Figura 1.4 Adaptado de He *et al.*, 2014

Ácidos orgânicos

A composição dos ácidos orgânicos da cerveja deve-se a uma menor fração presente no próprio mosto cervejeiro, derivados do malte, além de uma parcela significativa produzida durante a fermentação pela levedura. Entre outros, são encontrados o ácido acético, láctico, butírico e succínico (White; Zainasheff, 2010; Garcia, 2017).

Algumas rotas metabólicas estão associadas à produção de ácidos orgânicos, sendo característicos como consequência da repressão da respiração em leveduras *Crabtree* positivas (Briggs *et al.*, 2004; Walker & Stewart, 2016). Esses compostos, além de conferir *flavor* ao produto acabado, promovem a diminuição do pH, contribuindo para parte estabilidade microbológica da cerveja (Briggs *et al.*, 2004).

Álcoois superiores

São compostos aromáticos com grande participação no sabor e aroma da cerveja, provenientes do metabolismo de aminoácidos em rotas anabólicas e catabólicas (Michel *et al.*, 2016b). Durante a fermentação em meio com excedente de aminoácidos, a rota denominada *Ehrlich* (Figura 1.5) acontecerá, na qual diversas reações catabólicas culminarão na transaminação e descarboxilação desses substratos

e na formação de intermediários alfa-ceto-ácidos que, finalmente, serão convertidos a álcoois superiores. Por outro lado, meios fermentativos carentes em aminoácidos terão a rota anabólica ativada, alcançando a biossíntese de aminoácidos, contudo também a geração consequente de álcoois superiores a partir de intermediários de alfa-ceto-ácidos (Walker & Stewart, 2016).

A Figura 1.5 esquematiza a via metabólica de *Ehrlich*:

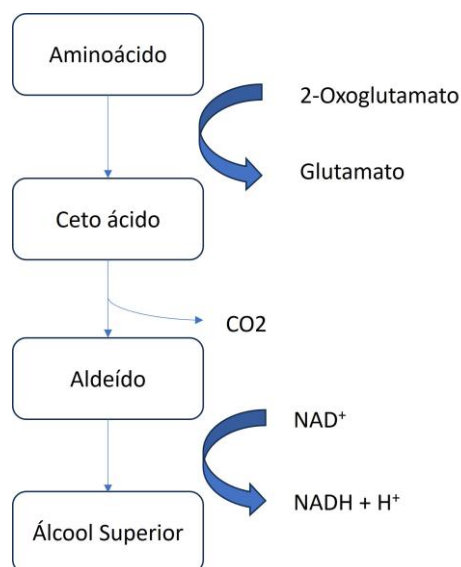


Figura 1.5 Metabolismo celular resultando na formação de álcoois superiores Adaptado de Garcia 2017

Vale ainda ressaltar que, apesar de diversas fontes de nitrogênio estarem presentes no mosto cervejeiro, a levedura cerveja consegue absorver somente as moléculas menores, genericamente chamada de *Free Amino Nitrogen* (FAN). Dessa forma, parte do aroma final da cerveja é inevitavelmente devido à absorção dessas fontes de nitrogênio e sua transformação pelo fermento cervejeiro (Pires *et al.*, 2014).

A Tabela 1.3 resume os valores para concentrações de limiares de reconhecimento (*Threshold*) para importantes álcoois superiores e ésteres presentes em cervejas de baixa fermentação:

Tabela 1.3 Limiar de percepção, Faixa de concentração e Impressão aromática para álcoois superiores e ésteres

Composto	Limiar de detecção (mg L ⁻¹)	Faixa de concentração (mg L ⁻¹)	Impressão aromática
Acetato de etila	25 - 30	8 – 32	Frutado, solvente
Acetato de isoamila	1,2 - 2	0,3 – 3,8	Banana
Acetato de Fenetila	0,2 – 3,8	0,1 – 0,73	Rosas, Mel
Hexanoato de etila	0,2 – 0,23	0,05 – 0,21	Maçã, frutado
Octanoato de etila	0,9 – 1,0	0,04 – 0,53	Maçã, anis
<i>n</i> -Propanol	600	4 – 17	Alcólico, Doce
Isobutanol	100	4 – 57	Solvente
Álcool Isoamílico	50 -65	25 -123	Alcólico, Banana
Álcool Amílico	50 -70	7 – 34	Alcólico, Solvente
2-Feniletanol	40	5 – 102	Rosas

Fonte: Pires *et al.*, 2014

Aldeídos

Os aldeídos são formados em diversas etapas da produção cervejeira, como nas etapas de preparação do mosto e de fermentação propriamente dita, quando a levedura metaboliza diversos tipos de aminoácidos.

Acetaldeído é o principal aldeído encontrado na cerveja, um intermediário da produção de etanol e do ácido acético (Garcia, 2017). Durante a glicólise, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase. Posteriormente, a enzima álcool desidrogenase o converte a etanol, mediante zinco como cofator (Basso, 2019).

Esses compostos contribuem, rotineiramente, de forma negativa para o perfil sensorial da cerveja, o que justifica controles e cuidados durante a fase de fermentação do mosto cervejeiro (Briggs *et al.*, 2004). Concentrações acima de 25 mg/l são perceptíveis sensorialmente, descritos como “maça verde” ou “gramíneo”. Esses *off flavors* constituem aromas indesejáveis e passíveis de eliminação durante a fase de

maduração da cerveja (Olarinan *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2021)

Compostos fenólicos

De maneira geral, leveduras empregadas para produção de bebidas alcóolicas não devem produzir compostos aromáticos indesejáveis. Apesar de aromas fenólicos produzidos pelo metabolismo de certas leveduras (*phenolic off flavors*) serem aceitos em estilos de cervejas como as belgas de abadia e as cervejas de trigo alemãs, a presença de componentes como o 4-vinilguaiacol (4-VG), na maioria das cervejas, confere à bebida sabores e aromas que remetem a cravo, defumado ou condimentado, todas características indesejáveis (Gallone *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016b).

A produção de 4-VG é controlada por 2 genes, a saber, PAD1 (*Phenylacrylic Acid Decarboxylase*) e FDC1 (*Ferulic Acid Decarboxylase*). Esses genes são geralmente conservados nas leveduras selvagens ou naquelas empregadas nos setores do bioetanol e da panificação. Por outro lado, as cepas industriais utilizadas na fabricação de cerveja não apresentam, em sua enorme maioria, a capacidade de produção de 4-VG (Gallone *et al.*, 2016).

Ésteres

Os ésteres constituem o grupo de moléculas de grande contribuição para as características de aroma e sabor para a cerveja. Sua presença confere à bebida notas frutadas e florais, com nuances percebidas como banana, anis, maçã, anis e solvente (He *et al.*, 2014).

Esses compostos são constituídos intracelularmente mediante reações de condensação mediadas por enzimas entre grupos de ácidos orgânicos e álcoois superiores (Nordström, 1964; Verstrep, *et al.*, 2003). Duas enzimas regulam o balanço líquido de ésteres no meio fermentativo, as Álcool Acetil Transferase (AATase) e as Acyl-CoA Etanol O-acyltransferase (AEATases), envolvidas, respectivamente na produção de ésteres de acetato e na produção e hidrólise de ésteres de etila (He *et al.*, 2014).

Dentre os fatores que influenciam a formação de ésteres estão a composição do mosto, a cepa utilizada e as condições do processo (temperatura, pressão etc.). Enquanto mostos com elevada concentração em açúcar proporcionam a obtenção de

cervejas com elevados teores de ésteres de acetato (Meilgaard, 2001), a presença de oxigênio no meio ou pressões de coluna elevadas (mega fermentadores) reduzem a atividade de enzimas relacionadas à formação de ésteres.

Dicetonas vicinais

As principais dicetonas vicinais encontradas na cerveja são o diacetil (2,3-butanodiona) e 2,3-pentanodiona. Esses compostos conferem notas “amanteigadas” e de “mel” à bebida (Basso, 2019). Diferentemente dos ésteres e álcoois superiores, as dicetonas são considerados *off flavor* para maioria das cervejas.

Durante a fermentação, os aminoácidos valina e isoleucina podem ser sintetizados, com a formação de intermediários como α -acetolactato e α -acetohidroxitirato, respectivamente. Esses precursores, ao serem excretados para o meio, podem ser oxidados espontaneamente a diacetil e 2,3-pentanodiona, sendo passíveis de assimilação pela levedura (Bamforth and Kanauchi, 2012; Basso, 2019).

Apesar de sua percepção sensorial depender em grande parte das características da cerveja, esses compostos apresentam valores de limiar de detecção (*threshold*) relativamente baixos, em torno de 0,1 mg/l para cervejas tipo *lager*.

Compostos sulfurosos

Constituem uma classe de compostos aromáticos importante para as características sensoriais da cerveja, frequentemente indesejáveis, se determinados limites são ultrapassados. “Vegetal cozido”, “ovo podre” e “fósforo queimado” são algumas das percepções descritas correspondentes aos *off flavors* que surgem na bebida quando concentrações limites são ultrapassadas. Por isso, é de grande importância que o cervejeiro tenha domínio dos fatores envolvidos em seus surgimentos no meio fermentativo (Basso, 2019).

Significativamente, Dimetil sulfureto (DMS) é formado pela degradação térmica do precursor S-metil-metionina (SMM) presente no mosto cervejeiro, na fase quente da obtenção do mosto de cevada, especificamente nas etapas de fervura e decantação (*whirlpool*). Conduto, algumas linhagens de leveduras têm a capacidade de reduzir Dimetilsulfóxido (DMSO) a DMS (Bokulich & Bamforth, 2013). Concentrações reduzidas

de DMS são desejáveis pela contribuição do caráter de algumas *lagers* como o estilo Bohemian Pilsner, sendo, todavia, indesejáveis para a grande maioria dos demais estilos.

Dióxido de enxofre (SO₂) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) são os principais compostos produzidos pela levedura durante a fermentação (Michel *et al.*, 2016b). Estudos correlacionaram a produção dessas substâncias ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos (metionina e cisteína), com a utilização de enxofre inorgânicos e diversas fontes de nitrogênio (Basso, 2019; Swiegers & Pretorius, 2007). Em meios com deficiência de nitrogênio, foi observado acúmulo de H₂S no interior celular e posterior secreção para o meio externo.

1.5 Caracterização molecular de leveduras

Nas últimas décadas, as técnicas para caracterização de leveduras têm se aprimorado rapidamente, permitindo maior assertividade, agilidade e custos reduzidos. Métodos baseados no cultivo de microrganismos foram amplamente utilizados para caracterização de culturas, a partir de aspectos morfológicos como formato e coloração de colônias, além de aspectos bioquímicos e fisiológicos. Essas técnicas, porém, têm dado cada vez mais espaço para métodos moleculares, possibilitadas por avanços tecnológicos recentes, permitindo maior especificidade e menores tempos empregados (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

No tocante à compreensão das relações entre microrganismos e seus processos evolutivos, a classificação filogenética é de grande importância. Partindo-se do sequenciamento de regiões do DNA que contém o gene que codifica para o RNA ribossômico, softwares são utilizados para o alinhamento de sequências nucleotídicas, estimando-se melhores modelos de substituição de nucleotídeos e, por fim, inferindo-se nas relações filogenéticas de máxima verossimilhança (Nunes, 2020; Kurtzman, 2011).

Durante a condução de processos biotecnológicos e fermentativos, diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas com objetivo de se identificar as linhagens responsáveis presentes nesses meios. A técnica da cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido utilizada para diferenciação e caracterização de leveduras *Saccharomyces* spp a partir da análise do perfil de banda dos cromossomos

(Basso *et al.*, 2019). Carvalho-Netto *et al.* (2013) monitoraram populações de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de bioetanol através do estabelecimento de um conjunto de 4 marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da Polimerase (PCR). Através dessa técnica, padrões de bandas obtidos em gel de agarose revelaram diversos polimorfismos de inserções e/ou deleções acima de 24 pb, que serviram como poderoso instrumento de discriminação entre cepas. Foi também demonstrado que os marcadores propostos se adequaram, de igual forma, para linhagens diferentes das empregadas na produção de bioetanol, sugerindo que poderiam ser utilizados para *Saccharomyces cerevisiae* em geral.

Entretanto, a técnica mais amplamente utilizada para identificação de leveduras baseia-se na sequência do gene do RNA ribossômico nuclear, que é composto pelos genes 18S, 5.8S e 25S, transcritos em uma unidade de RNA polimerase I. Especificamente, a região espaçadora ITS (*Internal transcribed spacer*), que contém o gene para 5.8S e os espaçadores ITS1 e ITS2, é tida como a região mais discriminatória para espécies do reino *Fungi*. Na técnica descrita por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999), oligonucleotídeos iniciadores (ITS-1 e ITS-4), que flanqueiam as regiões polimórficas ITS1 e ITS2, são empregados para a identificação de diferentes espécies de leveduras (Fonseca, 2019; Prado, 2020; Andrion, 2022).

A Figura 1.6 mostra uma exemplificação da estrutura do gene do rRNA e suas subunidades, além de regiões espaçadoras.

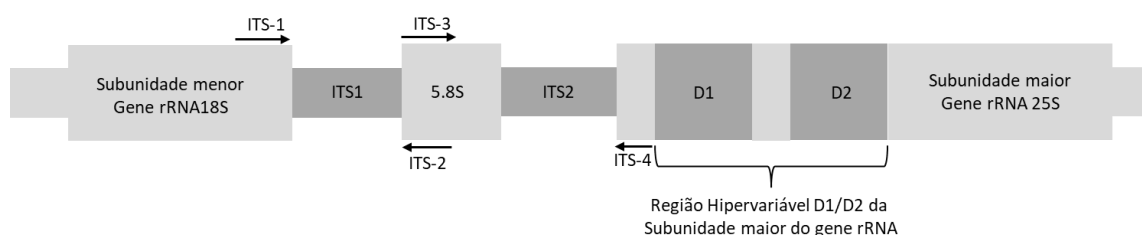


Figura 1.6 Diagrama do complexo gênico ribossômico (não em escala). Estrutura contempla: sequência codificadora para subunidade menor rRNA18S, região espaçadora interna 1 (ITS1), região codificadora para subunidade 5.8S, região espaçadora interna 2 (ITS2) e sequência codificadora para subunidade ribossômica 26S. As setas indicam regiões aproximadas de ancoragem dos primers específicos. **Fonte:** Adaptado de Arbefeville *et al.* (2017); Fonseca (2019)

1.6 Estilos de Cervejas

A definição de estilos de cerveja é de grande importância e está intimamente relacionada aos tipos de matérias-primas utilizados, às variedades de leveduras, aos hábitos culturais e à evolução tecnológica (BJCP, 2021).

A classificação de cervejas em estilos cervejeiros auxilia, paralelamente, no desenvolvimento de novos produtos e receitas. Diversos guias de cervejas têm organizado tipos diversos de cervejas segundo as matérias-primas empregadas, suas características sensoriais (aparência, sabor, aroma, sensação na boca), características físico-químicas (densidade original, final, cor, amargor, teor alcoólico etc.), além de técnicas tecnológicas empregadas na obtenção da bebida, como faixas de temperatura, pressões e outros parâmetros (Andrion, 2022).

Os estilos cervejeiros encontram-se em evolução constante, uma vez que as técnicas de produção, os costumes e mesmo a percepção do consumidor sofrem mutações continuamente (Garcia, 2017).

As leveduras utilizadas para produção de bebidas alcóolicas preferencialmente não deveriam produzir aromas indesejáveis (Gallone *et al.*, 2016). Se, por um lado, algumas características fenotípicas poderiam representar sabores e aromas indesejáveis em determinados tipos de cervejas (*off flavors*), por outro, esses mesmos fenótipos poderiam corresponder a *flavors* de interesse (*on flavors*), elevando a qualidade da cerveja (Romero *et al.*, 2022).

Com exceção de alguns tipos de cervejas belgas e as cervejas de trigo alemãs (*Weizenbiers*), 4-Vinilguaiacol (4-VG) é um composto indesejável, portanto, um *off flavor* para a grande maioria dos estilos de cerveja (Bellut *et al.*, 2018). A Figura 1.7 mostra a perda da capacidade de produção do 4-VG (responsável por aromas fenólicos ou condimentados) em várias linhagens de leveduras industriais, enquanto tiveram sua conservação em cepas selvagens, naquelas empregadas na produção de bioetanol e na indústria da panificação (Gallone *et al.*, 2016).

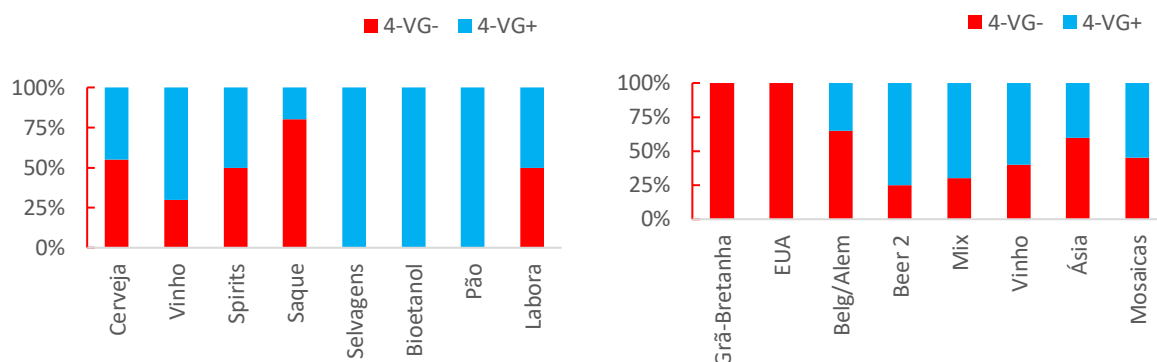


Figura 1.7 Frequência do fenótipo produção de 4-Vinil-Guaiacol observado em leveduras em diversos ramos da indústria e por região de origem. Adaptado de Gallone (2016)

Em 1985, surgiu nos Estados Unidos o BJCP (*Beer Judge Certification Program*), uma organização sem fins lucrativos fundada durante a *American Homebrewers Association Annual Conference*, objetivando certificar críticos e avaliadores de cerveja. Logo, o BJCP se tornou uma das certificações mais aceitas no mundo cervejeiro (Morado, 2009).

Uma primeira e importante categorização de cervejas é proposta em função do processo de fermentação. Segundo o BJCP (2021), cervejeiros americanos dos variados níveis consideram *ales* quando as cervejas usam leveduras de alta fermentação e *lagers* se as cervejas empregam leveduras de baixa fermentação. Um terceiro grupo de cervejas possui fermentação “natural” ou “espontânea”.

Essa classificação tem uma série de implicações, mas possui a vantagem de ser prática. Dessa forma, as famílias de cervejas podem ser descritas:

Família Ale – cervejas que utilizam *Saccharomyces cerevisiae*, de alta fermentação, fermentam preferencialmente de 14 a 25 °C, apresentam caráter aromático intenso devido a ésteres e outros produtos aromáticos da fermentação.

Família Lager – cervejas que utilizam *Saccharomyces pastorianus*, de baixa fermentação, possuem perfil sensorial proveniente das matérias-primas, fermentam entre 6 e 16 °C.

Família de fermentação espontânea – cervejas que têm fermentação conduzida por gêneros diferentes da *Saccharomyces* domesticados, chamadas de

leveduras selvagens, bactérias lácticas e acéticas presentes no ar ambiente. Maturam muitas vezes em barris de madeira em várias faixas de temperatura.

As Tabelas 1.4, 1.5, 1.6 e 1.7, a seguir, resumem as características de aproximadamente 85 estilos. Uma linha foi traçada permeando os vários tipos de cervejas similares, resultando em 4 blocos de estilos.

EUROPEAN LAGER / EUROPEAN BEER / CZECH LAGER / GERMAN WHEAT BEER

Uma característica muito marcante nesse bloco é a fidelidade à Lei da Pureza de 1516. Apesar de encontrarmos aqui muitos estilos fabricados com leveduras de alta fermentação, boa parte da “leveza” e elegância vem das *Lagers*. Geralmente de cultura marcantes, países como Alemanha, República Tcheca e Áustria possuem tipicamente milhares de fábricas relativamente pequenas, tradicionais e fiéis aos processos clássicos de fabricação.

Tabela 1.4 *European Lager* e outros

CZECH LAGER	Czech Pale Lager	PALE BITTER EUROPEAN BEER	German Leichtbier
	Czech Premium Pale Lager		Kölsch
	Czech Amber Lager		German Helles Exportbier
	Czech Dark Lager		German Pils
PALE MALTY EUROPEAN LAGER	Munich Helles	AMBER MALTY EUROPEAN LAGER	Märzen
	Festbier		Rauchbier
	Helles Bock		Dunkles Bock
AMBER MALTY EUROPEAN LAGER	Vienna Lager	DARK EUROPEAN LAGER	Munich Dunkel
	Altbier		Schwarzbier
	Kellerbier		
	Kellerbier Pale + Amber		
STRONG EUROPEAN BEER	Doppelbock	GERMAN WHEAT BEER	Weissbier
	Eisbock		Dunkles Weissbier
	Baltic Porter		Weizenbock

Fonte: BJCP, 2015

BRITISH BEER / PALE BEER / BROWN BRITISH BEER / IRISH BEER / STRONG ALE

Esse conjunto de estilos britânicos, escoceses e irlandeses se caracterizam pelo equilíbrio entre técnicas produtivas, fermento e maltes. Aqui as cervejas são ligeiramente menos carbonatadas, com espumas discretas. Há uma tradição secular de se apreciar as cervejas em *pubs* tradicionais diretamente de barris. A força da cerveja varia desde muito leves até *stouts* encorpadas, aromáticas e alcoólicas.

Tabela 1.5 *British Beer* e outros

BRITISH BEER	Ordinary Bitter	IRISH BEER	Irish Red Ale
	Best Bitter		Irish Stout
	Strong Bitter		Irish Extra Stout
PALE COMMONWEALTH BEER	British Golden Ale	DARK BRITISH BEER	Sweet Stout
	Australian Sparkling Ale		Oatmeal Stout
	English IPA		Tropical Stout
			Foreign Extra Stout
BROWN BRITISH BEER	Dark Mild	STRONG BRITISH ALE	British Strong Ale
	British Brown Ale		Old Ale
	English Porter		Wee Heavy
			English Barleywine
SCOTTISH ALE	Scottish Light		
	Scottish Heavy		
	Scottish Export		

Fonte: BJCP, 2015

EUROPEAN SOUR ALE / BELGIAN ALE / STRONG BELGIAN ALE / TRAPPIST ALE

Uma característica marcante desse bloco, oposto ao bloco alemão, é nunca ter uma lei de pureza, pelo contrário, a utilização de diversas especiarias e açúcares são tradição. Outra marca constante é o “descompromisso” com as caracterizações de estilos, faixas predeterminadas de especificações etc. Para maioria absoluta desses estilos, as impressões sensoriais advêm do metabolismo do fermento cervejeiro.

Tabela 1.6 *European Sour Ale* e outros

EUROPEAN SOUR ALE	Berliner Weisse	STRONG BELGIAN ALE	Belgian Blond Ale
	Flanders Red Ale		Saison
	Oud Bruin		Belgian Golden Strong Ale
	Lambic / Fruit Lambic		
	Gueuze		
BELGIAN ALE	Witbier	TRAPPIST ALE	Trappist Single
	Belgian Pale Ale		Belgian Dubbel
	Bière de Garde		Belgia Tripel
			Belgian Dark Strong Ale

Fonte: BJCP, 2015

STANDARD AMERICAN BEER / LAGER / STRONG ALE / PALE ALE / AMBER AND BROWN / AMERICAN PORTER AND STOUT / AMERICAN IPA / FRUIT BEER

Bloco de estilos geralmente com exageros na utilização de aromas, potência alcoólica e lúpulos. Estilos ingleses ou belgas interpretados de forma majestosa, com ingredientes americanos, alcançando resultados característicos com personalidade.

Tabela 1.7 *Standard American Beer* e outros

STANDARD AMERICAN BEER	American Light Lager	AMERICAN PORTER AND SOUT	American Porter
	American Lager		American Stout
	Cream Ale		Imperial Stout
	American Wheat Beer		
INTERNATIONAL LAGER	International Pale Lager	IPA	American IPA
	International Amber Lager		Specialty IPA
	International Dark Lager		Specialty (...)
PALE AMERICAN ALE	Blonde Ale	STRONG AMERICAN ALE	Double IPA
	American Pale Ale		American Strong Ale
			American Barleywine
			Wheatwine
AMBER AND BROWN AMERICAN BEER	American Amber Ale		
	California Common		
	American Brown Ale		

Fonte: BJCP, 2015

O isolamento e caracterização de novas linhagens para utilização no processo cervejeiro é uma oportunidade valiosa para criação de novos sabores, aromas e estilos de cervejas. De maneira estratégica, novas cepas podem ser combinadas com matérias-primas, técnicas de produção ou até mesmo entre si, otimizando os numerosos fenótipos disponíveis para alcance de produtos personalizados e de interesse industrial.

1.7 Justificativas

A mudança no padrão atual de consumo da cerveja tem direcionado a indústria na busca de inovações que passam pela utilização de novas combinações de matérias-

primas, pela adoção de novas técnicas de fabricação ou ainda pela busca de novas espécies e linhagens de leveduras que possam potencializar os aromas e a qualidade sensorial do produto final.

Desde 2010, o Grupo de Pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da UFSCar vem isolando, selecionando e evoluindo linhagens originárias da indústria do bioetanol e da indústria vinícola regional. Tais pesquisas têm gerado conhecimento acerca da natureza genética e fenotípica dessa biodiversidade brasileira. Esse conhecimento tem demandado, paralelamente, abordagens tecnológicas que permitam transformar seu potencial comercial em aplicações para indústria de bebidas.

O presente trabalho justifica-se pela necessidade de caracterizações genéticas e fisiológicas direcionadas por *drivers* tecnológicos como cinética fermentativa, atenuação aparente, desenvolvimento aromático, e outros, fundamentais para a aplicação comercial de linhagens de potencial biotecnológico. Concomitantemente, objetiva-se o desenvolvimento um modelo de *scale up*, que constitui um avanço importante na linha de pesquisa do DGE/UFSCar.

1.8 Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as características genéticas e fisiológicas de cinco linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*, quanto ao potencial para condução de processos de fermentação de cerveja.

Dentre as linhagens investigadas nesse trabalho, a primeira é intitulada “LBGA-01”, proveniente de estudos prévios realizados durante mestrado do aluno Jonas Paulino de Souza (Souza, 2018) e durante doutorado do aluno Cleiton Dias do Prado (Prado, 2022); as segunda e terceira linhagens, designadas “287” e “288” são oriundas de estudos realizados durante o mestrado do aluno Gustavo Lorca Mandujano (Lorca Mandujano, 2018); a quarta cepa denominada “Hv8” foi isolada em ambiente de produção de vinho, durante o mestrado da aluna Hosana Ribeiro de Novaes (Novaes, 2022) e uma quinta linhagem obtida por técnicas de hibridização entre as linhagens S288C e “287”, fruto da cooperação com o Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do IB-UNICAMP.

1.8.1 Objetivos gerais

Avaliar características genéticas e fisiológicas de cinco linhagens oriundas de ambientes de fabricação de vinho e bioetanol. Desenvolver um *scale up* com a linhagem de maior potencial para aplicação em processo industrial de fermentação de cerveja.

1.8.2 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram propostos para superação dos objetivos gerais:

- Testes de crescimento em meios líquidos contendo glicose, maltose e extrato de malte;
- Avaliação do metabolismo das cepas investigadas quanto à assimilação de fontes de nitrogênio disponíveis (*Free Amino Nitrogen* - FAN);
- Avaliação do metabolismo das cepas quanto à assimilação dos principais açúcares do mosto cervejeiro (maltose e maltotriose) mediante técnica de HPLC;
- Ensaios para caracterização da formação de espuma e floculação das cepas de interesse;
- Avaliação de crescimento celular mediante presença de agentes estressores como etanol, resina de lúpulo (iso- α -ácidos);
- Avaliação da cinética fermentativa e determinação do grau de atenuação aparente durante fermentação do mosto cervejeiro;
- Avaliação por PCR em tempo real (qPCR) da expressão gênica relativa de rotas bioquímicas determinantes envolvidas com transporte de açúcares, fermentação, metabolismo e condições de estresse;
- Obtenção e avaliação sensorial de cervejas, mediante aplicação de teste sensorial descritivo e triangular;
- Estabelecimento de mix de fermentos para personalização de cervejas, mediante otimização na obtenção de subprodutos de interesse;

- Promoção de *scale up* industrial com obtenção de cervejas com potencial comercial

2. Capítulo 2 – Materiais e Métodos

O desenvolvimento do projeto se deu no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Das várias áreas de estudo do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada foram tomados isolados de leveduras que passaram por *screenings* para *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1 Isolados de leveduras

Inicialmente, seis diferentes isolados de leveduras foram obtidos como amostras em glicerol a -80 °C, provenientes do banco de leveduras do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA).

Posteriormente, uma sétima cultura foi adicionada ao conjunto analisado, obtida por técnicas de hibridização pelo grupo de estudo de leveduras do LBGA (Hb1). As leveduras comerciais S 04[®] e WB 06[®] *Fermentis* foram utilizadas como controle de crescimento, de fermentação e nos testes sensoriais (*Phenolic Off Flavor* - POF). *Candida albicans* foi utilizada como controle negativo para *Saccharomyces*.

A Tabela 2.1 mostra as identificações e origens dos isolados de leveduras, assim tratados até que confirmações pudessem ser obtidas acerca das diferentes espécies ou linhagens. Uma linhagem foi considerada única mediante sua diferenciação genética e/ou fisiológica (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a).

Tabela 2.1 Culturas de leveduras e suas origens

Cultura	Origem	Linha pesquisa do LBGA – UFSCar
LBGA01	Usina de Açúcar e Álcool - SP	Termotolerantes / biocombustível
Hv5	Vinícola Terrassos – Amparo SP	Alimentos / vinícola
Hv6	Vinícola Terrassos – Amparo SP	Alimentos / vinícola
Hv8	Vinícola Terrssos – Amparo SP	Alimentos / vinícola
287	Usina de Açúcar e Álcool - SP	Alimentos / Cerveja
288	Usina de Açúcar e Álcool – SP	Alimentos / Cerveja
Hb1 (S288c+287)	LBGA - UFSCar	Pesquisa básica

Fonte: Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)- UFSCar

2.2 Crescimento e manutenção das culturas

De cada isolado de levedura mantido em ultrafreezer (-80 °C) transferiu-se 200 µL para tubo cônico contendo 5 ml de YPD 2% (Extrato de levedura 10 g/L, Peptona 20 g/L e Dextrose 20 g/L) e cultivou-se *overnight* a 180 rotações por minuto a 30 °C em incubadora tipo *Shaker* (Infors Minitron, Suíça).

Após o crescimento, 500 µL do meio de cultura contendo a referida linhagem foi transferido para tubos contendo 500 µL de glicerol 30% (v/v) e mantidos a -80 °C no ultrafreezer.

Posteriormente, tubos de vidro contendo meio YPD 2% ágar sólido inclinado (tipo *slants*) receberam 70 µL do meio crescido anteriormente e incubados a 30 °C por 48 horas. Essas culturas foram mantidas por até 5 dias, refrigeradas de 2 a 4 °C e serviram como fornecimento de biomassa em quantidade suficiente para os diversos ensaios do presente estudo.

Para manutenção da vitalidade e viabilidade das células, as culturas tiveram seu crescimento renovados a cada três semanas.

2.3 Caracterização molecular dos isolados de leveduras

Nessa etapa, diversas técnicas moleculares foram realizadas com objetivo de se investigar quanto ao gênero e espécie das culturas utilizadas nesse trabalho.

2.3.1 Extração do DNA

Pela técnica do Fenol Clorofórmio (Hoffman, 2001), procedeu-se a toda extração de DNA. Nesse protocolo, um pré-inóculo é centrifugado à 4.000 g por 5 minutos, tendo seu precipitado sido ressuspenso em 500 µL de tampão Tris-HCl-SDS. Aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro são adicionadas, seguindo de agitação vigorosa por 10 minutos. Transfere-se 200 µL desta solução para novos tubos cônicos e agita-se vigorosamente. Posteriormente procede-se à adição de 100 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio. Centrifuga-se a 12.000 rpm por aproximadamente 10 minutos e transfere-se a fase superior (aquosa) para um novo tubo, no qual o DNA será precipitado mediante adição de 300 µL de isopropanol. Procede-se ao repouso a -80 °C por aproximadamente 1 hora. Sequencialmente, centrifuga-se a 12.000 rpm por 5 minutos e, em seguida, o precipitado é lavado com 300 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação por 1 minuto. O etanol deverá ser evaporado deixando-se o tubo repousar entreaberto em capela de fluxo laminar. Finalmente, adiciona-se 80 µL de água deionizada e procede-se à sua homogeneização. Estoca-se as amostras a -20°C até o momento do uso.

2.3.2 Amplificação da região ITS

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação dos fragmentos de DNA (extraídos conforme técnica do Fenol Clorofórmio descrita anteriormente) compreendidos entre a região intergênica ITS-1 e ITS-4. Essas regiões são espaçadores internos dos genes que codificam para o RNA ribossômico nuclear em

eucariotos (18S, 5.8S e 28S), e são importantes instrumentos para diferenciação genética de leveduras (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

Os iniciadores para esta amplificação estão descritos abaixo:

ITS1-F 5'ACGGTGAGAGATTTCTGTGC3'

ITS1-R 5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG3'

As reações foram compostas de 1 µL de DNA genômico, 0,4 µL de cada primer (iniciador), 10 µL do mastermix (dNPTs, enzima Taq Polimerase e tampão) e 7 µL de água deionizada. As reações de amplificação foram conduzidas em um BioRad T100 Termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55,5 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min e 72 °C por 10 min para finalizar a extensão.

Para visualização dos produtos da PCR, foi realizado procedimento de eletroforese em gel de agarose 1% com comparação com padrões prévios de amplificação. *Candida albicans* foi utilizada com controle não-*Saccharomyces* e a cepa comercial S 04[®] *Fermentis* como controle *Saccharomyces*.

2.3.3 Genotipagem

As leveduras caracterizadas como sendo do gênero *Saccharomyces* foram submetidas ao teste de genotipagem. A partir dessa técnica, iniciadores específicos foram utilizados para amplificação de regiões polimórficas específicas do DNA de *Saccharomyces cerevisiae* (Carvalho-Netto *et al.*, 2013).

As diversas linhagens puderam ser identificadas e comparadas com as leveduras atualmente utilizadas no processo da produção cervejeira. Os produtos da reação PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, com comparação dos padrões de *amplicons* encontrados.

4 oligo nucleotídeos iniciadores foram utilizados (3 µL de cada iniciador, 7 µL de master mix e 1 µL de DNA).

Os genes utilizados para as análises e os respectivos iniciadores estão descritos na

Tabela 2.2 Genes e respectivos iniciadores

ORF	Genes	Sequências de iniciadores	Temperatura de Melting (°C)
YLL021W	SPA2c	GAAAATGACGATGCAGACGA AGGACTCGCTTTCCCTTACC	55
YKL201C	MNN4c	TAGACCTTTTTGCGCCAACCT ATTACCACGATTCCGTCGAA	57
YKL163W	PIR3c	TGTCGCCTCATCTAAAGCAA TGTAATTTGGGATGCAGCAG	55
YFL024C	EPL1	ACGATTCCAAATACGACGAA TTCTGTTTCGCTTCTGAATTG	57

Fonte: Adaptado de Carvalho-Netto *et al.* (2013)

A amplificação das regiões polimórficas consistiu na desnaturação inicial por 5 minutos a 94° C, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 94° C. Adicionalmente, procedeu-se à fase de anelamento por 40 segundos à temperatura de *melting* específica para cada *primer* conforme Tabela 2.2, seguido de 45 segundos a 72° C. 5 minutos a 72° C foi a condição para a extensão final.

2.3.4 Análise filogenética dos isolados

Os *amplicons* obtidos pela reação PCR foram enviados para sequenciamento pela técnica de Sanger (SANGER *et al.*, 1977). As sequências obtidas (Anexo G) foram ajustadas e alinhadas com auxílio do programa Bioedit v.7.0.5.3 (HALL, 1999), tendo seus resultados analisados utilizando-se BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A relação evolutiva dos isolados de leveduras foi analisada através do alinhamento das sequências de nucleotídeos de cada amostra pela ferramenta MAFFT

(KATO et al., 2013) mediante uso de configurações predefinidas. Foi utilizado, posteriormente, jModelTest (POSADA, 2008) para adaptar o melhor modelo de substituição nucleotídica, usado para inferir relações filogenéticas de máxima probabilidade entre OBPs com PhyML ver.3.0 (GUINDON et al., 2010).

2.4 Análise da expressão gênica por qPCR

Para melhor compreensão do comportamento fisiológico das leveduras investigadas, a técnica genética da análise da expressão gênica por qPCR foi realizada.

Genes de importância considerável na expressão de fenótipos durante o processo fermentativo foram eleitos, conforme resumo na Tabela 2.3. A análise foi direcionada por etapas bioquímicas de interesse, como o processo fermentativo, o metabolismo de açúcares, a produção de aromas de interesse, entre outros.

As amostras analisadas foram coletadas nas etapas de microfermentação de cervejas e, para tal fim, o reagente Trizol (Invitrogen, Rockville, MS, EUA) foi utilizado para extração do RNA e síntese do cDNA por meio da técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Inicialmente, verificou-se a integridade do RNA obtido a partir de eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2%, seguindo da quantificação do RNA mediante usando um NanoVue Espectrofotômetro ND-1000 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). Posteriormente, amostras de 1 µg de RNA passaram pelo tratamento com Turbo™ DNase (Invitrogen, Rockville, MS, EUA). A síntese do cDNA foi obtida por transcrição reversa mediante utilização de kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) mediante protocolo do próprio fabricante: 10 minutos a 25 °C, seguida de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C.

A concentração ideal dos primers foi determinada (150 nM) e a amplificação teve sua eficiência calculada pela equação $E = (-1/\text{inclinação})$, confirmando a precisão e reprodutibilidade das reações. Para condução das reações de PCR em tempo real utilizou-se o aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems) mediante auxílio do Kit SYBR green master Mix (GoTAq Promega) para detecção.

Cada reação, constituída por 12 µl finais, foi obtida mediante utilização de 6 µL de 2X SYBR Green Master Mix (GoTAq Promega), 5 µL de Mix com os primers dos

respectivos genes (*forward* e *reward*, diluídos em água HPLC), além de 1 µL de cDNA. A reação foi conduzida conforme protocolo: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 minutos e 60 °C por 1 minuto. O gene endógeno TAF10 foi utilizado para normalização (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo os valores de expressão gênica obtidos pelo software do equipamento, baseado no modelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Regenberg *et al.*, 2006).

Tabela 2.3 Composição de genes, funções, referências e primers iniciadores utilizados para análises da expressão gênica

Gene	Sequência de <i>primers</i>	Limiar de detecção	Eficiência %	Expressão	Referências
GPD1	FW: CATTGCCACCGAAGTCGCTC	0,1	98	Expressa enzima para síntese glicerol; demasiadamente reduz rendimento alcóolico	SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004
	RV: GCCCTCGCCTCTGAAATCCT				
GPD2	FW: TTCGAGTTGGGCTCCAAGGG	0,1	100	Expressa enzima para síntese glicerol; demasiadamente reduz rendimento alcóolico	SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004
	RV: ACCAATGCTCCTTGGCCACT				
ADH1	FW: CGGTGCTGTTCTAAAGGCCAC	0,111	96	Expressa enzima para síntese e consumo de etanol (ADH1 síntese; ADH2 consumo)	DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003
	RV: GCATACCGACAAAACGGTGG				
ALD6	FW: CCTTAGCCCGTGGGGATGTT	0,097	95	Expressa enzimas relacionadas a desvio de rota de acetaldeído para acetato	ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN <i>et al.</i> , 1997
	RV: GCCGTCACCGGTGTTGATTG				
ALD4	FW: GCGGACGCCGAGTTGAAAAA	0,109	98	Expressa enzimas relacionadas a desvio de rota de acetaldeído para acetato	ARANDA; DEL OLMO, 2003; MEADEN <i>et al.</i> , 1997
	RV: TGAACCCGCACAACAGACCT				
BDH1	FW: GGGGTCCAAAACCTGTCCCA	0,26	103	Expressa enzima que catalisa oxidação de 2,3-butanodiol em acetoína	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2000
	RV: TGTCTCCGTTGTGGATGGCA				
MAL31	FW: TGGGACAGGCATTGTGTGGT	0,2	103	Expressa enzima responsável pela permeabilidade de maltose/sacarose. Expressão precoce seria sinônimo de aumento de capacidade fermentativa.	CHOW; SOLLITTI; MARMUR, 1989
	RV: GTTGACCGAACGCCAACAT				
PAD1	FW: TCCTCCGGTACCTGCGTTTT	0,072	99	Expressa enzima do complexo de descarboxilação do ácido ferúlico, resultando em 4-Vinil Guaiacol (4-VG)	RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015
	RV: AGTGTCAGCGTGGATGCCAA				
FDC1	FW: TTAGGTTGCCAGCCGTTTT	0,07	100	Expressa enzima do complexo de descarboxilação do ácido ferúlico, resultando em 4-Vinil Guaiacol (4-VG)	RICHARD; VILJANEN; PENTTILÄ, 2015
	RV: GAGCCCCAGATGATGGGCAA				

HXT1	FW: GCTGGCAGAATCGACGAAGC	0,7	100	Expressa enzima envolvida no transporte de hexoses, principalmente glicose e frutose	LEWIS; BISSON, 1991
	RV: GCAGTACCAGCGGCTCTCAT				
ADR1	FW: ACGAGAGCGTTCGCAAGACA	0,072	100	Expressa enzima necessária para transcrição do gene ADH2, produção de etanol e utilização de ácidos graxos	YOUNG <i>et al.</i> , 2003
	RV: GTTGCAGAGGCCACAGGGAT				
SUC2	FW: GGGGCCATGCTACTTCCGAT	0,1	95	Expressa enzima que hidrolisa sacarose a glicose e frutose (invertase), inibida pela concentração de glicose.	MARQUES <i>et al.</i> , 2016
	RV: TCGTTACGCTTGGGAGCGAT				

Fonte: Adaptado de Mandujano (2019)

2.5 Caracterização fisiológica das culturas isoladas

Além da composição do mosto cervejeiro, uma parcela importante da qualidade sensorial da cerveja é devido ao tipo de levedura aplicada ao processo de obtenção da cerveja (Stewart, 2016).

Dessa forma, características fisiológicas como floculação, tolerância a etanol e à pressão osmótica têm impacto considerável sobre a performance fermentativa, demandando investigações que possam elucidar as melhores condições para o processo cervejeiro.

2.5.1 Teste de crescimento populacional em diferentes meios de cultivo

Três tipos de meios foram utilizados como condições para avaliação do crescimento das leveduras: YPD 2% (11 g/L extrato de levedura, 22 g/L peptona, 22 g/L dextrose (SYNTH, Diadema, Brasil); YPM 2% (11 g/L extrato de levedura (HiMedia, Mumbai, Índia), 22 g/L peptona, 22 g/L maltose (SYNTH, Diadema, Brasil) e EM 2% (22 g/L extrato de malte (Liotécnica, Embu das Artes, SP, Brasil)).

O teste foi conduzido em microplacas com tampas de 96 poços cônicos de 200 µL com conteúdo útil de 120 µL. Cada poço recebeu 108 µL do respectivo meio de cultivo autoclavado e preparado à concentração superior de maneira a compensar exatamente o efeito de diluição pela adição do inóculo (10% do volume do poço cônico). De cada isolado de levedura mantido em ultrafreezer (-80 °C) transferiu-se 200 µL para tubo cônico contendo 5 ml de YPD 2% e cultivou-se *overnight* a 180 rotações por minuto a 30 °C em incubadora tipo *Shaker*. Procedeu-se à centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 3 ml de água destilada. Após homogeneização em agitador tipo Vortex[®] por 1 minuto, a densidade óptica foi lida a 600 nm. Volume calculado necessário foi transferido para novo tubo cônico de forma a obter-se um inóculo à DO 1,0. Tomou-se 12 µL de cada linhagem para compor os 120 µL finais de cada micro poço, representando, portanto, uma DO final de 0,1. As leveduras comerciais S04 e WB06 Fermentis[®] foram usadas como padrão de referência.

As microplacas foram mantidas a temperaturas de 20 °C e 30 °C em respectivas estufas e leituras foram feitas para os tempos de 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas, em multiscaner (Termo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finlândia).

2.5.2 Tolerância ao etanol e compostos do lúpulo

A caracterização de cada cultura foi realizada quanto à presença de compostos do lúpulo (iso- α -ácidos) e etanol por adaptações da técnica descrita por Michel *et al.*, 2016a. Cada isolado de células foi mantido em crescimento logarítmico durante a noite, a 30 °C e agitação de 180 rpm. De acordo com o descrito no item 2.5.1, uma alíquota calculada de cada linhagem de interesse foi transferida para um tubo cônico de forma a obter-se um inóculo à DO 1,0. Posteriormente, 12 μ L da cultura padronizada de células foram tomados de maneira a serem diluídos para densidade óptica OD_{600nm} de 0,1 em placas 96 poços, para as condições dos itens 2.5.2.1 a 2.5.2.3.

2.5.2.1 Quanto à concentração de etanol

Quantidade suficiente de YPM 2% teve sua concentração ajustada para 5% (v/v) e 10% (v/v) mediante adição de alíquota necessária de etanol 96% (v/v), conforme Anexo A. Sequencialmente, foi promovido o crescimento sem agitação a 20 ° e 30 °C, conforme adaptado de PRADO *et al.*, 2020. As leituras de densidade óptica aconteceram a cada 2 horas por período de 8 horas seguidas de leituras discretas a 24 e 48 horas.

2.5.2.2 Quanto à tolerância a compostos de lúpulo

Quantidade suficiente de YPM 2% teve concentração em iso- α -ácidos ajustada para 50 e 90 ppm (equivalente em IBU – *International Bitterness Unit*) conforme Anexo A. Sequencialmente, foi promovido o crescimento sem agitação a 20° e 30° C, conforme adaptado de PRADO *et al.*, 2020. As leituras de densidade ópticas aconteceram a cada 2 horas por período de 8 horas, seguidas de última leituras discretas a 24 e 48 horas.

2.5.2.3 Quanto à presença de compostos de lúpulo e etanol

Quantidade suficiente de YPM2% teve sua concentração de iso- α -ácidos ajustada para 0, 50 e 90 ppm (equivalente em IBU – *International Bitterness Unit*). Uma alíquota de etanol 96% (v/v) foi adicionada a cada poço para obtenção de uma concentração final de 5% (v/v) para cada concentração de iso- α -ácido (MICHEL et al., 2016a). O crescimento foi promovido sem agitação a 20° e 30° C. As leituras de densidade óptica aconteceram a cada 2 horas por período de 8 horas, seguidas de leituras discretas a 24 e 48 horas.

2.5.3 Capacidade crescimento sob pressão osmótica

Duas condições de pressão osmótica foram utilizadas para avaliação do crescimento das leveduras: Extrato de malte 20 °P e 25 °P, obtidos mediante dissolução de quantidade suficiente de extrato de malte DME (Liotécnica, Embu das Artes, SP, Brasil) em água destilada. Essas concentrações representam, no ambiente fabril cervejeiro, mostos elaborados para atendimento de estilos especiais resultando em concentrações alcólicas entre 5 e 6% (v/v), representando uma barreira considerável para o metabolismo das leveduras. Repostas adaptativas podem surgir a partir de uma série de eventos com a ativação de genes específicos, constituindo o tempo um fator fundamental para a determinação da viabilidade das linhagens em utilização (Sipiczki, 2019). O desempenho de cada cepa foi avaliado em relação à condição controle de extrato de malte 2%.

O teste foi conduzido em microplacas com tampas de 96 poços cônicos de 200 μ L com conteúdo útil de 120 μ L. Cada poço recebeu 108 μ L do respectivo meio de cultivo autoclavado e preparado à concentração superior de maneira a compensar exatamente o efeito de diluição pela adição do inóculo (10% do volume do poço cônico).

De cada isolado de levedura mantido em ultrafreezer (-80 °C) transferiu-se 200 μ L para tubo cônico contendo 5 ml de YPD 2% e cultivou-se *overnight* a 180 rotações por minuto a 30 °C em incubadora tipo *Shaker*. Procedeu-se à centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 3 ml de água destilada. Após homogeneização em agitador tipo Vortex[®] por 1 minuto, a densidade

óptica foi lida a 600 nm. Volume calculado necessário foi transferido para novo tubo cônico de forma a obter-se um inóculo à DO 1,0. Tomou-se 12 µL de cada linhagem para compor os 120 µL finais de cada micro poço, representando, portanto, uma DO final de 0,1. As leveduras comerciais S04 e WB06 Fermentis[®] foram usadas como padrão de referência.

As microplacas foram mantidas a temperaturas de 20 °C e 30 °C em respectivas estufas e leituras foram feitas para os tempos de 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas, em escâner óptico (Termo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finlândia).

2.5.4 Capacidade de floculação

O perfil de floculação das culturas de leveduras foi determinado pela técnica adaptada de Helm (BELLUT *et al.*, 2018). Resumidamente, frascos *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de mosto cervejeiro preparado a partir de 75 g de extrato de malte *Dry-Brew* marca Liotécnica[®] (Embu das Artes, SP, Brasil) em 1.000 mL de água cervejeira com 30 IBU (30 mg/L iso- α -ácidos) foram inoculados à taxa de 15×10^6 células/mL.

Os frascos foram incubados sob agitação a 150 rpm, a 25° C por 72 horas. As células foram lavadas uma vez com 0,5 M EDTA (pH 7,0) para eliminar possíveis agregados. A população viável foi aferida com auxílio de corante azul de metileno 0,01% em câmara de Neubauer.

A biomassa recuperada foi ressuspensa com volume necessário de água para ajustar à concentração de 1×10^8 células/mL. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi transferida, em sextuplicata, para tubos cônicos tipo *Eppendorf*. Procedeu-se à centrifugação (17.000 g, 15 minutos) e lavagem com água deionizada por três vezes.

No tratamento controle, após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de EDTA 0,5 M (pH 7,0). Para o tratamento experimental, as células foram lavadas uma vez com solução de CaSO₄ (0,51 g/L) e ressuspensa em solução de suspensão (0,51 g/L CaSO₄, 6,82 g/L acetato de sódio, 40 g/L etanol, 4,5 g/L ácido acético glacial. Promoveu-se a agitação das amostras em agitador tipo vórtex e a inversão das mesmas cinco vezes, sendo posteriormente mantidas a 20° C. Após 30 minutos de repouso, uma alíquota de 100 µL foi coletada logo após o menisco e diluída 10 vezes em água deionizada. A absorbância a 600 nm (Densidade ótica DO) foi mensurada em

espectrofotômetro (BioChrom, Cambridge, Inglaterra) para cálculo do percentual de floculação conforme a fórmula:

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

2.5.5 Capacidade de formação de espuma

A formação de espuma durante a fermentação foi realizada conforme metodologia descrita por (Basso, 2019). Após crescimento *overnight* da cultura de células, a população foi ajustada mediante contagem de células em câmara tipo Neubauer (Berlim, Alemanha). Os isolados de leveduras foram inoculados na razão de $1,2 \times 10^7$ células/mL em tubos de ensaio com tampa (16mm x 150mm) contendo 10 mL de mosto cervejeiro a 12° P. Os tubos foram incubados a 27° C. Medidas das alturas atingidas foram anotadas diariamente ao longo de 7 dias de fermentação. As alturas máximas atingidas pela espuma aferidas durante a fermentação foram consideradas para classificação fenotípica das leveduras avaliadas.

2.5.6 Teste do *Phenolic Off-Flavor* (POF)

A metodologia para avaliação do *Phenolic Off-Flavor* (POF) foi conduzida segundo Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a. As culturas de levedura mantidas em tubos inclinados do tipo *slants* foram inoculadas em placas YM-ágar contendo um dos compostos ativos precursores de aromas: ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido cumárico. As placas foram incubadas por 3 dias a 24 °C e cada uma contendo um precursor de aroma por isolado de levedura foi avaliada sensorialmente (cheiro ou odor ortonasal). A investigação buscou a identificação dos seguintes odores: 4-vinilguaiaicol (4-VG), similar a odor de “cravo”, a partir do ácido ferúlico; 4-vinilestireno (4-VS), similar a odor de “isopor”, a partir do ácido cinâmico e 4-vinilfenol (4-VP), similar a aroma “medicinal”, a partir do ácido cumárico.

O meio YM-ágar foi composto por 3,0 g/L de extrato de malte *Dry-Brew*® marca Liotécnica (Embu das Artes, SP, Brasil), 3,0 g/L de extrato de levedura (HiMedia,

Mumbai, Índia), 5,0 g/L de peptona (SYNTH, Diadema, Brasil), 11,0 g/L de dextrose e 20 g/L de ágar. Após esterilização do meio em autoclave (121° C e 1 atm de pressão por 20 minutos), uma alíquota das seguintes soluções foram adicionadas ao referido meio a 45 – 50° C sob condição estéril e em capela de fluxo laminar:

- a) Soluções padrão de ácido ferúlico e cinâmico: obtida mediante dissolução de 1 g de ácido ferúlico ou ácido cinâmico em 20 mL de etanol 96% (v/v);
- b) Solução padrão de ácido cumárico: obtida pela dissolução de 100 mg do referido ácido em 10 mL de etanol 96% (v/v). A seguir, transferiu-se 10 mL da solução padrão de ácido cumárico para cada 1.000 mL de meio YM-Ágar e 2 mL da solução padrão de ácido ferúlico ou 2 mL da solução de ácido cinâmico para cada 1.000 mL de meio YM-Ágar.

As cepas comerciais WB 06 *Fermentis*® e US 05 *Fermentis*® foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

2.6 Microproduções de cerveja

Para avaliação da capacidade fermentativa das cinco cepas investigadas, conduziu-se microproduções de cervejas em escala laboratorial (40 mL) comparando às duas linhagens comerciais: S04 e WB06 *Fermentis*®. A fermentação primária foi conduzida sem agitação em câmara fria (Frilux RF-064-E, São Paulo, Brasil) a 20 °C por 09 dias, sendo considerada finalizada pela leitura de densidades específicas constantes por dois dias consecutivos. Um período adicional de 5 dias foi considerado, à mesma temperatura (2 °C), como etapa de maturação. Por fim, os frascos cônicos foram armazenados em geladeira a 0 °C por 7 dias (*lagering*) (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a).

Para obtenção de mosto a 12,0 °P de densidade, dissolveu-se quantidade suficiente de Extrato de Malte em pó Liotécnica *Drybrew*® (Embu das Artes, SP, Brasil) em água destilada. Após autoclavagem (121 °C por 15 minutos) adicionou-se, sob condições estéreis, 0,2 ml/l de extrato de lúpulo isomerizado *Isohop*® (Barth-Haas, Nuremberg, Alemanha) 30% para obtenção de concentração de iso- α -ácido de 12 ppm equivalente a 12 IBUs (*International Bitterness Unit*). As características do mosto cervejeiro utilizado para a microprodução de cervejas são mostradas na Tabela 2.4.

40 ml de mosto lupulado 12,0°P foram transferidos para tubos cônicos tipo *Falcon*® de 50 ml, em sextuplicata. Em cada tubo foi inoculado 6×10^7 células/ml correspondente a cada linhagem, anteriormente mantidos em crescimento logarítmico durante a noite. O mosto não foi oxigenado.

A densidade específica, teor alcóolico e o pH foram determinados a cada 24 horas, a partir de amostras centrifugadas (5.000 rpm por 5 minutos) com auxílio de DMA *EasyDens*® (Anton-Paar GmbH, Graz, Austria), para evolução do consumo de açúcares e teor alcóolico. Para leituras do potencial hidrogeniônico foi utilizado instrumento pHmetro (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Amostras para análise da expressão gênica foram realizadas exatamente em 24 h a partir do início da fermentação (1º dia) e ao término da fermentação primária (10º dia).

O perfil de açúcares do mosto cervejeiro, assim como a composição residual de açúcares na cerveja após *lagering* (maturação da cerveja 4 °C por 30 dias), foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), parceria com o Laboratório de Bioprocessos – BELA – USP. O modelo utilizado foi um Prominence (Shimadzu Corporation, Japão), acoplado a uma coluna analítica HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, EUA). Temperatura de 60 °C e fase móvel com 5 mM H₂SO₄, a vazão de 0,6 ml/min⁻¹.

Tabela 2.4 Composição do mosto utilizado para microproduções de cervejas (12,0°P)

Composição Mosto Cervejeiro		
Parâmetro	Unidade	Valor
Extrato	°P (graus Plato)	12,00 ± 0,1
pH	-	5,21 ± 0,01
Densidade específica 20/20 °C	g/cm ³	1,048 ± 0,005
<i>Free Amino Nitrogen</i> (FAN)	mg/L	209 ± 20
Açúcares totais	g/L	84,5 ± 0,5
Glicose	g/L	7,19 ± 1,60
Maltose	g/L	62,45 ± 8,60
Maltotriose	g/L	13,58 ± 1,90

Fonte: O próprio autor (2023)

2.7 Fermentação de cervejas com cepas pré-selecionadas

Das cinco linhagens iniciais utilizadas nesse trabalho, três cepas foram selecionadas mediante avaliação de maior potencial para aplicação no processo cervejeiro. Para tal, procedeu-se à avaliação das características físico-químicas como assimilação de nitrogênio, teor alcóolico final e obtenção de subprodutos (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a). Posteriormente, as cervejas obtidas foram avaliadas através de painéis sensoriais compostos por julgadores leigos e treinados. Para tanto, fermentações foram conduzidas com volumes maiores àqueles empregados nas microproduções (fermentações de bancada conforme item 2.6), com preparo do inóculo e mosto adequados à nova escala produtiva.

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com Meier-Dörnberg (2017a), com algumas adaptações quanto à fonte de carbono para crescimento celular e posterior fermentação, assim como quanto ao tempo de crescimento reduzido sob agitação (detalhamento no item 2.7.1).

Para minimizar interferências sensoriais e de frescor a partir de mosto obtido com extrato de malte seco - DME, obteve-se mosto cervejeiro convencional mediante emprego de uma panela cervejeira automatizada (Begui&Bortolaz, Xunquim, China). O equipamento elétrico de capacidade de preparo nominal de 52 litros pode ser visualizado na Figura 2.1 a seguir:



Figura 2.1 Panela cervejeira elétrica 52 litros – Fonte: Amazon do Brasil (2023).(acesso <https://images.app.goo.gl/CjE4KKYkaMnYD3FQ6>)

Para obtenção de 45 litros de mosto cervejeiro, utilizou-se uma base de maltes contendo 95% de malte base e 5% de malte especial, respectivamente malte tipo Pilsen (AGRÁRIA, Guarapuava, Brasil) e malte Carahell® (WEYERMANN, Bamberg, Alemanha). A mistura de maltes foi embebida em 37 litros de água mineral (Lindóia, Águas de Lindóia, Brasil). Adicionou-se 13 gramas de cloreto de cálcio (cofator em várias reações bioquímicas) e corrigiu-se o pH do meio para faixa de 5,20 a 5,40 mediante ácido fosfórico alimentício 45% (v/v). Para promoção do amargor desejado de 15 IBU (*International Bitterness Unit*) ou 15 mg/L de iso- α -ácidos no mosto cervejeiro, foram empregados, durante os 60 minutos da etapa de fervura, 30 gramas de lúpulo em *pellets* Hallertau Mandarin Bavaria 9,8% α -ácidos (Barth-Haas, Nuremberg, Alemanha).

Inicialmente, os maltes foram moídos em moinho do tipo 2 rolos, obtendo-se granulado homogêneo e de cascas preservadas. O processo de mostura foi conduzido por recirculação contínua em panela automatizada, mediante emprego de duas faixas de temperatura: repouso proteico a $52\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, objetivando a disponibilização de peptídeos e aminoácidos assimiláveis (FAN – *Free Amino Nitrogen*) e repouso de sacarificação a $68\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa última etapa foi mantida por 45 minutos ou até conversão de todo amido em açúcares simples, comprovado pela reação com

tintura de iodo 2% (v/v) e manutenção da coloração alaranjada. Posteriormente, a inativação enzimática foi obtida pela manutenção da mostura a 78 °C por 10 minutos. O processo prosseguiu com a elevação do cesto filtrante e lavagem do bagaço de malte com água a 76 °C a pH 5,40, de modo a otimizar a extração dos açúcares retidos na torta de grãos. A quantidade de água de lavagem foi controlada de maneira a não ultrapassar o extrato mínimo antes da fervura, conforme receita elaborada em software BEERSMITH 3 v.3.0.8 (Anexo B).

O mosto filtrado prosseguiu para próxima etapa mediante aquecimento até atingimento de fervura. O pH foi corrigido para faixa de 5,30 a 5,40 pela adição de quantidade suficiente de ácido fosfórico 45% (v/v), controlando-se o nível de caramelização e escurecimento. A ebulição de todo volume foi mantida por 60 minutos, objetivando a redução da carga microbiana do líquido, a eliminação de compostos voláteis indesejáveis como o dimetil-sulfureto – DMS (Poreda, Czarnik, *et al.* 2014), além das reações de isomerização das resinas de lúpulo e obtenção do amargor típico do produto. A adição do lúpulo foi promovida no início da fervura, mantendo-se por todo período de ebulição do volume.

Sequencialmente procedeu-se a etapa de decantação de proteínas e resíduos de lúpulo (*trub quente*) pela técnica do *Whirlpool* (redemoinho), mediante mistura tangencial de todo volume da panela por 5 minutos e agitação moderada. Após 30 minutos a etapa de resfriamento foi iniciada.

Um trocador de calor de placas (20 placas) previamente sanitizado quimicamente (ácido peracético, 300 ppm) e termicamente (98 °C, 30 minutos) foi empregado para resfriamento do mosto em contracorrente com água da rede potável. O mosto final foi recolhido em baldes plásticos, fundo chato, volume nominal 60 litros, volume útil 45 litros, sanitizados (ácido peracético, 300 ppm) e armazenados em câmara fria até atingimento da temperatura de fermentação.

2.7.1 Propagação de linhagens de interesse

Com finalidade de se obter concentração suficiente e viabilidade adequada para a fermentação de volumes maiores que os empregados nos testes de bancada, promoveu-se a propagação das linhagens de interesse.

As cepas foram inoculadas a partir de tubos contendo ágar inclinado (*slants*) – conforme item 2.2 - Crescimento e manutenção das culturas. Para cada cepa estudada, 2 tubos *slants* tiveram sua superfície cuidadosamente raspadas com auxílio de uma alça estéril e descartável, adicionalmente lavados com 25 mL de água autoclavada. Por fim, foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL juntamente de 50 mL de mosto 12,5°P lupulado autoclavado (121 °C, 15 minutos) - conforme descrito anteriormente. Os frascos foram mantidos a 20 °C sob agitação de 80 rpm por 24 horas em agitador orbital tipo *Shaker* (Infors Minitron, Suíça). Sequencialmente, todo conteúdo foi transferido para 500 mL de mosto lupulado 12,5°P autoclavado, repetindo o procedimento de propagação descrito anteriormente, por 24 horas adicionais. Por fim, as células foram decantadas por 6 horas em geladeira, tendo o sobrenadante descartado e substituído por 1 litro de mosto lupulado autoclavado a 20 °C. A concentração de células foi determinada em células/grama por intermédio de câmara de Neubauer de profundidade de 0,1 mm e área de 0,1 mm³.

2.7.2 Fermentação propriamente dita

Para a cepa comercial de referência (Fermentis® WB06) e as três demais linhagens de interesse sensorial procedeu-se a fermentação de 9 litros de mosto fresco preparado conforme item 2.7. A fermentação foi conduzida em fermentadores sanitizados do tipo balde 12 litros, em plástico sanitário, de maneira a permitir 25% de espaço livre (*head space*). Os fermentadores foram adaptados com válvula inferior para retirada de amostra assim como o completo isolamento de seu interior em relação ao ambiente externo pelo emprego de tampa de fechamento hermético. Uma válvula do tipo selo hidráulico (*air lock*) foi empregada em sua parte superior de maneira a promover a exaustão do gás carbônico, conforme Figura 2.2 a seguir.



Figura 2.2 Fermentador plástico 10 litros provido de selo tipo *airlock*. Fonte: O próprio autor (2023)

Foi utilizada câmara fria (Frilux RF-064-E, São Paulo, Brasil) para garantir a temperatura constante do processo em 20 °C. O volume do inóculo foi calculado em mililitros (mL), a partir da concentração celular expressa em células/grama obtida por leitura direta em câmara de Neubauer e viabilidade mínima de 97%. O mosto não foi oxigenado e a fermentação primária foi conduzida até que a densidade avaliada não se alterasse por duas medições consecutivas no período de 24 horas.

Posteriormente, procedeu-se à etapa de fermentação secundária (guarda quente) por 2 dias a 22 °C. Sequencialmente, a etapa de *lagering* teve seu início mediante redução da temperatura da cerveja para 10 °C e mantida por 10 dias. Por fim, o conteúdo útil do fermentador foi transferido, de maneira sanitária e hermética, por meio de mangueira de silicone (3/8 pol, 4 mm, GF, Suíça) para barris do tipo POSTMIX[®], volume 10 litros, em inox, devidamente sanitizados e pré-evacuados com gás carbônico. Os barris foram mantidos em câmara fria por 7 dias a 0 °C, concluindo-se a etapa de *lagering*.

Finalmente os barris foram carbonatados mediante o emprego de atmosfera forçada com gás carbônico industrial a 2,8 volumes de CO₂ (aproximadamente 0,58% p/p) e envasados em garrafas de vidro âmbar 500 mL, mediante sonda de envase

isobarmétrica (Indupropil, Ijuí, Brasil), todos utensílios previamente autoclavados. As garrafas foram arrolhadas com tampas tipo *pry-off* com lacrador manual tipo alavanca (Indupropil, Ijuí, Brasil) e mantidas em geladeira a 0 °C até momento das sessões de análise sensorial ou destinação para análises de cromatografia gasosa (GC).

2.8 Scale up combinado com abordagem de Mix de fermentos

Como exposto anteriormente, a busca por um modelo de *scale up* que possibilite a aplicação comercial de novas linhagens constitui um objetivo estratégico e um avanço inédito na linha de pesquisa atual do DGE/UFSCar.

Ainda que os desafios a serem superados para a viabilização do emprego de leveduras selvagens nos processos industriais sejam consideráveis, tais esforços se justificam devido à riqueza dessa biodiversidade e à demanda crescente por cervejas com propriedades sensoriais aprimoradas e aromas distintos (Gallone *et al.*, 2016; Ciani, *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, vários pesquisadores e a própria indústria do vinho têm alocado recursos e pesquisas em processos de vinificação com inóculos mistos de leveduras. Duas são as razões para tal estratégia: 1) Aprimoramento das características sensoriais da bebida; 2) Redução do teor alcóolico dos vinhos ofertados (Parapouli, *et al.*, 2020).

A utilização de fermentações mistas pode se dar pelo inóculo simultâneo ou sequencial das espécies/linhagens envolvidas. A escolha de um método em detrimento de outro deverá levar em conta vários fatores tecnológicos ou intrínsecos de cada microrganismo, como a cinética fermentativa, o *fitness* celular, o risco microbiológico devido ao acesso físico dos recipientes de fermentação ou mesmo as técnicas do mestre cervejeiro, como, por exemplo, as operações de aeração do mosto cervejeiro.

O presente trabalho teve como estratégia a utilização da linhagem de maior potencial dentre as cinco investigadas para composição de um *blend* com a levedura padrão comercial WB06® (inóculo misto simultâneo). Tal condução baseia-se no fato da linhagem de interesse nunca ter sido utilizada para condução de fermentações comerciais em processos cervejeiros, além do fato de que um futuro produto comercial

(fornecimento de fermento pastoso pela UFSCar) possa ser protegido mediante segredo industrial – proporção específica entre linhagens.

Uma vez determinada a melhor proporção entre linhagem de interesse e cepa comercial, o volume para *Scale up* foi inoculado simultaneamente e as fermentações conduzidas. Assim, as cervejas finais obtidas mediante fermentação com inóculo misto (WB06® & levedura investigada escolhida) e inóculo puro (cepa comercial WB06® Fermentis) foram avaliadas e comparadas entre si quanto aos seus respectivos atributos físico-químicos e sensoriais.

Para determinação da proporção entre leveduras na composição do inóculo misto, microproduções de cervejas em escala laboratorial foram realizadas. A fermentação primária foi conduzida sem agitação em câmara fria (Frilux RF-064-E, São Paulo, Brasil) a 20 °C por 09 dias, sendo considerada finalizada pela leitura de densidades específicas constantes por dois dias consecutivos. Um período adicional de 5 dias foi considerado, à mesma temperatura (20 °C), como etapa de maturação. Por fim, os frascos cônicos armazenados em geladeira a 0 °C por 7 dias constituíram a etapa de *lagering* (Meier-Dörnberg et al., 2017a).

Para obtenção de mosto a 12,0°P de densidade, dissolveu-se quantidade suficiente de Extrato de Malte em pó Liotécnica Drybrew® (Embu das Artes, SP, Brasil) em água destilada. Após autoclavagem (121 °C por 15 minutos) adicionou-se, sob condições estéreis, 0,2 mL/L de extrato de lúpulo isomerizado Isohop® (Barth-Haas, Nuremberg, Alemanha) 30% para obtenção de concentração de iso- α -ácido de 12 ppm equivalente a 12 IBUs (*International Bitterness Unit*).

40 mL de mosto lupulado 12,0°P foram transferidos para tubos cônicos tipo Falcon® de 50 mL, em sextuplicata. Em cada tubo foram inoculados 6×10^7 células/mL correspondente a proporção entre linhagens conforme:

- a) P1: 100% Linhagem investigada escolhida;
- b) P2: 80% Linhagem investigada escolhida & 20% Linhagem comercial WB06®;
- c) P3: 60% Linhagem investigada escolhida & 40% Linhagem comercial WB06®;
- d) P4: 50% Linhagem investigada escolhida & 50% Linhagem comercial WB06®;
- e) P5: 40% Linhagem investigada escolhida & 60% Linhagem comercial WB06®;
- f) P6: 20% Linhagem investigada escolhida & 80% Linhagem comercial WB06®;

g) P7: 100% Linhagem comercial WB06®;

As células foram obtidas a partir de crescimento logarítmico durante a noite. O mosto não foi oxigenado.

A densidade específica, teor alcóolico e o pH foram determinados a cada 24 horas, a partir de amostras centrifugadas (5.000 rpm por 5 minutos) com auxílio de DMA EasyDens® (Anton-Paar GmbH, Graz, Austria), para evolução do consumo de açúcares e teor alcóolico. Para leituras do potencial hidrogeniônico foi utilizado pHmetro manual de bancada (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Finalmente, para avaliação da performance fermentativa e qualidade (físico-química e sensorial) das cervejas obtidas no *scale up*, os itens 2.7, 2.7.1 e 2.7.2 foram executados com devidas adaptações quantitativas e qualitativas. O volume, ora utilizado de 9 litros para fermentação em recipientes de 12 Litros, passou a ser 45 litros. Estrategicamente, o estilo cervejeiro optado foi uma cerveja de trigo alemã escura, *Dunkelweizen* (Anexo H), de maneira a valorizar os atributos dos fermentos (condimentado e frutado). Fermentadores de 60 litros foram aplicados para tal propósito.

2.9 Métodos analíticos

As cervejas acabadas, após completado período de *lagering*, tiveram seus atributos físico-químicos e sensoriais avaliados, incluindo: etanol, pH, densidade específica, grau de atenuação aparente, *Free Amino Nitrogen* (FAN), açúcares residuais, perfil de voláteis, além de caracterização por painel sensorial de vasta experiência.

O grau de atenuação refere-se à medida da intensidade de fermentação do mosto cervejeiro pela linhagem de levedura, usualmente expresso em percentual. Assim, quanto mais açúcares são assimilados pela levedura no processo fermentativo, maior o grau de atenuação aparente. A equação a seguir é utilizada para cálculo do percentual de atenuação aparente (White; Zainasheff, 2010):

$$AA (\%) = \frac{(OG - FG)}{(OG - 1)} \times 100$$

Onde *AA* (%) é a atenuação aparente, *OG* a densidade do mosto cervejeiro avaliada antes da inoculação do fermento e *FG* a densidade final após fermentação completada e estável por 3 dias, tomadas a 20 °C.

Valores de FAN (*Free Amino Nitrogen*) para mosto cervejeiro e cerveja acabada foram obtidos usando corante a base de ninhidrina e avaliando leituras de absorbância a 570 nm de acordo com a norma alemã MEBAK 2.6.4.1, conforme descrito por Michel *et al.* 2016a.

Após centrifugação das amostras a 5.000 rpm por 5 minutos, os valores de pH foram determinados em um pHmetro digital (Gehaka, São Paulo, Brasil). Os níveis de etanol e densidade específica foram obtidos por meio de um densímetro digital DMA 4500 M com Alcoolyzer Beer ME (Anton-Paar GmbH, Graz, Austria). Açúcares residuais foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), mediante parceria com o Laboratório de Bioprocessos – BELA – da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – USP. Foi utilizado cromatógrafo modelo Prominence (Shimadzu, Japão), com coluna analítica HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, EUA) a 60 °C com 5 mM H₂SO₄ como fase móvel a 0,6 ml.min⁻¹.

Voláteis produzidos como subprodutos da fermentação (dicetonas vicinais, DMS, acetaldeído, acetato de etila, álcoois superiores entre outros) foram avaliados por cromatografia gasosa de *Headspace* mediante parceria com Indústria Cervejeira de Itu SP. Nessa técnica (Piovezan, 2018), a amostra injetada no equipamento é vaporizada e tem seu conteúdo arrastado por uma fase móvel (gás inerte) para o interior de uma coluna que suporta a fase estacionária. O tempo de retenção de cada substância química é função de sua interação com essa fase, tendo sua identificação em detectores que integram via *software* a presença de cada componente em picos singulares. O cromatógrafo utilizado foi do modelo Agilent 8890 (Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com colunas capilares com injetor *split/splitless* e detector de ionização de chama (FID) e sistema integrado de processamento via *software*.

A Tabela 2.5 resume as características intrínsecas do cromatógrafo e protocolo empregado:

Tabela 2.5 Temperaturas e coluna utilizada para determinação por GC de subprodutos de fermentação

Coluna	Agilent CP7698, 50 m X 0,5 mm
Temperatura forno	200 °C
Temperatura detecção	250 °C
Temperatura injeção	150 °C
Tempo de injeção	4 s
Tempo de análise	17 min

Fonte: O próprio autor

Para uma abordagem mais ampla acerca dos açúcares, voláteis e subprodutos da fermentação, a técnica de Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) foi empregada mediante parceria com o Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa UFRJ - Caxias em Biologia (NUMPEX-BIO).

Foram adquiridos espectros utilizando espectrômetro Bruker Avance 500 MHz em temperatura de 20 °C (293 K) os seguintes parâmetros:

Tabela 2.x Parâmetros para aquisição de espectros

Sequência de pulso	Zgesgp	Zgcppr	hsqcetgpsi
Janela espectral	20 ppm	20 ppm	11/150 ppm
N° pontos	65k	32k	1024/256
Tempo de relaxação	2 segundos	15 segundos	2 segundos
Atraso pré-scan	6.5 segundos	6.5 segundos	6.5 segundos
Off-set	4.7 ppm	4.7 ppm	4.7/75 ppm
n° de escaneamentos	256	128	6
Ângulo de pulso	90°	90°	90°
Temperatura da amostra	293 K	293 K	293 K
Campo	500 MHz	500 MHz	500 MHz

Como material de referência externa para quantificação foi utilizado Ácido maleico 13.3 mg em 600 µL, pureza 99,9% (fração em massa $999,9 \pm 1,3$ (mg/g)). A

referência interna de calibração utilizada foi 10% de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS) - Concentração final aproximada: 1 mM (Brandão, 2021).

As quantificações foram realizadas através do método PULCON (*Pulse length-based concentration determination*), sendo a base de dados para busca de compostos utilizada a CHENOMX, COLMARM e HMDB.

2.10 Análise Sensorial

As amostras de cervejas foram avaliadas sensorialmente por dois painéis, um primeiro constituído por 7 avaliadores experientes e *Beer Sommeliers* pela ABS (Associação Brasileira de Beer Sommeliers) e ASI (*Association de la Sommellerie Internationale*) – descritivo e discriminativo - e um segundo constituído por pelo menos 20 avaliadores leigos – discriminativo e hedônico, pertencentes ao quadro de técnicos estudante, professores e colaboradores da Universidade Federal de São Carlos. Dois testes foram conduzidos: avaliação sensorial descritiva seguido de um teste triangular.

Os testes foram realizados em ambiente apropriado e condicionado em acordo com a norma NBR 12.995 (ABNT, 1993). As amostras foram fornecidas à temperatura ideal para investigação da diversidade de odores/aromas (12 °C) e em triplicata. Foram empregados copos plásticos opacos de 70 mL numerados com códigos de três dígitos. Um modelo de ficha organizadora para teste triangular pode ser visto no Anexo D.

O teste triangular foi aplicado de acordo com a NBR 12995 (ABNT, 1993) para determinar se diferenças significativas seriam observadas, par a par, por no mínimo 20 participantes. Ao painel foi solicitado, a partir de um conjunto de 3 amostras, indicar qual amostra diferiria das demais duas idênticas (modelo ficha Anexo F). Para isso, cada cerveja proveniente de cada linhagem investigada foi testada contra outra, segundo a Tabela 2.6, como segue:

Tabela 2.6 Ensaio sensorial triangular para avaliar possíveis diferenças entre linhagens

Teste triangular	
Linhagem investigada	Linhagem-contra teste
LBGA-01	287
LBGA-01	Hv8
LBGA-01	WB06
287	Hv8
287	WB06
Hv8	WB06

Fonte: O próprio autor

Foi solicitado aos julgadores provarem as amostras da esquerda para direita, identificando a amostra diferente. O número de respostas corretas necessário para estabelecer diferenças significativas encontra-se no Anexo C de significância baseada no teste do qui-quadrado.

Os painelistas foram solicitados a descrever 7 categorias específicas: “frutado ou *fruity*”, “cítrico ou *citric*”, “condimentado ou *spicy*”, para odores e “corpo ou *body*”, “acid ou ácido”, “floral” e qualidade do “retrogosto ou *aftertaste*”, para sabores. As intensidades deveriam ser descritas em uma escala de 0 (zero) para nenhuma percepção a 10 (dez) para extrema detecção da referida característica.

2.11 Análises estatísticas

Os resultados analíticos obtidos a partir dos experimentos de fermentação e avaliação de crescimento em diferentes substratos e agentes estressores foram conduzidos em triplicata, exceto quando destacado de outra forma.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa PAST, versão 4.12b (HAMMER, *et al.*, 2001) e, quando significativamente diferentes, tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Referente ao emprego do teste discriminativo triangular, o número de respostas corretas para estabelecer diferenças significativas foram encontradas em uma

tabela de significância baseada no teste qui-quadrado, de acordo com NBR 12995 (ABNT, 1993).

A análise dos componentes principais (PCA) empregada para construção do perfil sensorial multidimensional foi obtida mediante software RStudio, Versão 2023.03.0 + 386 (R Core Team, 2023).

Os valores foram expressos no formato média $\pm$ desvio padrão.

3. Capítulo 3 – Resultados e Discussão

O presente trabalho foi dividido em duas partes:

A primeira sessão, detalhada no item 3.1 corresponde à caracterização de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* quanto aos aspectos biomoleculares, fisiológicos, tecnológicos e sensoriais para as respectivas cervejas.

A segunda etapa correspondente à caracterização das cervejas obtidas a partir de um mix de fermentos personalizados, abrangendo aspectos tecnológicos, físico-químicos e sensoriais (item 3.2).

3.1 Caracterização geral de isolados de interesse

3.1.1 Identificação molecular das cepas em estudo

Do ponto de vista biomolecular, seis diferentes isolados foram avaliados objetivando uma possível identificação quanto ao gênero *Saccharomyces*. Para tanto, as cepas tiveram sua região 5.8S-ITS do complexo gênico que codifica para a região 5.8S do RNA ribossômico amplificada. O produto PCR obtido foi submetido a gel de agarose 2% e, paralelamente, enviado para sequenciado pela técnica de Sanger (SANGER *et al.*, 1977).

Os resultados da eletroforese (Figura 3.1) mostram que, das seis linhagens testadas, três (LBGA01, Hv8 e 287) apresentaram *amplicons* de 900 pares de base (pb), sendo caracterizadas como possíveis *Saccharomyces* (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999). Duas cepas (Hv5 e Hv6) apresentaram tamanhos muito próximos à espécie *Candida albicans* (não-*Saccharomyces*) e uma única linhagem (288) apresentou-se como uma possível mistura de gêneros (poço 06).

A partir dessa observação, as linhagens Hv5 e Hv6 (poços 2 e 3) foram desconsideradas desse estudo, uma vez que somente o gênero *Saccharomyces* foi avaliado para o *scale up* industrial. O isolado 288 foi submetido a um processo de purificação em placas YPD 2%, passando por crescimento overnight e diluição 1:1000, seguido de plaqueamento por esgotamento. Posteriormente 10 unidades formadoras de colônia (UFC) foram escolhidas randomicamente e tiveram seu DNA extraído. O

produto PCR foi comparado com o produto das leveduras comerciais de referência até que as colônias de origem fossem referenciadas como pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

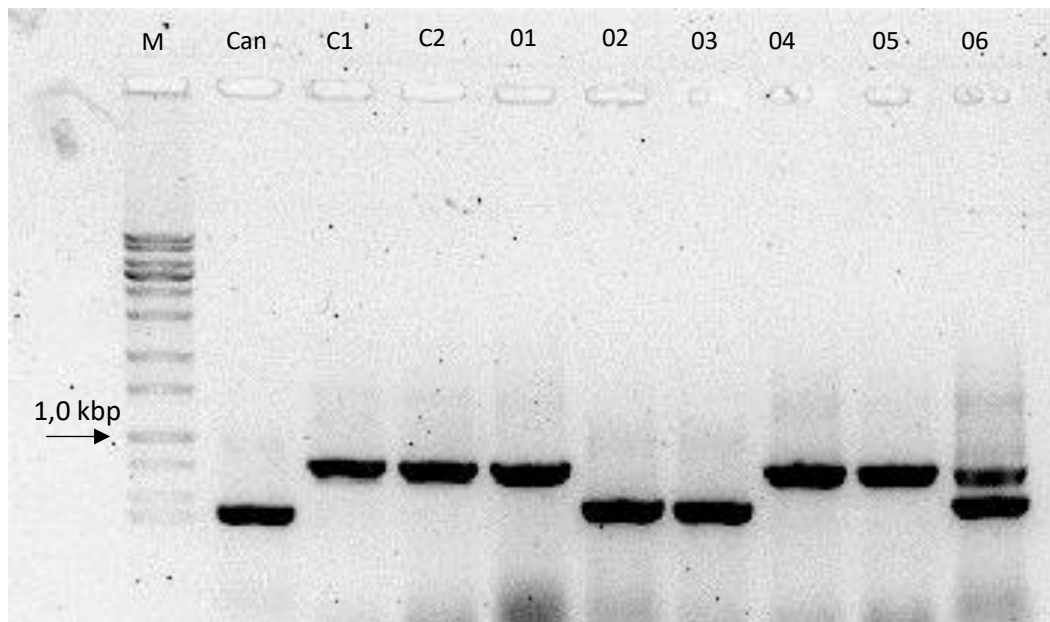


Figura 3.1 Amplificação da região ITS de seis diferentes isolados possivelmente *Saccharomyces*. M: marcador de tamanho molecular. Can: *Candida albicans* (não-*Saccharomyces*), C1 e C2: leveduras comerciais *Saccharomyces*, respectivamente S04® e WB06®. 01 a 06: linhagens estudadas, respectivamente: LBGA01, Hv5, Hv6, Hv8, 287 e 288. **Fonte:** O próprio autor

Posteriormente, novo procedimento biomolecular foi conduzido de maneira a verificar se os isolados utilizados atenderiam ao critério da técnica ITS, ou seja, possível pertencimento ao gênero *Saccharomyces*, como pode ser visto na Figura 3.2.

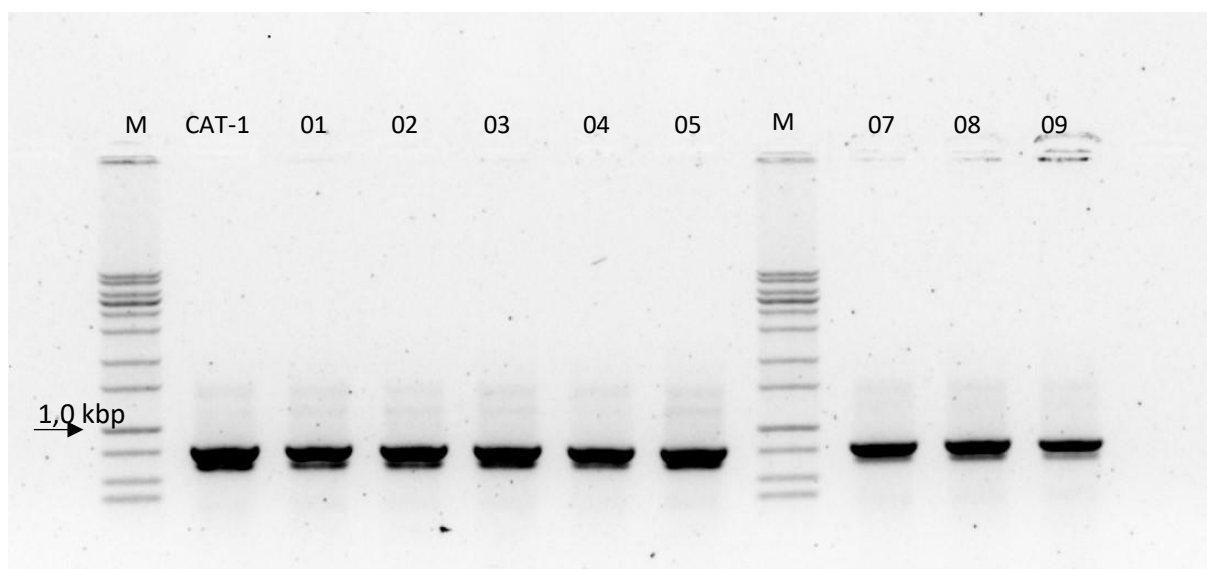


Figura 3.2 Amplificação da região ITS de cinco diferentes isolados possivelmente *Saccharomyces*. M: marcador de tamanho molecular. CAT-1: *Saccharomyces cerevisiae* (bioetanol).. 01 a 05: linhagens estudadas, respectivamente: LBGA01, 287, 288, Hv8 e Hb1. 07, 08 e 09: leveduras comerciais *Saccharomyces*, respectivamente S33®, WB06® e S04®. **Fonte:** O próprio autor

A técnica de genotipagem descrita por Carvalho-Netto e colaboradores (Carvalho-Netto *et al.*, 2013) foi utilizada como uma ferramenta específica para a diferenciação de linhagens *Saccharomyces*. Quatro iniciadores específicos foram utilizados para amplificação de regiões polimórficas específicas do DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. A Figura 3.3 mostra as diversas linhagens comparadas com leveduras atualmente utilizadas no processo da produção cervejeira e de bioetanol. Os produtos da reação PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, com comparação dos padrões de *amplicons* encontrados.

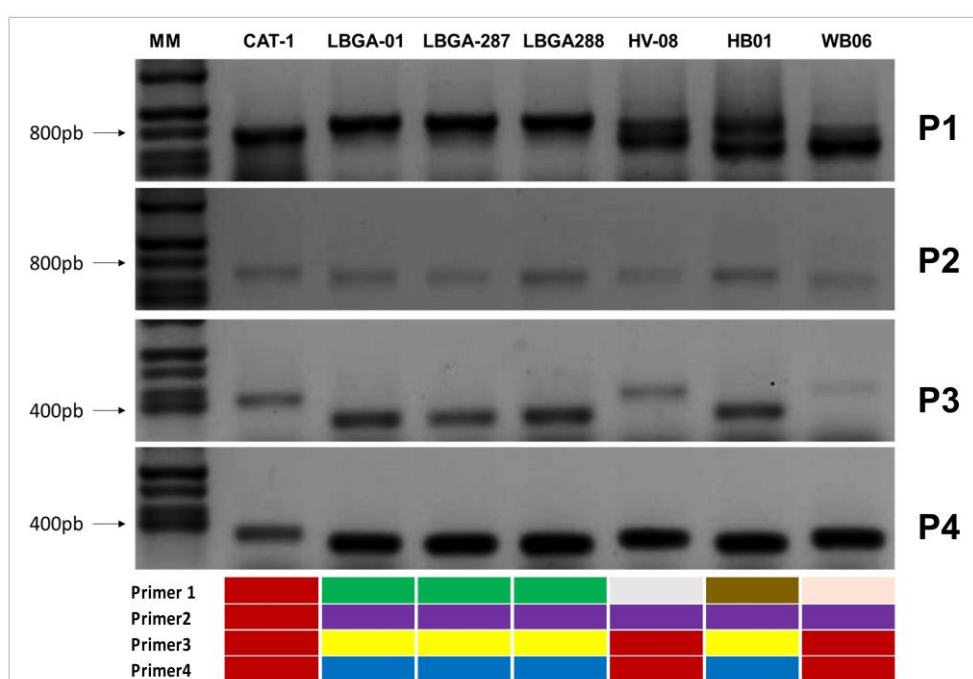


Figura 3.3 Genotipagem de linhagens de interesse. Poço 01: Marcador Molecular; Poço 02: CAT-1 (*Saccharomyces* utilizada para bioetanol); Poços 03 a 07 respectivamente: LBGA1, 287, 288, Hv8 e Hb1. Poço 08: Levedura comercial WB06[®] Fermentis

Pudemos identificar que as cinco linhagens *Saccharomyces* de interesse nesse estudo apresentaram tamanhos de *amplicons* distintos da levedura comercial de referência comumente utilizadas em processos industriais WB06[®]. Entretanto, as linhagens LBGA-01, 287 e 288 apresentaram tamanhos de *amplicons* muito próximos, impossibilitando a diferenciação entre elas por essa técnica. Estudos anteriores (Prado, 2020) mostram características fenotípicas distintas para essas cepas quanto ao consumo de açúcares, cinética fermentativa e perfil aromático, o que reforça a hipótese da necessidade de outra técnica biomolecular de diferenciação. Para tal, o produto do ITS

foi enviado para sequenciamento no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica para sequenciamento de DNA, da UNESP Campus Jaboticabal, com obtenção de possíveis linhagens distintas (Anexo G). As linhagens Hv8 e Hb1 diferiram entre si e das demais, configurando possíveis novas linhagens do gênero *Saccharomyces*, como mostra a Figura 3.3.

O grau de proximidade genética das cepas investigadas foi avaliado, permitindo-se inferir na relação evolutiva entre elas.

Após o sequenciamento do produto da reação PCR, as referidas sequências foram ajustadas e alinhadas (HALL, 1999), tendo seus resultados analisados utilizando-se BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A Figura 3.4 mostra uma separação bem suportada por dois grandes grupos. O primeiro, caracterizado por uma linhagem não-*Saccharomyces* (*Cândida*), utilizada como um primeiro controle não pertencente à espécie tipicamente empregada nas fermentações cervejeiras. O segundo clado, exibe a separação evidente do segundo controle não-*Saccharomyces*, as cepas LBGA157og e LBGA175og, obtidas em plantas de bioetanol e identificadas por sequenciamento como espécies de *Kluyveromyces marxianus* (Prado, 2020). Por fim, o agrupamento compreendendo as cinco linhagens investigadas e duas cepas comerciais (S04[®] Fermentis e CAT-1).

Apesar das cepas LBGA-01, 287,288, Hv8 e Hb1 possivelmente representarem a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a expressão de seus genótipos similares podem, ainda assim, se diferenciar substancialmente, visto seus agrupamentos em subclados distintos.

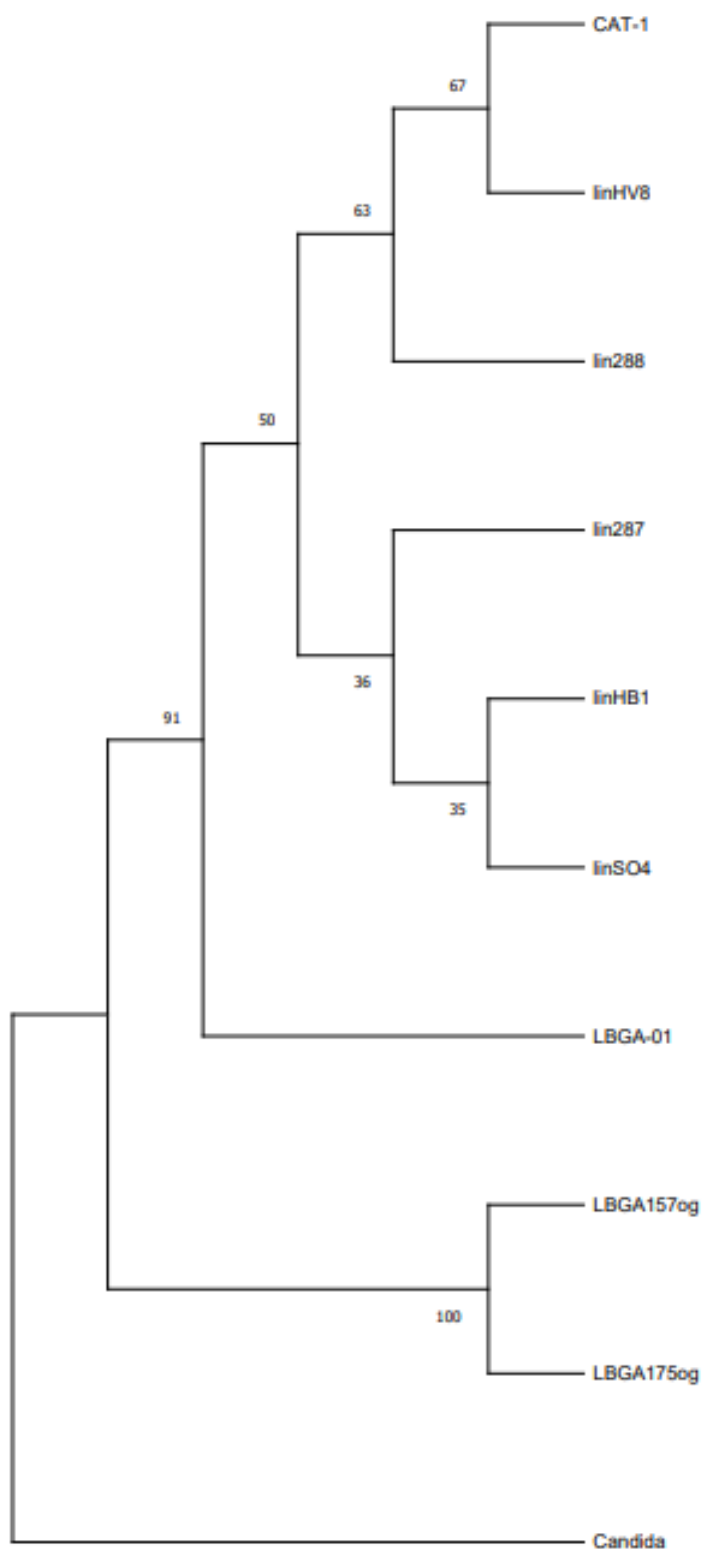


Figura 3.4 Árvore filogenética representando a relação evolutiva das cepas leveduras investigadas para fabricação de cervejas. CAT-1: cepas de levedura utilizada na fabricação de bioetanol; linHV8, lin287, lin288, linHB1, LBGA-01: cepas investigadas no presente estudo; linS04: cepa comercial S04[®] Fermentis utilizada na fabricação de cerveja; Cepas não-*Saccharomyces*: LBGA157og, LBGA175og: e *Candida*.
Fonte: O próprio autor

3.1.2 Caracterização fisiológica das linhagens

Esse trabalho possibilitou a avaliação de características fisiológicas importantes quando da aplicação industrial de leveduras no ambiente cervejeiro. As leveduras comerciais S04 e WB06 *Fermentis*® foram utilizadas como modelo para avaliação das linhagens de interesse.

Para subsidiar a aplicação de cepas potenciais na indústria cervejeira, foram avaliados a capacidade e perfil de crescimento em meios de cultivo adicionados de glicose, maltose e extrato de malte, à temperatura de 30 °C por até 48 horas. De maneira semelhante, as linhagens tiveram performances fisiológicas testadas em meios contendo agentes estressores como etanol, resinas de lúpulo (iso- α -ácidos) e suas combinações. Complementarmente, foram avaliadas as capacidades de floculação e de formação de espuma durante a fermentação do mosto cervejeiro.

3.1.2.1 Crescimento em diferentes meios de cultivo

Os açúcares não transitam livremente pela membrana citoplasmática das células de leveduras. Sua assimilação requer proteínas transportadoras, que se ligam a esses substratos levando-os para o interior celular (Mandujano, 2019). Dentre todos os hidratos de carbono, a glicose é o açúcar prioritário para o metabolismo celular, correspondendo à fonte de carbono de mais simples utilização.

Todas as leveduras estudadas apresentaram perfis semelhantes de crescimento, seja quando utilizados meios de cultivos adicionados de glicose (YPD 2%), seja com utilização do açúcar maltose (YPM 2%). Pôde-se observar pela Figura 3.5 que o crescimento de cada cepa em glicose foi superior quando comparado ao crescimento em meio contendo maltose. Esse aspecto está intimamente ligado ao fato da maior facilidade de assimilação da glicose como fonte de carbono. Entre as linhagens, não foi observada diferença significativa de patamar de crescimentos expressos pela densidade ótica a 600 nm.

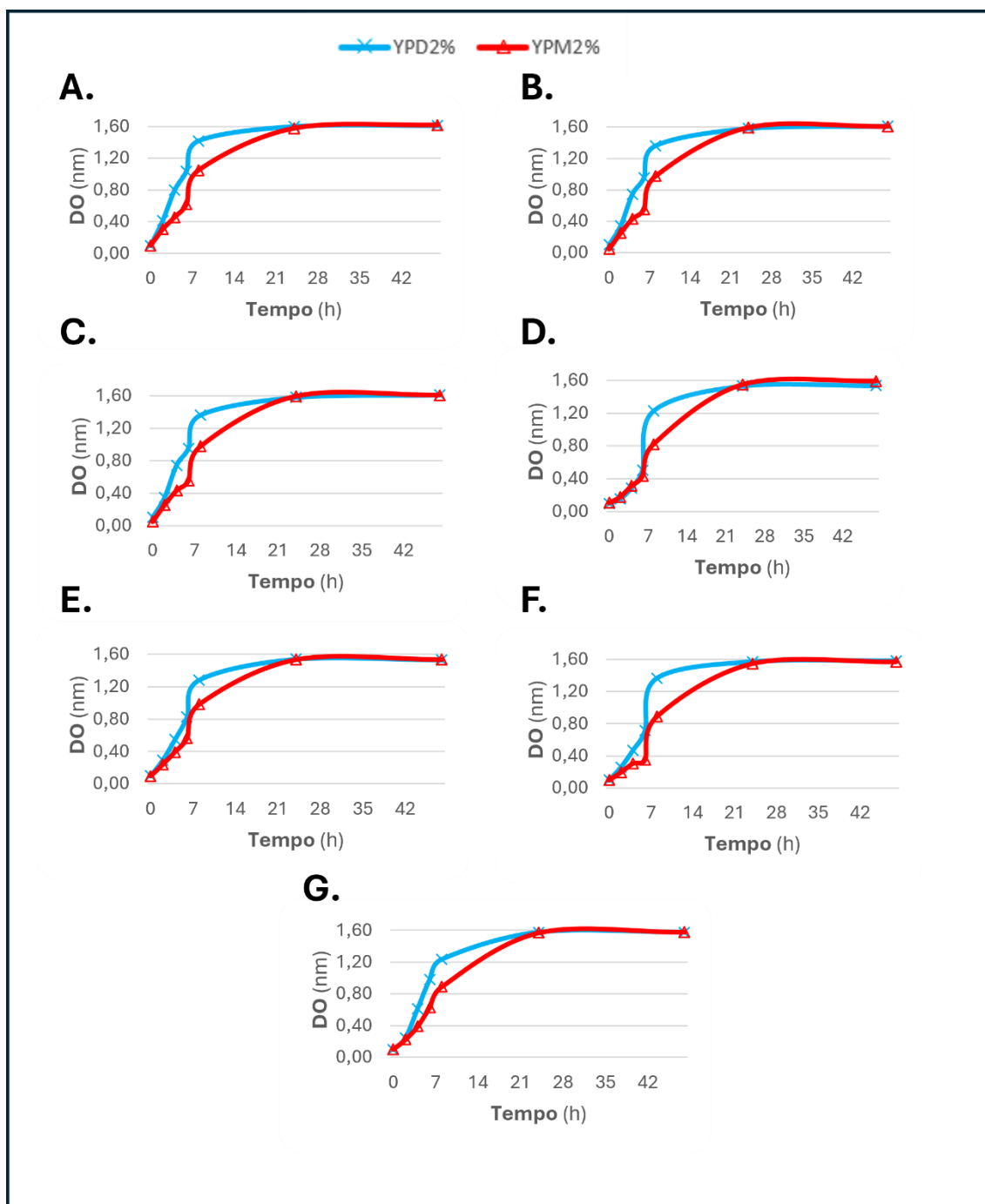


Figura 3.5 Gráficos comparativos do desempenho das leveduras a 30 °C nos meios YPD 2% e YPM 2%. Linhagens investigadas (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1. Cepas comerciais utilizadas como padrão: (F) S04® e (G) WB06®. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor

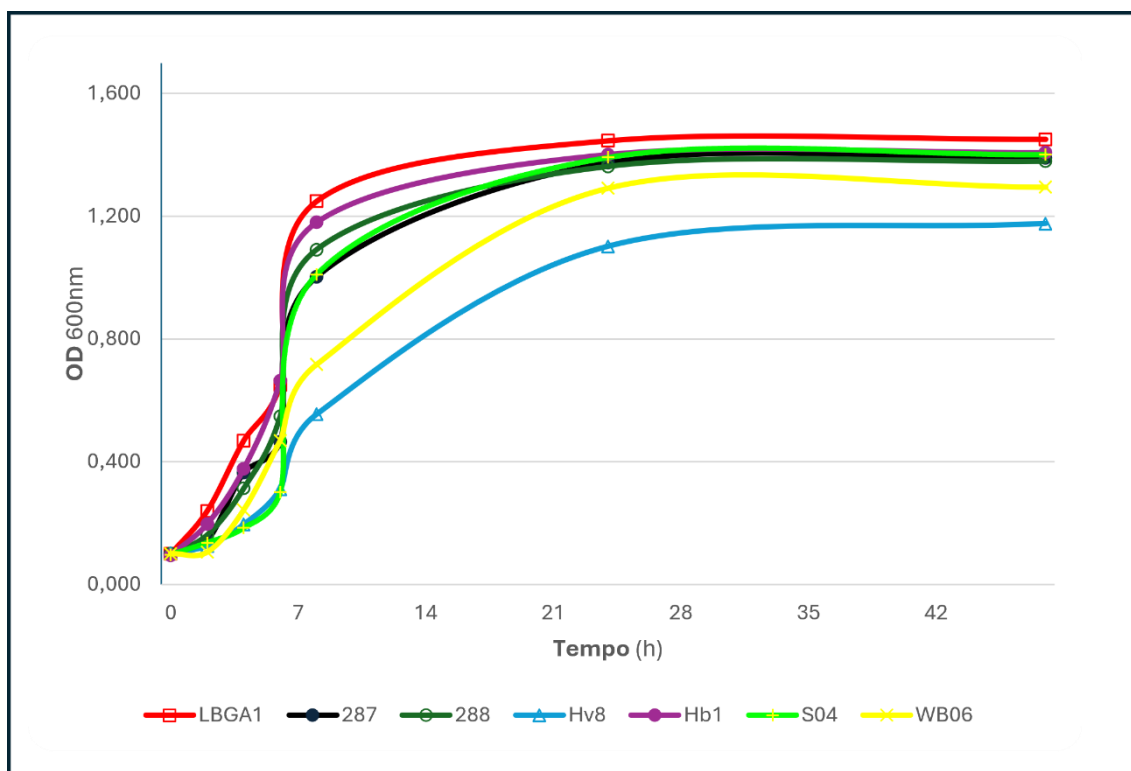


Figura 3.6 Crescimento a 30 °C das leveduras investigadas: LBGA-01, 287, 288, Hv8, Hb1. Cepas comerciais utilizadas como padrão: S04® e WB06®. Meio de crescimento Extrato de malte (EM) 2%. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: o próprio autor

O perfil de crescimento das leveduras quando cultivadas em meio adicionado de extrato de malte 2% apresentou dinâmicas pouco distintas entre as linhagens de interesse. Notadamente, a constituição desse substrato é mais complexa, tendo em sua composição vários tipos de açúcares como maltose, maltotriose, glicose, sacarose, fonte de nitrogênio assimilável de tamanhos moleculares distintos, entre outros. A composição do mosto utilizado para as micro fermentações foi obtida através de HPLC e discutida no item 3.1.3.1.

Quando vários tipos de açúcares estão presentes simultaneamente no meio de cultivo, o metabolismo dos mesmos pela levedura dar-se-á de forma sequencial. Naturalmente, açúcares mais simples como os monossacarídeos glicose e frutose tendem a serem assimilados preferencialmente. Na presença de fontes de carbono simples (monossacarídeos), maltose e maltotriose têm assimilação retardada. A absorção das fontes de carbono que predominam no mosto cervejeiro - maltose e maltotriose – acontece somente quando aproximadamente 60% da glicose foi metabolizada (Mandujano; 2019; 'AMORE, Tony; RUSSELL, Inge; STEWART,1989).

A Figura 3.6 compila os resultados de crescimento para as cepas investigadas e os dois padrões comerciais, S04 e WB06 *Fermentis*®. A cepa LBGA-01 destacou-se por demonstrar uma taxa de crescimento celular superior às demais, mantendo perfil de multiplicação celular superior desde as duas primeiras horas de cultivo até o atingimento do platô após 24 a 48 horas. A linhagem Hv8, em contrapartida, obteve a menor evolução da DO 600 nm ao longo do tempo de cultivo. Seu perfil de crescimento foi o mais lento, alcançando um platô com a menor média de densidade celular em relação às demais cepas investigadas.

De maneira geral, o padrão das curvas de crescimento sugere que as cepas investigadas apresentam considerável potencial para aplicação em processos cervejeiros. Com exceção da linhagem Hv8, todas demais apresentaram níveis de conversão de substrato em biomassa similares aos padrões comerciais utilizados pela indústria cervejeira.

3.1.2.2 Capacidade de crescimento sob pressão osmótica

As linhagens utilizadas no processo cervejeiro são frequentemente expostas à algumas condições adversas, como presença de etanol e altas concentrações de açúcares. Geralmente, a escola cervejeira Belga é uma das quais vários estilos característicos, como *Belgian Dark Strong Ale*, podem demandar concentrações de açúcares no mosto cervejeiro de até 25°P. Nessas condições, as células experimentam um ambiente hiper osmótico, com possível redução do crescimento populacional e interrupção dos processos celulares. Como resposta adaptativa, uma série de genes podem ser ativados desencadeando uma série de eventos para compensação celular (SIPICZKI, 2019; NOVAES, 2022). Por isso, o desempenho de cepas de leveduras diversas às condições de estresse poderá ser distinto, resultando em fermentações de alto ou baixo desempenho, motivando a investigação e a busca por linhagens mais bem adaptadas.

Nesse estudo, as linhagens foram crescidas em meio líquido com concentrações de extrato de malte de 20 e 25°P, tomando-se a concentração de extrato de malte 2% como referência, por até 48 horas. O crescimento celular foi verificado por

medições de DO 600 nm a cada duas horas, utilizando-se as cepas S04 e WB06 *Fermentis*® como controles comerciais.

Conforme mostra a Figura 3.7, após 48 horas de crescimento em microplacas, todas as linhagens demonstraram crescimento em extrato de malte a 20° e 25°P. As dinâmicas de crescimento apresentaram-se de forma similares ao crescimento controle. Nenhuma das cepas exibiu fase *lag* significativamente maior que as cepas comumente utilizadas no processo cervejeiro (S04® e WB06® *Fermentis*), sugerindo que as respostas adaptativas ao meio não constituiriam uma variável que determinasse prejuízo ao crescimento celular, nas concentrações experimentais, em mosto cervejeiro.

A condição de crescimento em meio líquido a 25°P foi a mais adversa para todas as linhagens avaliadas nesse ensaio. Como consequência, nem mesmo as linhagens comerciais atingiram o platô de crescimento celular após o tempo máximo de crescimento celular (48 horas).

As cepas Hv8 e WB06® *Fermentis* apresentam, conforme Figura 3.6, ritmo de crescimento relativamente menor em Extrato de malte 2% em relação às demais linhagens. Esse fato se repetiu quando o crescimento foi avaliado em elevada pressão osmótica, como pode ser visto na Figura 3.7 E e G, onde maiores fase *lag* foram observadas (8 horas).

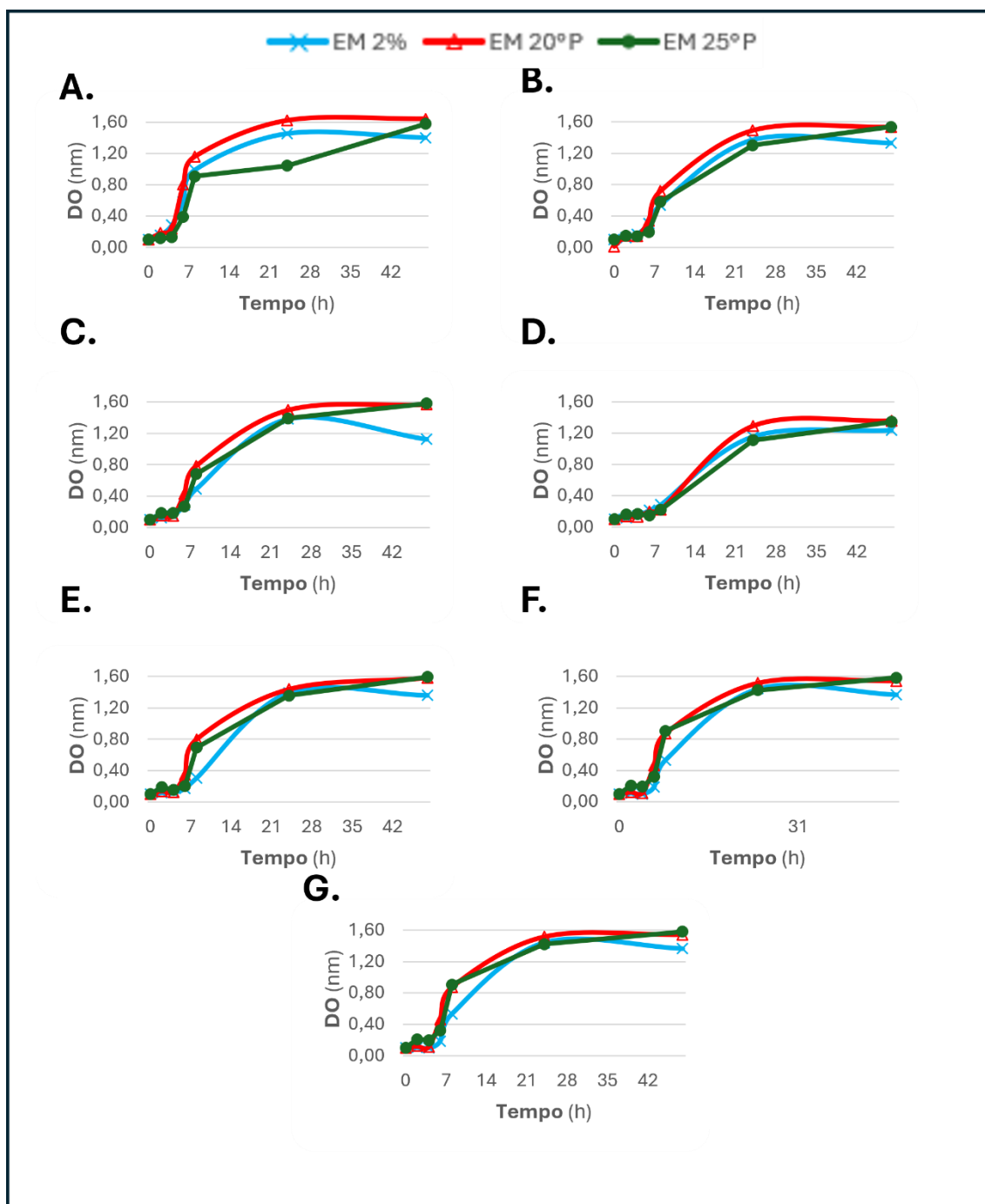


Figura 3.7 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBG-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1 e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo: Extrato de malte 20°P e Extrato de malte 25°P. Extrato de malte 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo.

3.1.2.3 Tolerância ao etanol e compostos de lúpulo

Aliada à capacidade de assimilação dos açúcares do mosto de cevada, uma levedura cervejeira deverá desempenhar suas atividades sem dificuldades quando na

presença de lúpulo. As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no processo cervejeiro dispõe de mecanismos como sequestro, acúmulo ou transporte de iso- α -ácidos que as permitem crescer em concentrações elevadas dessas substâncias (Hazelwood *et al.*, 2010).

Adicionalmente, é de grande importância que seus metabolismos não sejam afetados quando da condução de estilos de cervejas com faixas de álcool variadas. De acordo com o reportado em literatura (Hazelwood *et al.*, 2010; Basso, 2019) cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de cerveja demonstraram tolerância ao etanol em concentrações de até 15%, enquanto linhagens de *Saccharomyces pastorianus* tiveram desempenho em até 10%.

Nesse trabalho, o perfil de crescimento das leveduras foi avaliado sob duas concentrações de etanol, a saber 5% e 10% (v/v). O processo cervejeiro requer que a cerveja obtida logo após a fermentação primária (*green beer*) seja maturada, ou seja, que as células em suspensão sejam capazes de promover reações bioquímicas decisivas para a qualidade do produto final. Mesmo que menos frequentemente encontrados quando comparado com a maioria dos produtos comerciais, cervejas com teores alcóolicos na faixa de 10% são obtidas com leveduras cervejeiras, sendo, portanto, de considerável interesse o entendimento do comportamento dessas cepas nessas condições de estresse alcóolico elevado.

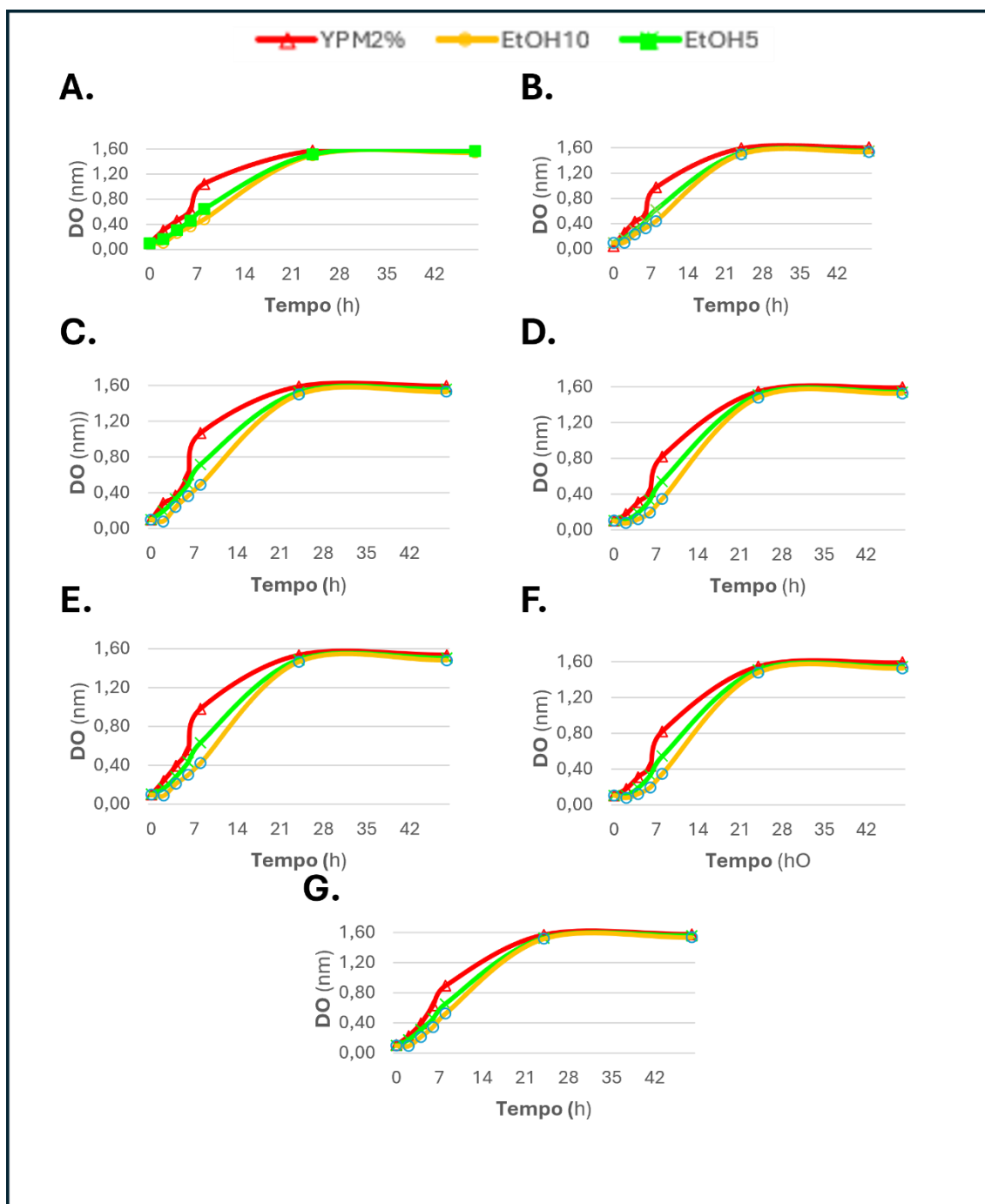


Figura 3.8 Crescimento a 30 °C das leveduras: **(A)** LBGA-01, **(B)** 287, **(C)** 288, **(D)** Hv8, **(E)** Hb1 e padrões comerciais **(F)** S04® e **(G)** WB06® nos meios contendo: — Etanol 5% (v/v) e — Etanol 10% (v/v). — YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor

O comportamento de crescimento mediante estresse alcóolico é resumido na Figura 3.8. Todas as cepas investigadas apresentaram dinâmicas de crescimento próximas, sugerindo um sutil aumento na fase *lag* quando comparado ao meio de cultivo sem o agente estressor (YPM 2%). O crescimento nas primeiras 24 horas mostrou níveis

de densidade ótica menores para a maior concentração de etanol (10%), intermediários quando empregada concentração de 5% (v/v) e maiores quando na ausência do agente de estresse (YPM 2%). Apesar da cinética de crescimento se sugerir 3 patamares, os platôs atingidos por todas as culturas se apresentaram muito próximos, indicando uma possível adaptação fisiológica pelas culturas ao longo do tempo de cultivo.

Todas as linhagens tiveram crescimento avaliado na presença de iso- α -ácidos presentes no lúpulo. Para tanto, as concentrações de 50 mg/L e 90 mg/L foram aplicadas ao meio de crescimento para exposição das células a esse fator de estresse.

Provavelmente pelo fato das cepas Hv8 e WB06 *Fermentis*® já terem apresentado, em extrato de malte 2%, dinâmica de crescimento mais lento que as demais cepas (Figura 3.7), o comportamento similar observado nesse teste poderia implicar na não interferência desse agente estressor para essas duas linhagens (Figura 3.9 D e G).

As demais cepas apresentaram um leve prolongamento da fase *lag* para o meio de crescimento de referência (Extrato de Malte 2%), ou seja, sugerindo que o tratamento poderia ter compostos que favoreceriam o equilíbrio redox das células, conforme já relatado em literatura (Curtin *et al*, 2013; Larsson, Nilvebrant and Jönsson, 2001; Basso, 2019)

De maneira geral, nenhuma linhagem demonstrou ineficiência no crescimento na presença do agente de estresse, que estariam provavelmente aptas para serem empregadas em condições de processo cervejeiro em condições similares.

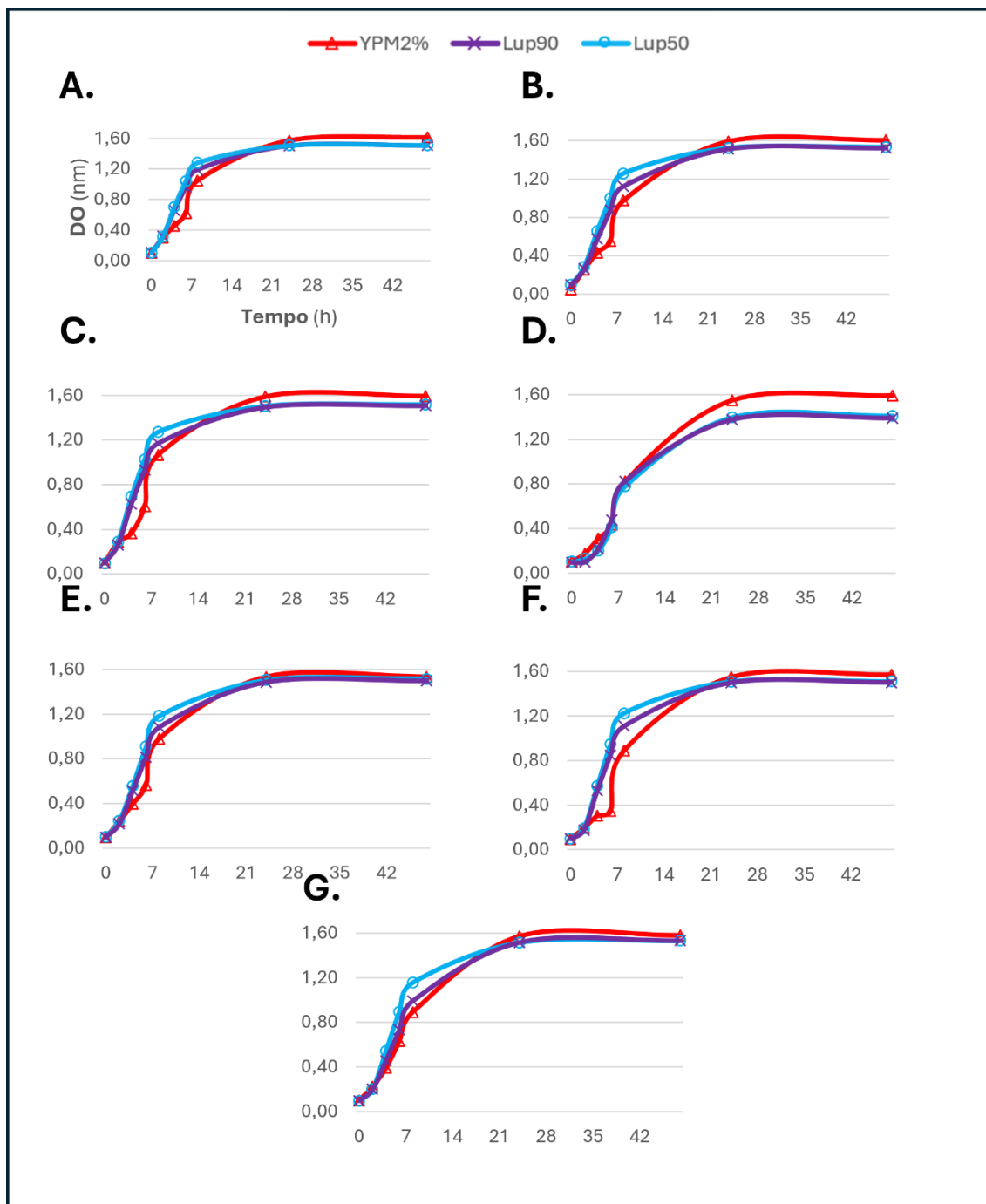


Figura 3.9 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1 e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo: —●— Lúpulo 50 ppm e —×— Lúpulo 90 ppm. —▲— YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo

Por fim, com objetivo de se testar a real capacidade de cada uma das linhagens de interesse de promover transformações importantes na cerveja recém fermentada (*green beer*), onde concentrações de etanol coexistem com resina de lúpulo, as cepas foram avaliadas com os dois fatores simultaneamente (etanol e lúpulo).

Todas as leveduras avaliadas conseguiram atingir seus respectivos platôs de crescimento nas 48 horas de teste, demonstrando capacidades similares de desenvolvimento. (Figura 3.10). De maneira similar ao observado anteriormente para outras condições de crescimento, no que se refere à exposição das linhagens a condições de estresse alcóolico, as cepas Hv8 e WB06® *Fermentis* demonstraram uma velocidade de crescimento menos pronunciada, fato já observado na ausência desses agentes estressores.

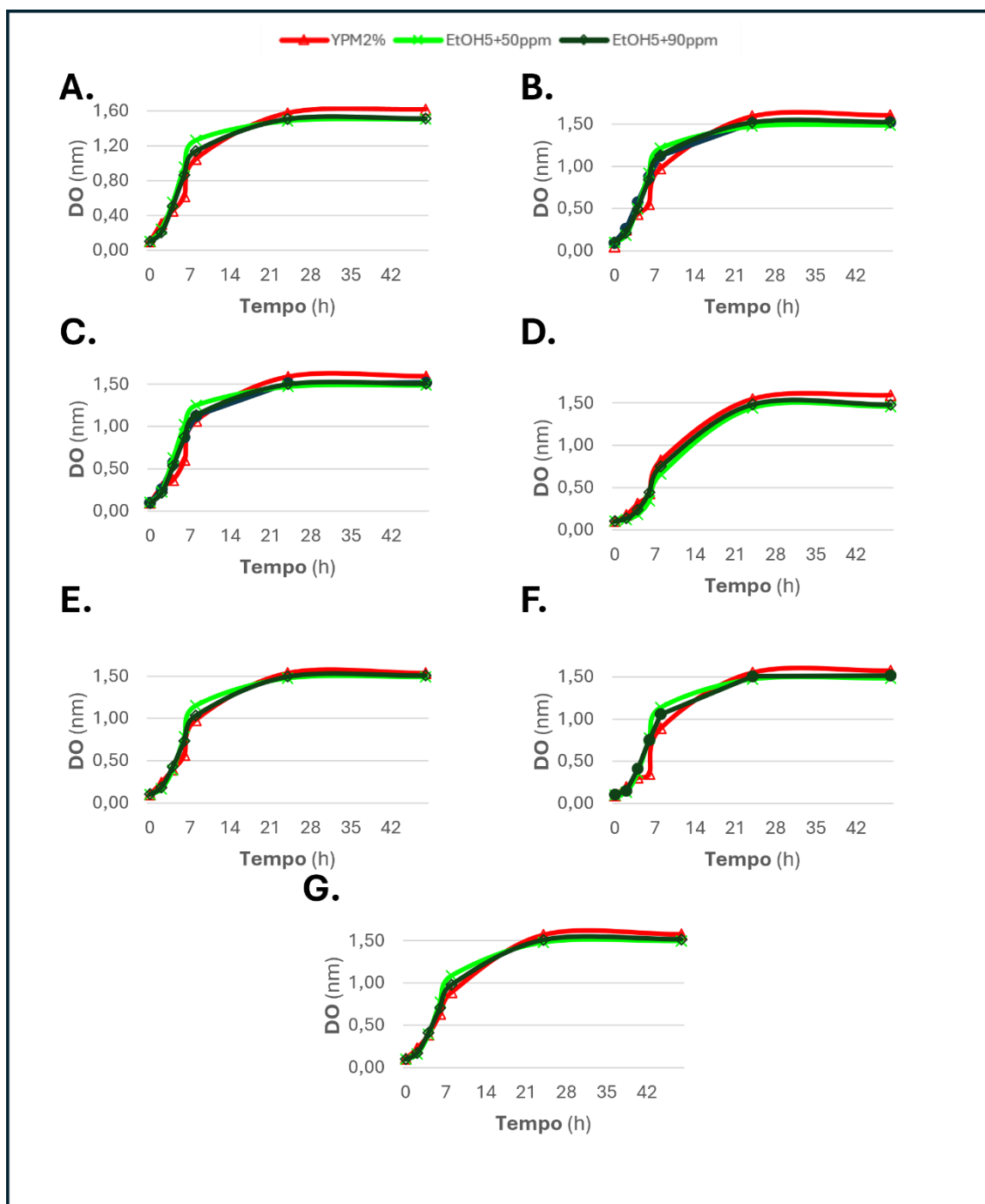


Figura 3.10 Crescimento a 30 °C das leveduras: (A) LBGA-01, (B) 287, (C) 288, (D) Hv8, (E) Hb1, e padrões comerciais (F) S04® e (G) WB06® nos meios contendo: ✕ Etanol 5% (v/v) +Lúpulo 50 ppm e ● Etanol 5% (v/v) + Lúpulo 90 ppm. ▲ YPM 2% como meio de referência. Leituras de absorbância a 600 nm em cada intervalo de tempo

3.1.2.4 Capacidade de formação de espuma

A formação de espuma durante o processo de fermentação é uma característica fenotípica de cada levedura e pode constituir um desafio tecnológico, uma vez que transcorra de forma excessiva durante o processo.

Processos tecnológicos não otimizados (arranque de fermentação excessivo, teor de oxigênio elevado, temperatura ou taxa de inóculo elevadas) e/ou cepas com características genotípicas desfavoráveis (Basso, 2019) contribuem para o espumamento de tanques fermentadores, inconvenientes na produção cervejeira. Consequentemente, perdas de produto são observadas durante transbordamentos ou ainda demandam custos e atividades operacionais de dosagem de anti-espumantes durante a fermentação.

Tabela 3.1 Altura média atingida durante fermentação de mosto 12°P

LEVEDURA	ALTURA (CM)
LBGA01	1,93 ± 0,32 a
288	1,93 ± 0,23 ab
Hb1	1,80 ± 0,26 abc
287	1,77 ± 0,15 abc
S04 Fermentis®	1,40 ± 0,17 abc
Hv08	1,23 ± 0,06 c

Médias não seguidas de mesma letra diferem estatisticamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

A Tabela 3.1 contém os valores para alturas de espumas medidos para as diferentes cepas investigadas. A linhagem LBGA-01 demonstrou maior média de altura observada (1,93 cm), estatisticamente igual à cepa 288 (1,93 cm). Entretanto, tanto LBG-01 quanto 288 apresentaram valores médios que se diferiram estatisticamente quanto à cepa Hv08 (1,23 cm). As demais cepas Hb1 com média de 1,80 cm, 287 com valor de 1,77 cm e a linhagem comercial S04 *Fermentis*® (1,40 cm), utilizada como padrão, não diferiram entre si ao nível de 0,5% de probabilidade.



Figura 3.11 Exemplo de teste de formação de espuma acima do líquido para cepas em estudo. A seta azul indica uma linhagem com baixa formação de espuma (cepa LBGA-Hv8), enquanto a seta vermelha indica uma linhagem com alta formação de espuma (cepa LBGA-01). **Fonte:** O próprio autor

A Figura 3.11 ilustra um exemplo de experimento para aferição da altura atingida pela espuma durante o processo fermentativo para diferentes cepas. Fatores como velocidade da fermentação, caráter hidrofóbico da parede celular da cepa utilizada (manoproteínas) além de tipos de peptídeos envolvidos nas várias reações bioquímicas contribuem para o efeito observado em testes de bancada ou em grandes reatores fermentativos (Basso, 2019).

3.1.2.5 Capacidade de floculação

Floculação pode ser entendido como o fenômeno pelo qual células se agregam em flocos, se separando do meio no qual estão suspensas, seja por decantação (leveduras do tipo *lager*), seja por flotação, dispondo-se na superfície do líquido (leveduras do tipo *ale*) (Stewart, 2016).

O fenômeno da floculação é um dos fatores críticos quando da escolha de leveduras para aplicação em processos industriais de fabricação de cerveja. Na indústria cervejeira, essa característica é de grande importância, representando uma maneira simples, efetiva e de baixo custo para separação das células ao término da obtenção da

cerveja verde (antes do processo de maturação) (Verstrepen *et al.*, 2003). Portanto, esse parâmetro foi avaliado e os resultados são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Capacidade de floculação (%) após 30 minutos de sedimentação celular

LEVEDURA	%
Hb1	82,1 ± 7,0 a
S04 <i>Fermentis</i> ®	68,9 ± 12,4 ab
287	67,5 ± 6,3 abcd
LBGA-01	66,3 ± 10,6 abcd
288	56,8 ± 8,6 abcde
Hv08	48,1 ± 3,7 bcdef
WB06® <i>Fermentis</i>	42,8 ± 2,0 ef

Letras iguais ao longo das linhas indicam que não houve diferença estatisticamente significativa, pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

De acordo com a literatura, linhagens utilizadas em processos industriais de obtenção de cerveja possuem floculação entre 40% e 90%, em contrapartida de cepas não floculantes que se situam entre 0% e 15% (Verstrepen *et al.*, 2003). A linhagem Hb1 apresentou maior sedimentação dentre as leveduras investigadas, com 82,1% de sedimentação celular. Em contraste, a levedura comercial WB06® *Fermentis*, característica por produzir cervejas turvas do estilo *Weissbier*, apresentou menor valor para sedimentação celular, 42,8%. A linhagem comercial S04® *Fermentis* e as cepas estudadas 287 e LBGA-01 demonstraram perfis de sedimentação semelhantes, respectivamente, com 68,9%, 67,5% e 66,3%. Ao passo que as leveduras 288 e Hv08 demonstraram uma menor redução da densidade ótica (600 nm) em relação ao controle, após 30 minutos de repouso, a saber 56,8% e 48,1%, respectivamente.

A capacidade de floculação é consequência não somente de fatores genéticos, mas também das condições do meio de fermentação, como presença de açúcares, cálcio, conteúdo de oxigênio, pH, dentre outros (Soares *et al.*, 1994; Straver *et al.*, 1992). Esse fenômeno é de difícil gerenciamento e, uma vez que mudanças fenotípicas venham a ser observadas no ambiente industrial, poucas opções estão disponíveis, dentre elas,

recorrer-se a um banco de leveduras devidamente armazenado sob condições que proporcionem estabilidade genética (-80 °C).



Figura 3.12 Ilustração de aspectos de floculação distintos entre cepas em estudo. A seta em azul indica uma linhagem com alta floculação (cepa LBGA-01), enquanto a seta vermelha indica uma linhagem com baixa floculação (cepa LBGA-Hv5). **Fonte:** O próprio autor

3.1.3 Caracterização tecnológica das linhagens -Microfermentação

A aplicação de leveduras de interesse em produções industriais é função não apenas das características fisiológica dessas linhagens, mas também intimamente relacionada aos seus aspectos tecnológicos. Dessa forma, o conhecimento de aspectos como consumo de açúcares do mosto, a cinética da fermentação e a redução do pH do produto final são complementares, constituindo premissas importantes que balizarão o mestre cervejeiro quando da aplicação dessas leveduras no processo cervejeiro.

3.1.3.1 Metabolismo de açúcares

Amostras coletadas após *lagering* para as respectivas cervejas tiveram seus parâmetros físico-químicos avaliados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Conforme Tabela 3.3, tais parâmetros compreendem valores para açúcares residuais (glicose, maltose e maltotriose) e metabólitos produzidos como ácidos orgânicos, etanol e glicerol.

Dentre os resultados observados é de grande relevância o fato de todas as leveduras investigadas apresentarem capacidade de fermentação de maltose, principal açúcar do mosto cervejeiro. A cepa comercial WB06® Fermentis apresentou a maior capacidade de metabolização do açúcar maltotriose (residual de 1,17 +/-0,01), enquanto todas as cepas investigadas demonstraram capacidade de consumo dessa fonte de carbono muito aquém da linhagem tipicamente utilizada para as cervejas de trigo alemãs (WB06). Interessantemente, essas linhagens se equipararam quanto ao consumo dessa fonte de carbono relativamente complexa ao padrão comercial S04® Fermentis, tipicamente utilizado nas fermentações de cervejas de estilos ingleses.

Os valores de etanol obtidos são satisfatórios e coerentes com as faixas de atenuação aparente obtidas (Tabela 2.10). As cepas investigadas apresentaram resultados alcóolicos estatisticamente iguais à cepa comercial S04® Fermentis e ligeiramente inferior à cepa comercial WB06® Fermentis, sabidamente conhecida por seu caráter atenuante elevado dentre as leveduras comerciais da atualidade.

Tabela 3.3 Resultados físico-químicos obtidos por HPLC para cervejas obtidas por micro fermentação

	LBGA-01	287	288	Hv8	Hb1	S04	WB06
Maltotriose (g/L)	11,98±0,26 ^a	11,85±0,31 ^{ab}	11,78±0,25 ^{abcd}	10,30±0,72 ^f	10,91±0,65 ^{bcde}	11,79±0,32 ^{abc}	1,17±0,01 ^g
Maltose (g/L)	0,63±0,03 ^b	0,60±0,02 ^b	1,19±1,18 ^b	1,23±1,03 ^b	6,49±4,49 ^a	0,61±0,02 ^b	1,26±0,02 ^b
Glicose (g/L)	0,41±0,03 ^a	0,40±0,03 ^a	0,40±0,02 ^a	0,35±0,03 ^a	0,41±0,04 ^a	0,40±0,03 ^a	0,14±0,09 ^b
Succinato (g/L)	0,03±0,05 ^c	0,04±0,07 ^c	0,04±0,07 ^c	0,20±0,03 ^b	0,00±0,00 ^d	0,03±0,06 ^c	0,48±0,11 ^a
Lactato (g/L)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Glicerol (g/L)	1,79±0,08 ^a	1,73±0,09 ^a	1,77±0,16 ^a	1,59±0,11 ^{ab}	1,27±0,09 ^b	1,88±0,09 ^a	1,66±0,24 ^a
Acetato (g/L)	0,47±0,12 ^a	0,11±0,21 ^a	0,00±0,00 ^b	0,29±0,20 ^a	0,38±0,13 ^a	0,29±0,22 ^a	0,54±0,27 ^a
Etanol (%)	2,45±0,05 ^b	2,38±0,14 ^b	2,41±0,11 ^b	2,43±0,05 ^b	2,28±0,16 ^b	2,42±0,18 ^b	3,14±0,19 ^a

Nota: Letras iguais em uma mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a $p < 0,05$. Fonte: O próprio autor

Como exposto anteriormente, os ácidos orgânicos são de grande importância para a formação do *flavor* da cerveja, ao mesmo tempo promovendo a redução do pH e o aumento da estabilidade microbiológica da bebida (Garcia, 2017). Os resultados obtidos por HPLC resumidos na Tabela 3.3 mostram diferença estatística entre os patamares atingidos pelas diferentes cepas, sem, entretanto, ultrapassarem faixas comumente encontradas em processos industriais

O glicerol é um dos principais subprodutos da fermentação. É produzido no processo incompleto de oxidação de açúcares na ausência de oxigênio, sendo, assim, uma forma alternativa para manutenção do equilíbrio redox celular (Lorca Mandujano, 2018). Os valores observados não diferiram estatisticamente entre as cepas analisadas e os controles comerciais, podendo contribuir positivamente para a viscosidade e percepção do corpo da bebida final (Walker & Stewart, 2016). Essas concentrações mostraram-se muito próximas de valores observados durante obtenção de cervejas do estilo American Pale Ale por VIANA (2021).

Tabela 3.4 Utilização percentual de açúcares do mosto cervejeiro por linhagens-teste e padrões comerciais

Utilização de principais açúcares (%)			
	Glicose	Maltose	Maltotriose
LBGA-01	94,34 ± 0,82	99,00 ± 4,52	11,76 ± 1,07
287	94,40 ± 0,81	99,04 ± 4,52	12,76 ± 1,09
288	94,44 ± 0,81	98,09 ± 4,51	13,27 ± 1,06
Hv8	95,10 ± 0,82	98,03 ± 4,49	24,17 ± 1,30
Hb1	94,37 ± 0,82	89,60 ± 4,52	19,66 ± 1,26
S04®	94,47 ± 0,82	99,02 ± 4,51	13,14 ± 1,10
WB06®	98,02 ± 0,85	97,99 ± 4,39	91,38 ± 0,94

Fonte: Próprio autor

Como mostra a Tabela 3.4 acima, nem todas as linhagens avaliadas mostraram capacidade de metabolizar os principais açúcares do mosto cervejeiro, maltose e maltotriose. Com relação ao consumo de maltose, somente a cepa “Hb1” apresentou um menor patamar de assimilação desse açúcar, aproximadamente em 10 pontos percentuais. Quando avaliado o consumo do açúcar maltotriose, a cepa comercial WB06® apresentou maior consumo do referido carboidrato (91,38%), enquanto a linhagem comercial S04® e as cinco outras investigadas nesse trabalho mostraram assimilações consideravelmente reduzidas (entre 13 e 24%). Tal fato está de acordo com observação em literatura anterior (Meier-Dörnberger *et al.*, 2017b).

3.1.3.2 Cinética fermentativa

Para avaliação da dinâmica fermentativa, leituras do teor de extrato foram realizadas a cada 24 horas para cada uma das linhagens estudadas, conforme pode ser visto na Figura 3.13.

A maior taxa de consumo de açúcares foi observada para cepa comercial WB06 Fermentis®, sendo essa também a linhagem que atingiu o menor valor para o extrato aparente final (2,2°P) após 216 horas de fermentação.

Em contrapartida, observou-se um perfil bastante próximo para as demais cepas investigadas (LBGA-01, 287, 288, Hv8, Hb1 e S04 Fermentis®) tendo atingido

densidade aparente final entre 3,9 e 4,2°P. Enquanto a linhagem LBGA-01 teve seu extrato final estabilizado após 216 horas, a cepa 288 foi a mais precoce, encerrando o consumo de açúcares com 144 horas de processo.

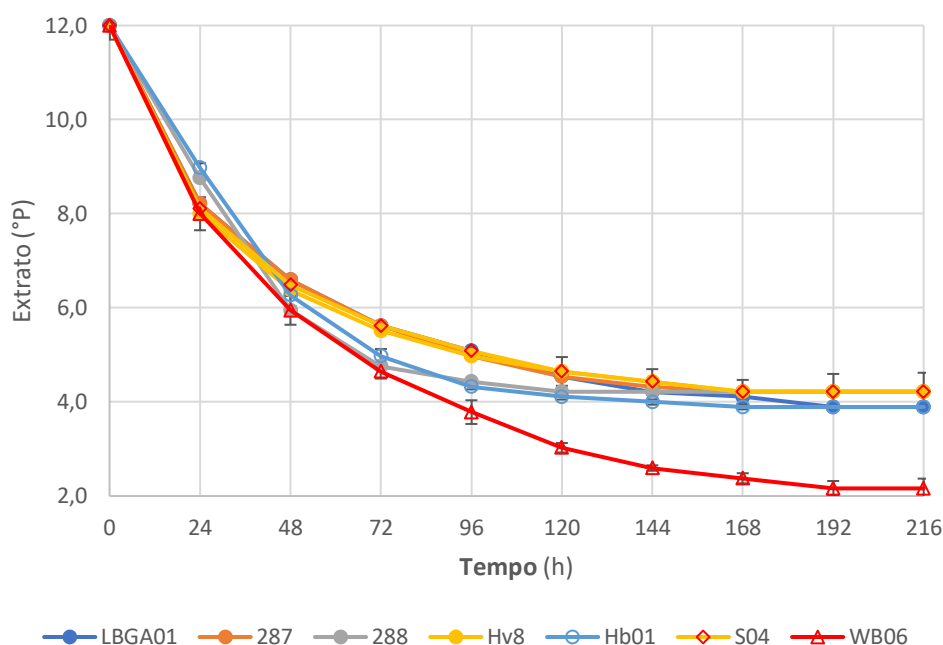


Figura 3.13 Evolução do extrato a partir de mosto de cevada 12°P durante processo fermentativo conduzido a 20 °C para as cepas investigadas: LBGA-01, 287, 288, Hv8 e Hb1 nos tempos de 0 a 216 horas. Os controles comerciais S04® e WB06® foram utilizados como referência de leveduras, respectivamente, de média e elevada atenuação. Valores hachurados correspondem às densidades finais para cada cepa, em triplicata. Nível de confiança de 95%

Dois patamares de atenuação podem ser observados quando da comparação dos resultados de atenuação aparente para as cepas analisadas, conforme a Tabela 3.5.

A cepa comercial WB06® Fermentis, tradicionalmente utilizada na produção das *Weissbiers* ou cervejas de trigo alemãs, é também conhecida no meio cervejeiro por conferir perfil “seco” às suas cervejas. Os resultados nesse estudo corroboram para tais características, possuindo o maior nível de atenuação aparente observado após 216 horas.

As diferentes taxas de fermentação e atenuação estão intimamente ligadas à capacidade de cada microrganismo consumir maltose e maltotriose, dois dos principais açúcares presentes no mosto cervejeiro. Os valores próximos e relativamente baixos de atenuação aparente para as cepas LBGA-01, 287, 288, Hv8 e Hb1, assim como para o padrão comercial S04 Fermentis® são consequência do metabolismo comedido do açúcar maltotriose, como já anteriormente resumido na Tabela 3.4.

Tabela 3.5 Atenuação aparente (%) de cervejas após micro fermentações em triplicata

Atenuação aparente (AA %)							
	LBGA-01	287	288	Hv8	Hb1	S04®	WB06®
AA %	67,87 ± 0,52	64,86 ± 0,90	64,86 ± 0,90	65,17 ± 1,88	67,87 ± 1,38	64,56 ± 0,52	82,58 ± 0,52
Tempo fermentação (h)	216	192	144	192	192	192	216

Nota: Atenuação aparente final (AA%) para cervejas obtidas por micro fermentação e respectivos tempos de estabilização do extrato final para as cepas investigadas LBGA-01, 287, 288, Hv8, Hb1. Padrões comerciais S04® e WB06®. Nível de confiança de 95%

3.1.3.3 Evolução do pH

A cerveja é um meio intrinsecamente resistente ao crescimento de vários microrganismos deteriorantes e patógenos. O fato desse fermentado ser seletivo ao crescimento de vários tipos de microrganismos deve-se a uma combinação de fatores como presença de etanol (tipicamente de 3,5 a 5% v/v), composição de resinas de lúpulo (*Humulus lupulus*) (teor de iso- α -ácidos de aproximadamente de 17 a 55 ppm), elevada concentração de gás carbônico (aproximadamente 0,5% p/p), baixa concentração em oxigênio dissolvido (abaixo de 0,1 ppm), baixos valores de pH (aproximadamente de 3,9 a 4,4), além de constituir-se em um meio pobre em nutrientes (Vriesekoop, Frank, *et al.*, 2012).

A Tabela 3.6 compila os dados de pH ao longo do processo de micro fermentação, durante as primeiras 96 horas de processo, ao término da fermentação

primária e após maturação da cerveja obtida. Como pode ser observado, a redução nos valores de pH variou entre 0,8 e 1,2 e o tempo de atingimento de seus níveis mínimos variou para cada linhagem analisada. Esses valores são bem próximos de valores encontrados na literatura (Andrion, 2022).

As cepas LGBA-01 e Hb1 atingiram pH mínimo ao término da fermentação primária. De forma semelhantes, as linhagens 287 e o padrão comercial S04[®] atingiram estabilização do pH após a obtenção da *greenbeer* (cerveja logo após finalização da fermentação primária), sinalizando uma tendência de leve acréscimo logo após o processo de maturação. Tal efeito está relacionado com a excreção de metabólitos e com a assimilação e metabolismo de piruvato residual (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a) sendo considerado dentro da normalidade até um ganho de 0,1 unidade. Por outro lado, as três últimas linhagens 288, Hv8 e WB06[®] tiveram pH estabilizados após a maturação, sendo as últimas duas linhagens (Hv8 e WB06[®]) detentoras das maiores capacidades de acidificação (Δ pH 1,2) quando comparadas às demais leveduras avaliadas.

A dinâmica de redução do pH durante a obtenção de cervejas por micro fermentação apresentou-se de maneira similar aos dados encontrados na literatura (Loh, Li Xuan, et al., 2021; Bellut, Konstantin, et al., 2019; Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a).

Tabela 3.6 Redução do pH durante a fermentação primária e após maturação

Valores de pH durante fermentação primária e após maturação							
Cepa investigada	0 h	24 h	48 h	96 h	Após Fermentação	Após Maturação	Δ pH
LGBA1	5,21	4,35	4,35	4,33	4,31	4,31 $\pm$ 0,05	0,9
287	5,21	4,40	4,40	4,38	4,37	4,38 $\pm$ 0,05	0,8
288	5,21	4,38	4,37	4,37	4,34	4,32 $\pm$ 0,09	0,9
Hv8	5,21	4,15	4,20	4,15	4,00	3,98 $\pm$ 0,06	1,2
Hb1	5,21	4,39	4,40	4,39	4,35	4,35 $\pm$ 0,03	0,9
S04[®]	5,21	4,47	4,39	4,33	4,25	4,26 $\pm$ 0,07	1,0
WB06[®]	5,21	4,28	4,28	4,28	4,00	3,97 $\pm$ 0,05	1,2

Fonte: O próprio autor

3.1.3.4 Phenolic Off Flavor (POF)

POF são produzidos pela descarboxilação do ácido ferúlico, cumárico e cinâmico presentes no mosto cervejeiro (Bellut, Konstantin, et al., 2018).

A descarboxilação do ácido ferúlico gera o composto 4-vinil guaiacol (4-VG), percebido pelo aroma condimentado semelhante a cravo-da-índia. Da descarboxilação do ácido cumárico é gerado 4-vinil fenol, de aroma semelhante a “solvente” ou “medicinal”, enquanto o processo equivalente a partir do ácido cinâmico leva a formação do 4-vinil estireno, que remete a isopor (Coghe, Stefan, et al., 2004; Hutzler, M., et al., 2015; Scholtes, Caroline, et al., 2014).

Leveduras empregadas na fabricação de bebidas alcóolicas preferencialmente não deveriam produzir aromas indesejáveis. Apesar de aceito em alguns estilos de cervejas especiais como as cervejas de trigo alemãs e alguns estilos belgas como as Blond Ales, a presença de 4-VG, é prevalentemente indesejável em saques, vinhos e na maioria dos estilos de cervejas (Gallone et al., 2016).

A Tabela 3.7 mostra os resultados de avaliação sensorial dos painelistas por cheiro direto das placas preparadas (item 2.5.6), tanto para as linhagens em estudo quanto para os controles positivo (WB06®) e negativo (US05®). Como pode ser observado, todas as cinco linhagens promoveram a descarboxilação dos respectivos precursores e produção de aromas perceptíveis. A linhagem 287 demonstrou “*buquê*” aromático menos intenso, remetendo principalmente a aroma a cravo-da-índia.

Os resultados obtidos sugeriram, portanto, que os genes Ácido Fenil Acrílico Descarboxilase (*PAD1*) e/ou Ácido Ferúlico Descarboxilase (*FDC1*) estariam ativos ou conservados nessas linhagens (Richard; et al., 2015).

Tabela 3.7 Resultados sensoriais do teste de *Phenolic Off Flavor* (POF)

LEVEDURA	LBGA-01	287	288	Hv08	Hb1	US05 <i>Fermentis</i> ®	WB06 <i>Fermentis</i> ®
4-vinil-guaiacol / ácido ferúlico	+	+	+	+	+	-	+
4-vinil-fenol / ácido cumárico	+	+	+	+	+	-	+
4-vinil-estireno / ácido cinâmico	+	+	+	+	+	-	+

Nota: “+” e “-” representam, respectivamente, presença e ausência do aroma investigado. Linhagens investigadas: LBGA-01, 287 e Hv8. Linhagem referência: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor

3.1.4 Caracterização das linhagens selecionadas para avaliação sensorial

Das cinco linhagens investigadas por micro fermentação em bancada, a saber LBGA-01, 287, 288, Hv8 e Hb1, três cepas foram escolhidas para realização de fermentações em maior volume conforme Item 2.7.2.

Todas cinco linhagens investigadas apresentaram características fenotípicas e aromáticas relativamente semelhantes. Com exceção das linhagens LBGA-01, proveniente de estudos anteriores de termo resistência (Souza, 2018; Prado, 2020) e Hv8, isolada em ambiente de fabricação de vinho (Novaes, 2022), era de conhecimento prévio a capacidade de metabolização de açúcares do mosto cervejeiro pelas cepas 287 e 288 (Lorca Mandujano, 2018).

Dessarte, a escolha de três cepas para condução dos testes sensoriais foi baseada na estratégia de investigação de um *pool* de exemplares biológicos contendo uma linhagem termotolerante (LBGA-01), uma linhagem proveniente de ambiente vinícola (Hv8) e, finalmente, uma representante dentre as linhagens já evoluídas a partir de usinas sucroalcooleiras (287, 288 ou Hb1).

O fato do híbrido Hb1 (S88c + 287) não apresentar diferenças fenotípicas significativas, direcionou o foco para a linhagem 287, da qual obteve sua descendência. E, por último, entre as cepas 287 e 288, o desempenho sensorial da primeira (287)

demonstrou uma impressão aromática mais sutil e agradável, através da apresentação de um “buquê” condimentado mais sutil. Por outro lado, a linhagem 288 apresentou o menor tempo de processo nos testes de micro fermentação, mesmo na presença de açúcares disponíveis na cerveja recém obtida (144 horas), somando-se o fato de possuir característica de baixa floculação.

Nesse sentido, as linhagens escolhidas para a obtenção de cervejas de interesse sensorial foram LBGA-01, 287 e Hv8. O padrão comercial WB06® Fermentis foi designado por ser POF⁺, semelhantemente a todas as linhagens avaliadas no presente estudo.

3.1.4.1 Perfil Físico-químico das cervejas obtidas

Para que possíveis interferências sensoriais fossem eliminadas, o mosto cervejeiro foi produzido conforme processo industrial, ao invés de simples dissolução e fervura de extrato de malte em água cervejeira. O processo utilizado foi a mosturação ou brasagem onde a mistura dos maltes moídos é embebida em água e diversas temperaturas são aplicadas. Ao término do processamento, o mosto clarificado, lupulado e resfriado obtido segue para a etapa de fermentação.

A Tabela 3.8 resume as características do mosto cervejeiro obtido. A fim de manter-se o padrão de substrato e nutrientes disponíveis para a fermentação com cepas de interesse sensorial, o mosto foi padronizado a 12°P ($12,15 \pm 0,15$ P), apresentando uma fração de nitrogênio assimilável (FAN) próximo de 268 mg/L. O perfil dos principais açúcares do mosto cervejeiro foi também analisado, somando um teor de 81,79 g/L de açúcares totais, englobando glicose, maltose e maltotriose. As faixas encontradas estão de acordo com valores citados anteriormente pela literatura (Garcia, 2017).

Tabela 3.8 Composição do mosto cervejeiro obtido por processo de mosturação, medida em triplicata antes do processo de fermentação

Composição Mosto Cervejeiro		
Parâmetro	Unidade	Valor
Extrato	°P (graus Plato)	$12,15 \pm 0,15$
pH	-	$5,25 \pm 0,01$
Densidade específica 20/20 °C	g/cm ³	$1,049 \pm 0,005$

<i>Free Amino Nitrogen (FAN)</i>	mg/L	268 ± 20
Açúcares totais	g/L	81,79 ± 2,90
Glicose	g/L	13,52 ± 0,60
Maltose	g/L	48,60 ± 1,90
Maltotriose	g/L	19,66 ± 0,40

Fonte: O próprio autor

O processo fermentativo foi conduzido conforme descrito no Item 2.7.2, com a finalização da fermentação primária após repetição do extrato aparente final em 24 horas. Posteriormente a cerveja foi maturada em câmara fria a 10 °C por 10 dias, seguindo para etapa de *lagering* em barril (0 °C por 7 dias). Amostras foram coletadas e resultados a partir de HPLC são resumidos na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 Resultados físico-químicos a partir de HPLC para cervejas de interesse sensorial

	LBGA-01	287	Hv8	WB06®
Maltotriose (g/L)	15,46±3,92 ^a	15,12±2,15 ^a	14,13±3,16 ^a	6,70±2,66 ^b
Maltose (g/L)	2,87±1,08 ^a	2,30±0,35 ^a	12,70±9,72 ^b	2,39±0,17 ^a
Glicose (g/L)	0,34±0,15 ^a	0,27±0,06 ^a	0,56±0,15 ^b	0,29±0,01 ^a
Succinato (g/L)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,07±0,11 ^b	0,22±0,06 ^c
Lactato (g/L)	0,16±0,08 ^a	0,17±0,02 ^a	0,16±0,08 ^a	0,25±0,04 ^a
Glicerol (g/L)	1,63±0,41 ^a	1,48±0,20 ^a	1,73±0,40 ^a	1,86±0,15 ^a
Acetato (g/L)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,13±0,20 ^a	0,00±0,00 ^a

Nota: Letras iguais em uma mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a $p < 0,05$. Linhagens investigadas: LBGA-01, 287 e Hv8. Linhagem referência: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor

As cervejas obtidas para avaliação sensorial mediante o emprego das 3 linhagens selecionadas não demonstraram diferenças marcantes quanto à produção de co-produtos da fermentação (Tabela 3.9). Em termos de ácidos orgânicos (succínico, láctico e acético), substâncias importantes para formação do caráter aromático e refrescante da bebida, todas cepas apresentaram perfil próximo entre si e com relação ao controle comercial. Paralelamente, os teores de glicerol obtidos, corroboram os

resultados obtidos nas micro fermentações (Tabela 3.3), sugerindo que os processos bioquímicos estariam mantendo equilíbrio redox celular sem dificuldades ou alterações abruptas. Os valores encontrados não diferiram estatisticamente entre as cepas analisadas e os controles comerciais.

Tabela 3.10 Percentual médio da utilização dos principais açúcares no mosto cervejeiro

Utilização de principais açúcares (%)			
	Glicose	Maltose	Maltotriose
LBGA01	97,40 ± 0,55	94,10 ± 1,60	21,38 ± 1,07
287	97,89 ± 0,55	95,27 ± 4,52	23,10 ± 1,09
Hv8	95,68 ± 0,40	73,88 ± 4,49	25,63 ± 1,30
WB06®	97,78 ± 0,85	95,08 ± 4,39	65,92 ± 0,94

Nota: Medidas em triplicata, após maturação e *lagering*. Linhagens investigadas: LBGA-01, 287 e Hv8. Linhagem referência: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor

Apesar do mosto cervejeiro ser um meio complexo, é de se observar (Tabela 3.10), que todas as linhagens metabolizaram significativamente os açúcares glicose e maltose, com percentuais médios de utilização superiores a 94,0%. Todavia, a linhagem Hv8, isolada a partir do ambiente de fabricação de vinho, demonstrou a menor capacidade de consumo de maltose, aproximadamente 73,88%. A otimização do processo cervejeiro depende do eficiente consumo de maltose e maltotriose. Geralmente as leveduras cervejeiras apresentam menor capacidade de assimilação de maltotriose, sendo também um dos últimos açúcares a serem metabolizados (Hollatz, 2004). Nesse estudo, as linhagens investigadas apresentaram níveis reduzidos de consumo de maltotriose, variando de 21,0 a 25,0%, em contraste com o controle comercial (65,92 %). Os resultados sugerem que o grau de utilização desses substratos depende do tipo de linhagem em questão, logicamente mais pronunciado em uma levedura comercial adaptada ao processo cervejeiro (WB06®).

A Tabela 3.11 permite a comparação do grau de atenuação aparente e o tempo de processo total para as linhagens utilizadas. Muito provavelmente, devido às diferentes habilidades de metabolização dos açúcares do mosto cervejeiro e grau de assimilação do nitrogênio disponível (FAN), as cepas investigadas apresentam cinéticas

fermentativas distintas, resultando em tempo de processos distintos (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a). As densidades finais foram alcançadas com 192 horas para as cepas 287 e Hv8 e 216 horas para a linhagem LBGA-01. A levedura comercial WB06® atingiu final de processo somente com 10 dias de processo (240 horas), dinâmica também já observada nos testes de bancada (Figura 3.13).

Tabela 3.11 Resultados físico-químicos, atenuação aparente (%) e tempo de fermentação para cervejas de interesse sensorial

	LBGA-01	287	Hv8	WB06®
AA %	61,84 ± 0,50	62,08 ± 0,90	60,28 ± 1,88	80,09 ± 0,52
Tempo fermentação (h)	216	192	192	240
FAN (mg/L)	162 ± 10	234 ± 15	135 ± 15	74 ± 10
Etanol (%)	3,74 ± 0,10	4,45 ± 0,10	3,89 ± 0,07	5,13 ± 0,11
pH	4,18 ± 0,01	4,59 ± 0,02	4,56 ± 0,02	4,20 ± 0,01
Dicetonas vicinais (mg/L)	0,06 ± 0,001	0,08 ± 0,001	0,06 ± 0,001	0,05 ± 0,001

Nota: Medidas em triplicata para cervejas de interesse sensorial após maturação e *lagering*. Linhagens investigadas: LBGA-01, 287 e Hv8. Padrão comercial: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor.

O nitrogênio assimilável presente no mosto cervejeiro (FAN) é utilizado pela levedura para funções biológicas diversas, como as atividades de crescimento celular e a produção de enzimas de interesse bioquímico. Portanto, níveis adequados de fonte de nitrogênio afetam profundamente a performance fermentativa em vários aspectos (O'Connor *et al.*, 2018). O maior valor de assimilação de FAN foi observado para a cepa comercial WB06®, com valor residual de 74 mg/L, enquanto as leveduras investigadas LBGA-01 e Hv8 finalizaram a etapa de *lagering* respectivamente com 162 e 135 mg/L. A linhagem 287 mostrou menor nível de assimilação, finalizando a fermentação com 234 mg/L. Interessantemente, foi a fermentação que apresentou maior teor alcoólico (4,45%) e menor redução do pH do meio (4,59).

Os níveis de dicetonas vicinais obtidos (2,3-pentanediona e 2, 3-butanodiona ou diacetil) foram menores de que o limite de percepção *Threshold* para *lagers* (0,1 ppm), independentemente de as linhagens serem selvagens ou padrão (WB06® Fermentis). A concentração desse grupo de substâncias é tida pelo mestre cervejeiro como uma medida objetiva do grau de maturação da cerveja em processo, servindo como parâmetro qualitativo de liberação pelo Controle de Qualidade.

3.1.4.2 Caracterização de voláteis produzidos durante fermentação

Tabela 3.12 Perfil de voláteis obtidos por Cromatografia gasosa (GC) para cervejas de interesse sensorial

Subprodutos da fermentação (mg/L)				
	LBGA-01	287	Hv8	WB06®
Acetaldeído	27,633	6,732	9,158	6,762
DMS	0,222	0,226	0,272	0,375
Acetato de etila	25,561	17,463	21,439	44,975
Acetato de isoamila	1,430	1,155	1,410	3,071
Hexanoato de etila	0,178	0,272	0,366	0,341
$\sum$ Ésteres	27,169	18,890	23,215	48,387
Isobutanol	44,819	18,069	21,512	33,560
<i>n</i> -Propanol	73,320	51,958	57,954	338,994
Álcool isoamílico	91,869	54,335	64,718	111,929
$\sum$ Álcoois Superiores	210,008	124,362	144,184	484,483

Nota: Resultados obtidos por GC em cerveja após maturação (10 dias a 10 °C) e *lagering* (7 dias a 0 °C).

Fone: O próprio autor

Álcoois superiores são os compostos sensoriais mais abundantes presentes na cerveja (Pires *et al.*, 2014). Resultantes do metabolismo de absorção de diversos aminoácidos, essas substâncias são reconhecidas por conferir notas aromáticas que remetem à solvente, alcóolico e banana à cerveja. O conteúdo obtido por GC mostrou grande amplitude para substância *n*-Propanol, variando de uma máxima concentração de 338,994 mg/L, no padrão comercial WB06®, até o valor de 51,598 mg/L para a linhagem 287, menor patamar observado. Todas as linhagens, portanto, apresentaram

concentração abaixo do limiar de percepção. Com exceção da linhagem 287, ambas LBGA-01 e Hv8 apresentaram concentrações acima do Limiar de detecção (*Threshold*) para Álcool Isoamílico (50 a 65 ppm). O mesmo sucedeu para a linhagem controle comercial WB06®, com 111,929 mg/L. Esse composto confere, individualmente, aroma frutado e alcóolico ao produto acabado, muito comumente encontrado nos exemplares de cerveja de trigo *Weissbiers* obtidas com fermentações a partir de WB06®. Em resumo, as linhagens testadas produziram de ¼ à ½ da concentração do somatório de álcoois superiores exibidos pelo padrão comercial.

Considerados *off flavors*, acetaldeído e dicetonas vicinais fazem parte do *pool* de substâncias responsáveis pelo caráter imaturo da cerveja recém produzida, ou *green beer* (Meier-Dörnberg *et al.*, 2017b). Se por um lado as concentrações de dicetonas vicinais apresentaram-se abaixo do limite de percepção aromática (Tabela 3.11), no tocante ao componente acetaldeído a linhagem LBGA-01 foi a única a apresentar valores acima do limiar de detecção (*threshold*) de 25 mg/L. Aromas de “grama cortada” e “maçã verde” estão associados a esse composto carbonílico, quando acima do limiar de percepção.

A concentração de DMS (dimetil sulfureto) na cerveja varia normalmente entre 0,01 e 0,15 mg/L (Andrion, 2022), significativamente produzido no mosto cervejeiro nas etapas quentes da Fervura e Decantação (*Whirlpool*). Acima do limite de percepção (0,025 mg/L) essa substância confere aromas de legumes cozidos ou milho à cerveja. Todas as cepas, especialmente a linhagem comercial, apresentaram valores de DMS acima da faixa normalmente praticada. Esse ponto deverá ser mais bem elucidado na próxima fase do trabalho (*scale up* com mix de fermento de interesse sensorial), atentando-se para uma fervura do mosto mais intensa e menor tempo de resfriamento do mosto cervejeiro.

3.1.5 Análise da expressão gênica

Como exposto no Item 2.4, amostras para avaliação da expressão gênica foram coletadas na etapa de microfermentação de cervejas e seus resultados podem ser visualizados na Figura 3.14.

Os genes GPD1 e GPD2 tiveram expressões aumentadas a 24 horas para as linhagens Hb1 e Hv8. Esses genes codificam para enzimas-chave na síntese de glicerol, importante substância quando do crescimento celular em meios estressantes (Mandujano, 2019). Apesar de um menor rendimento alcóolico e uma maior concentração de glicerol serem esperados para essas linhagens, a Tabela 3.3 mostra que, com exceção do padrão comercial WB06®, os teores alcóolicos para ambas cepas não diferenciaram significativamente das demais linhagens. Os teores de glicerol figuraram dentre as menores concentrações analisadas, indicando a ausência de desvio de rota durante a obtenção das cervejas.

Complementarmente, expressões elevadas no momento Ti (24 horas) de ADR1 foram obtidas para as linhagens LGBA-288, Hv8 e LBGA-01, decrescentes nessa ordem. Esse gene expressa enzima necessária para transcrição do gene ADH2, relacionado com o consumo de etanol em acetaldeído. Contudo, como dito anteriormente, todas linhagens alcançaram teores alcóolicos similares entre si, não sugerindo desvio de etanol à acetaldeído.

ADH1 é outro gene importante e relacionado com o rendimento alcóolico fermentativo. Sua expressão mostrou-se elevada com 216 horas para as linhagens LBGA-01 e WB06®. Possivelmente, a maior expressão desse gene associado à maior capacidade de assimilação de açúcares do mosto cervejeiro pela linhagem comercial WB06® (maltose e maltotriose) justifiquem o ótimo rendimento alcóolico observado para essa linhagem (Tabela 3.3). É também para ser notado o fato dessas duas linhagens atingirem os maiores tempos de fermentação com 216 horas, conforme pode ser observado na Figura 3.13.

Quando as expressões dos genes ALD4 e ALD6 são analisadas, as linhagens LBGA-287, Hv8 e LBGA-01 mostram as maiores atividades, decrescentes nessa ordem, para o início do processo fermentativo (Ti). Interessantemente, a linhagem WB06®

manteve o nível de expressão ao longo do processo fermentativo (216 horas), o que poderia explicar o fato de seu produto acabado apresentar o maior teor de acetato em relação às demais linhagens (Tabela 3.3). Adicionalmente, durante a fase de maturação, uma investigação futura poderia avaliar se o acetato estaria se acumulando, visto que essa cepa é conhecida por sua baixa capacidade de sedimentação e elevado poder acidificante.

O gene HXT1, responsável pelo transporte de glicose e frutose, apresentou-se ativo no início da fermentação para todas as cepas, em concordância com a maior concentração de glicose nesse período. As cepas WB06® e Hv8 exibiram ainda alguma atividade para esse gene no tempo 216 h.

MAL31 – responsável pela permeabilidade celular a maltose (Andrion, 2022) – apresentou atividade desde o início do processo fermentativo (Ti), mesmo que na presença de glicose, corroborando o fato de que todas as linhagens apresentaram um bom rendimento alcóolico e um tempo de processo adequado (216 h), sem prejuízos quanto ao transporte de maltose para o interior celular.

A expressão dos genes PAD1 e FDC1 propiciam rotas bioquímicas que resultarão na obtenção de 4-VG, responsável pelos aromas fenólico e cravo na cerveja. Níveis elevados de expressão estão associados a linhagens pouco evoluídas (Gallone *et al.*, 2016; Andrion, 2022). A Figura 3.14 mostra expressão gênica no tempo inicial (Ti 24 h) para todas as linhagens investigadas, inclusive acima do controle POF+ WB06®. Tal fato confirma a expectativa de obtenção de cervejas com o atributo sensorial “condimentado”, uma vez que as leveduras estudadas não pertencem ao ambiente cervejeiro.

Os níveis de expressão do gene BDH1 nas primeiras horas de processo para todas as linhagens sugerem um desvio de rota de 2,3-butanodiol a acetoína e diacetil. Enquanto a primeira substância química (acetoína) não apresenta prejuízo sensorial à bebida, o diacetil é facilmente perceptível (limiar de detecção de 0,1 ppm) e confere o atributo de manteiga rançosa ao produto. (Mandujano, 2019). Durante a etapa de obtenção de cervejas com linhagens para interesse sensorial os níveis de diacetil deverão ser avaliados para verificar-se essa expectativa.

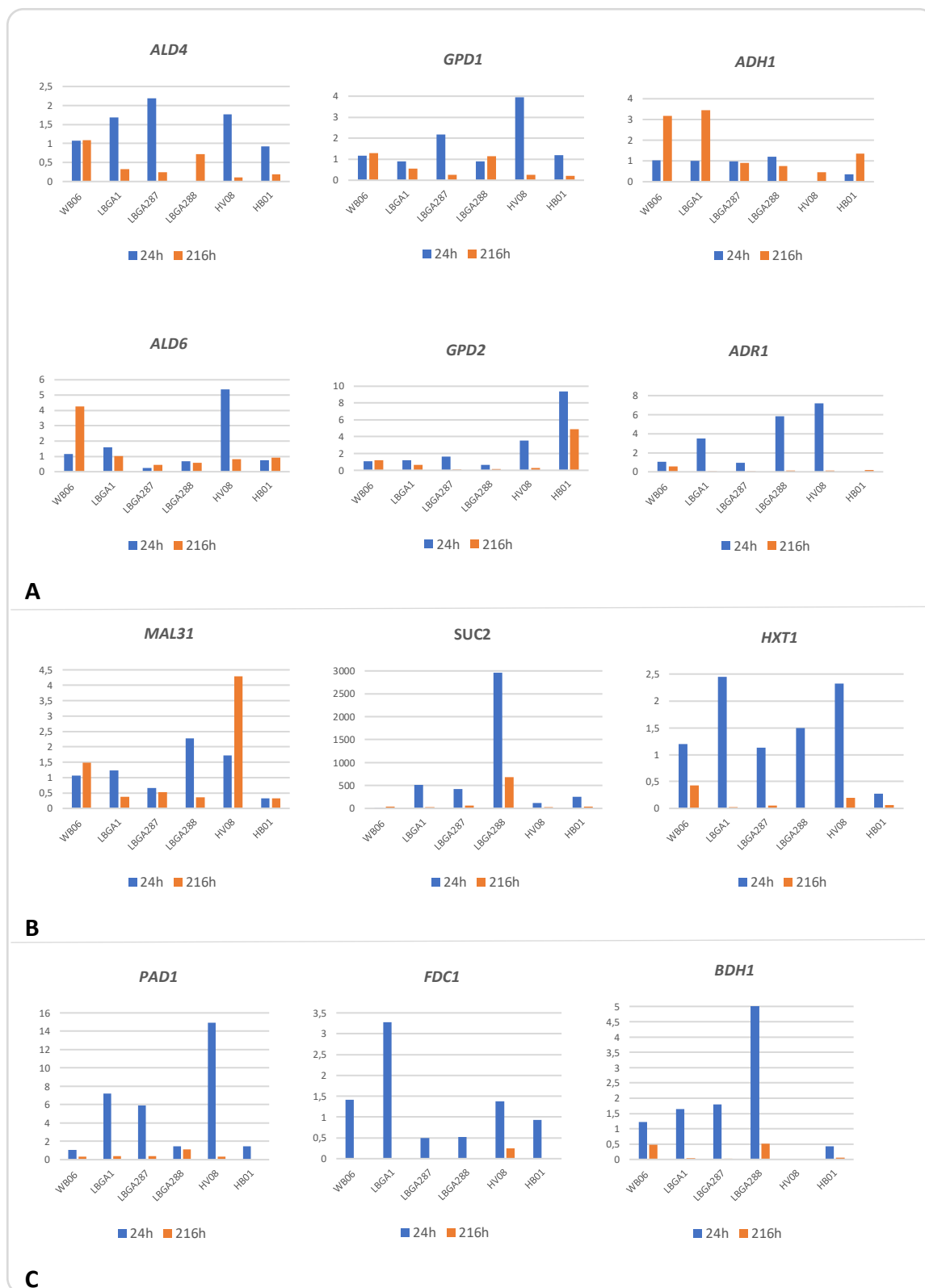


Figura 3.14 Comparação dos níveis de expressão relativa de genes relacionados à eficiência fermentativa (A), metabolismo de açúcares (B) e produção de aromas (C) durante microfermentação de cervejas. As amostras foram analisadas nos tempos **Ti**: tempo inicial da fermentação, 24 horas após inóculo e **Tf**: final do processo após 216 horas do mosto ter recebido o inóculo de fermento. WB06® foi utilizada como padrão comercial. **Fonte:** O próprio autor.

3.1.6 Perfil sensorial das cervejas

Dois painéis de avaliadores foram estabelecidos para avaliação sensorial das cervejas obtidas com as cepas pré-selecionadas. O primeiro – designado Painel Profissional “PP” - formado por 7 (sete) avaliadores treinados e com larga experiência em avaliação sensorial de cervejas, grupo formado integralmente por *Beer Sommeliers* da cidade de São Carlos, SP. O segundo – designado Painel Leigo “PL” – formado por pelo menos 20 participantes, leigos e sem experiência descritiva para atributos qualitativos de cerveja.

Dois testes sensoriais foram conduzidos, iniciando-se com uma avaliação sensorial descritiva pelo painel profissional “PP”, seguida de um teste triangular, pelo painel leigo “PL”, para determinação de possíveis diferenças significativas entre as cervejas avaliadas.

Para avaliação descritiva, os panelistas profissionais foram solicitados descrever 7 categorias específicas: “floral”, “frutado ou fruity”, “cítrico ou citric”, “condimentado ou spicy”, para aromas e “corpo ou body”, “acid ou ácido” e qualidade do “retrogosto ou *aftertaste*”, para sabores. As intensidades deveriam ser descritas em uma escala de 0 (zero) para nenhuma percepção a 10 (dez) para extrema detecção do atributo julgado. A Figura 3.15 contém o gráfico aranha obtido a partir das médias de atributos qualitativos para as cervejas avaliadas:

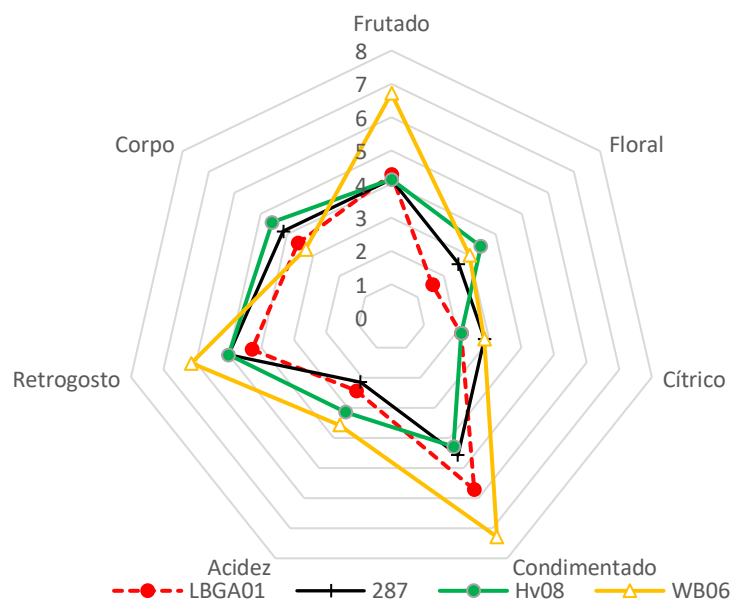


Figura 3.15 Gráfico aranha a partir das médias das intensidades para os diversos atributos qualitativos. Linhagens de interesse: LBGA-01, 287 e Hv8. Linhagem comercial: WB06® Fermentis. Os atributos “Corpo”, “Cítrico” e “Floral” não apresentaram diferença significativa estatisticamente (ANOVA, $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor.

Os perfis aromáticos observados para as 4 linhagens mostram-se de maneira similar entre si. Um tripé com os vértices “condimentado”, “retrogosto” e “frutado” pode ser observado. As três linhagens em estudo produziram cervejas de baixa intensidade nos quesitos “corpo”, “floral”, “cítrico” e “acidez”, comportamento semelhante ao padrão comercial utilizado.

Quando analisados individualmente os atributos, a maior intensidade pontuada foi para “condimentado”, com destaque para a linhagem comercial WB06®, decrescendo para a cerveja obtida com a cepa LBGA-01 até uma mínima percepção aromática nas linhagens 287 e Hv8. Interessantemente, esses resultados estão de acordo com a caracterização POF⁺ recebida por todas as linhagens conforme Tabela 3.7.

Com relação ao retrogosto, os avaliadores foram solicitados avaliarem a qualidade do atributo mediante percepção da sensação causada no palato e garganta instantes após seu consumo. O perfil observado foi muito similar para as diversas cervejas, com destaque para WB06®. Quando os painelistas foram arguidos quanto ao atributo “frutado”, a maior percepção demonstrada foi para a linhagem comercial WB06® frente às demais.

Todas as linhagens conduziram à obtenção de cervejas com grau de atenuação satisfatórios, corroborando o fato de todas terem recebido pontuação de corpo médio,

médio-baixo. Aos atributos “cítrico”, “floral” e “acidez” foram atribuídas pontuações similares entre as diversas cervejas obtidas, com intensidades menores que 4,6.

O método de Análise dos Componentes Principais (PCA) foi aplicado com objetivo de se criar um perfil sensorial multidimensional. Esse método consiste na combinação de muitos dados em novos componentes, baseado na variância e correlação dentro de um conjunto específico de dados (Bellut, *et al.*, 2018). Inicialmente, Análise de Variância (ANOVA) foi realizada de maneira a descartar os atributos sensoriais sem diferença estatística significativa (Anexo E). A utilização desses dados distorceria o produto da PCA. Dos 7 atributos avaliados pelos panelistas durante o julgamento, “floral”, “cítrico” e “corpo” apresentaram valor de P superior a 0,05 ou F calculado superior ao F crítico, no teste F: Esses atributos não constituíram, portanto, o conjunto de dados da PCA.

A Figura 3.16 compila os vetores para os atributos sensoriais. A distribuição é explicada pelos dois primeiros componentes: “Dim 1” e “Dim 2”. A primeira dimensão foi contribuída positivamente por “condimentado” e “frutado”. “Dim 2” foi contribuída positivamente pelo vetor “acidez” e negativamente por “retrogosto”. Nesse modelo, ângulos agudos entre dois vetores correspondem a relações positivas entre as variáveis, como exemplo “acidez” e “condimentado”. Ângulos retos evidenciam variáveis sem relação entre si, como “condimentado” e “retrogosto”, enquanto ângulos obtusos refletem relações negativas entre os vetores, como “acidez” e “retrogosto”.

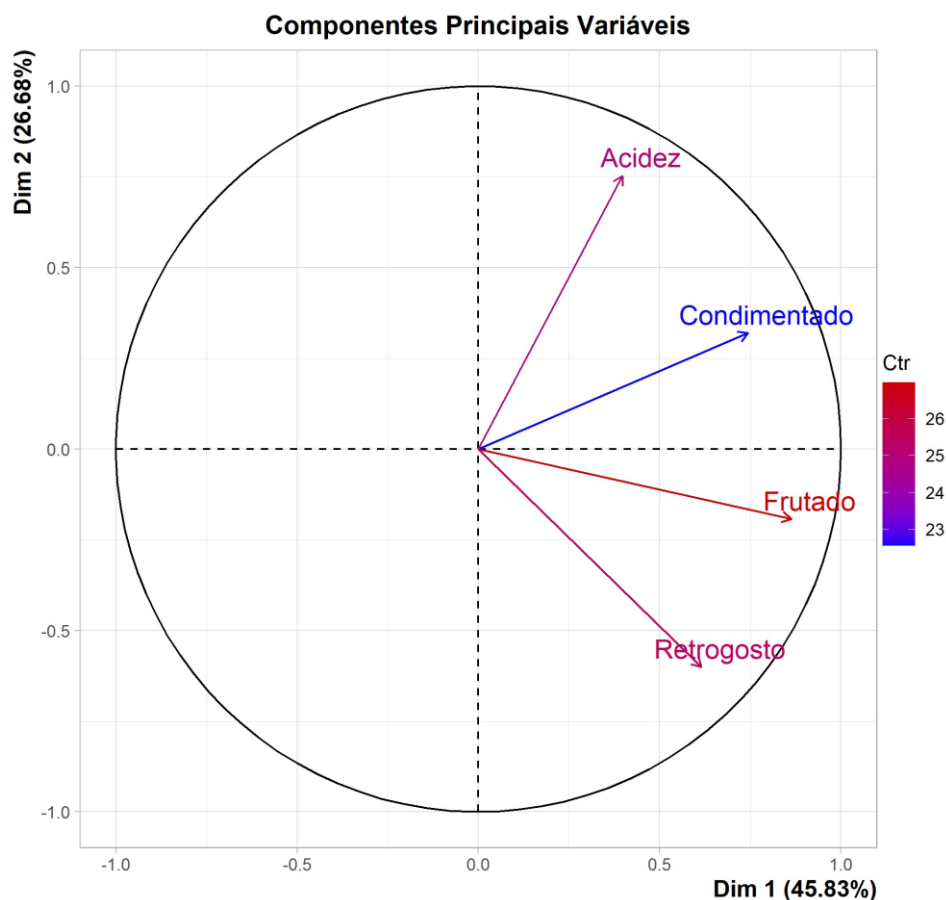


Figura 3.16 Mapa de vetores para diversos fatores da Análise de Componentes Principais da análise sensorial de cervejas de interesse. Somente fatores com valor p no teste F menor que 0,05 foram considerados. Fonte: O próprio autor.

A Figura 3.17 mostra o produto da metodologia das elipses de confiança. Nesse modelo, cada linhagem é representada por uma elipse ($\alpha = 0,05$), disposta em função dos julgamentos dos panelistas. Ou seja, quanto mais bem separadas as elipses, maior o poder discriminatório dos julgadores.

O padrão comercial WB06® pode ser claramente discernido das demais cervejas obtidas com linhagens de interesse, posicionando-se em direção dos vetores condimentado e frutado. A sobreposição das elipses para as cepas estudadas (LBGA-01, 287 e Hv8) aponta para a impossibilidade de discernimento completo pelos julgadores entre essas. O valor médio para o atributo “condimentado” da linhagem LBGA-01 (Tabela 4, Anexo E) refletiu no PCA, onde uma suave inclinação de sua elipse é notada em direção ao vetor correspondente. Ao mesmo tempo, sua disposição “achatada” é efeito de suas menores médias relativas para os atributos acidez e retrogosto. Semelhantemente, a cepa 287 teve sua elipse projetada em direção ao vetor retrogosto,

correspondendo à sua maior média atribuída durante os julgamentos. Hv8, por sua vez, se “alongou” na “Dim 2”, corroborando para os julgamentos recebidos com maiores médias nos atributos acidez e retrogosto.

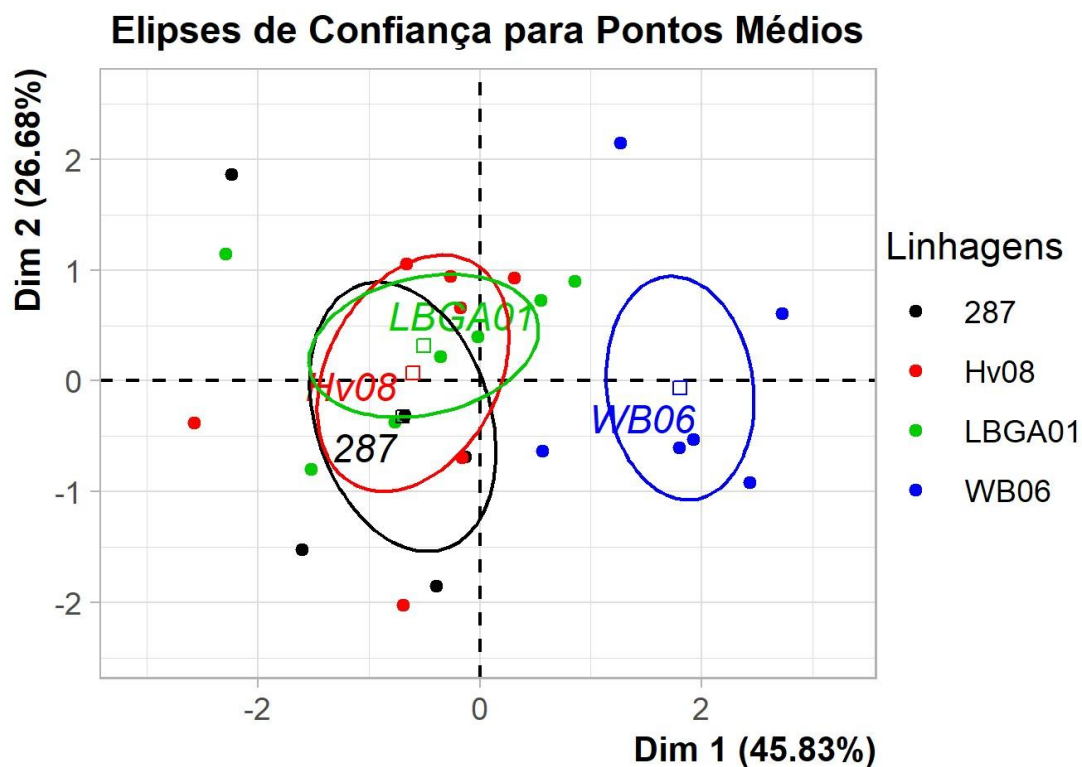


Figura 3.17 Pontos médios com elipses de confiança ($\alpha = 0,05$) para Análise de Componentes Principais (PCA) para cervejas de interesse sensorial: Linhagens estudadas: 287, Hv8 e LBGA-01. Referência comercial: WB06® Fermentis. Fonte: O próprio autor.

Finalmente, o Teste triangular foi aplicado seguindo as diretrizes da NBR 12995 (ABNT, 1993), com objetivo de se avaliar possíveis diferenças significativas, par a par, mediante a participação de 20 participantes diversos (painel leigo). Ao painel foi solicitado, a partir de um conjunto de 3 amostras, indicar qual amostra diferiria das demais duas idênticas. Para isso, cada cerveja proveniente de cada linhagem foi testada contra outra, segundo a Tabela 2.6.

Como relatado anteriormente por Meier-Dörnberger *et al.* (2017a), a aplicação de determinada linhagem está associada à obtenção de um produto final com características sensoriais satisfatórias, as quais são produto dos vários subprodutos da fermentação e possíveis efeitos sinérgicos. Por essa razão, tornou-se necessário a elucidação completa, através de um teste triangular, para investigar possíveis diferenças

entre as cervejas obtidas com as linhagens do estudo entre si ou mesmo entre o padrão comercial.

Como pode ser notado na Tabela 3.13, 2 pares de linhagens não puderam ser claramente discernidos pelos panelistas (LBGA-01 *versus* 287 e 287 *versus* Hv8). Os resultados observados corroboram àqueles apontados na PCA, Figura 3.17, no que diz respeito ao elevado poder discriminatório das linhagens de estudo contra a cepa comercial WB06®. Ou seja, todos pares LBGA-01, 287 e Hv8 *versus* WB06® mostraram diferença significativa perceptível. Contrariamente ao produto do teste triangular, a metodologia de PCA por meio das elipses de confiança, demonstrou pouca capacidade de discernimento pelo painel treinado quando avaliadas cervejas obtidas com as três linhagens de interesse. Somente os pares LBGA-01 *versus* 287 e 287 *versus* Hv8 foram considerados diferentes a partir do teste triangular aplicado. A diferença entre os resultados obtidos pelas duas metodologias poderia ser explicada pelo fato das linhagens LBGA-01 e Hv8 terem recebido pontuações médias no atributo “condimentado” relativamente distintas (Figura 3.15). Esse atributo poderia ter caráter predominante no buquê aromático da cerveja final.

Tabela 3.13 Teste triangular para cervejas obtidas com linhagens investigadas

Teste Triangular					
Linhagem de interesse		Avaliadores	Identificações certas		
Simplex	Dupla	Total	Acertos	%	Significância
LBGA-01	287	20	6	30	NS
LBGA-01	Hv8	20	16	80	S
LBGA-01	WB06	20	14	70	S
287	Hv8	20	11	55	NS
287	WB06	20	18	90	S
Hv8	WB06	20	16	80	S

Nota: Número mínimo de julgamentos corretos necessários para atestar diferença significativa conforme Anexo C ($P < 0,05$). Fonte: O próprio autor

3.2 Caracterização de mixes de fermentos e desenvolvimento de um *Scale up* industrial

Como dito anteriormente, o presente trabalho teve como estratégia a utilização da linhagem de maior potencial dentre as cinco investigadas para composição de um *blend* com a levedura padrão comercial WB06® (inóculo misto simultâneo).

As características físico-químicas dos produtos obtidos mediante as três cepas investigadas (Item 3.1.4.1) mostraram concentrações dentro de faixas aceitáveis para os diversos subprodutos da fermentação. A linhagem 287, todavia, se destacou por sua maior capacidade de metabolização de maltose e maior grau de atenuação aparente, resultando em maior produção alcóolica em relação às demais cepas investigadas. Essa linhagem necessitou de um menor tempo para promoção da fermentação primária, comparada ao controle comercial (WB06®). Todas as cepas do estudo mostraram concentrações de dicetonas vicinais, ácidos orgânicos e glicerol dentro de faixas aceitáveis.

Quando os atributos de qualidade relativos aos voláteis e ao perfil sensorial das cervejas são levados em consideração (Itens 3.4.1.2 e 3.4.1.3), os dados obtidos por cromatografia gasosa mostram uma menor formação de voláteis para as linhagens de interesse em relação ao padrão comercial WB06®. Novamente se destaca a cepa 287 com as menores concentrações de ésteres e álcoois superiores totais, além de um maior valor observado para o pH do produto final. Muito possivelmente, o perfil analítico aromático encontrado explica, em partes, por que no teste triangular, todas linhagens investigadas se diferenciavam estatisticamente do controle comercial. Paralelamente, o teste sensorial descritivo classificou a linhagem WB06® com as maiores pontuações para o tripé comum entre as cervejas obtidas, “condimentado”, “frutado” e “retrogosto”.

Dessa forma, o inóculo misto (WB06® & 287) foi delineado, esperando-se obter um produto final equilibrado e complexo, com ênfase no atributo “condimentado”. O fato da linhagem 287 ter apresentado um perfil mais restrito nas concentrações de voláteis poderia contribuir para uma impressão sensorial global menos acentuada. Possivelmente, essa estratégia permitirá que esse *blend* de leveduras possa ser

empregado para vários outros estilos de cerveja como *Belgian Blond Ale*, *Dunkelweizen* (cerveja escura de trigo), ou outros estilos que demandam perfil condimentado mais contido. Ao mesmo tempo, a cepa WB06® traria para o conjunto um reforço do caráter frutado e a garantia do consumo adequado dos açúcares fermentescíveis, incluindo a maltotriose.

A utilização de um blend 287/WB06® seria, ao mesmo tempo, uma forma de reduzir a queda acentuada no pH do produto final quando da utilização única da cepa comercial WB06 ($\Delta\text{pH} \geq 1,2$). Essa linhagem, de grande aplicação comercial atualmente, é conhecida por sua atenuação agressiva, altos níveis de produção de ácidos orgânicos, o que promove, em algumas aplicações industriais, a percepção de acidez elevada que remete à contaminação pelo gênero *Lactobacillus*. Além disso, a linhagem 287 foi a que apresentou maior atenuação aparente (%), consequentemente, maior produção de etanol (% v/v) dentre as demais cepas, conforme Tabela 3.11.

Para investigação da melhor proporção entre cepas (investigada/comercial), 40 mL de mosto lupulado 12,0°P foram transferidos para tubos cônicos tipo Falcon® de 50 mL, em sextuplicata. Em cada tubo foram inoculados 6×10^7 células/mL correspondente a proporção entre linhagens conforme:

- P1:** 100% Linhagem investigada escolhida;
- P2:** 80% Linhagem investigada escolhida & 20% Linhagem comercial WB06®;
- P3:** 60% Linhagem investigada escolhida & 40% Linhagem comercial WB06®;
- P4:** 50% Linhagem investigada escolhida & 50% Linhagem comercial WB06®;
- P5:** 40% Linhagem investigada escolhida & 60% Linhagem comercial WB06®;
- P6:** 20% Linhagem investigada escolhida & 80% Linhagem comercial WB06®;
- P7:** 100% Linhagem comercial WB06®.

A figura 3.18 resume os dados de densidade ao longo de 240 horas de processo, em que é claramente visível um maior valor de açúcares residuais para a linhagem 287 (P1 100% 287) ao passo que a cepa de referência comercial WB06® exibe um dos menores valores de extrato final (P7 100% WB06®). A proporção 50/50 entre 287 e WB06® apresentou valores médios de atuação, exibindo cinética de processo muito

próximo das demais e, por isso, foi tomada como proporção do inóculo misto para utilização na etapa de *scale up*.

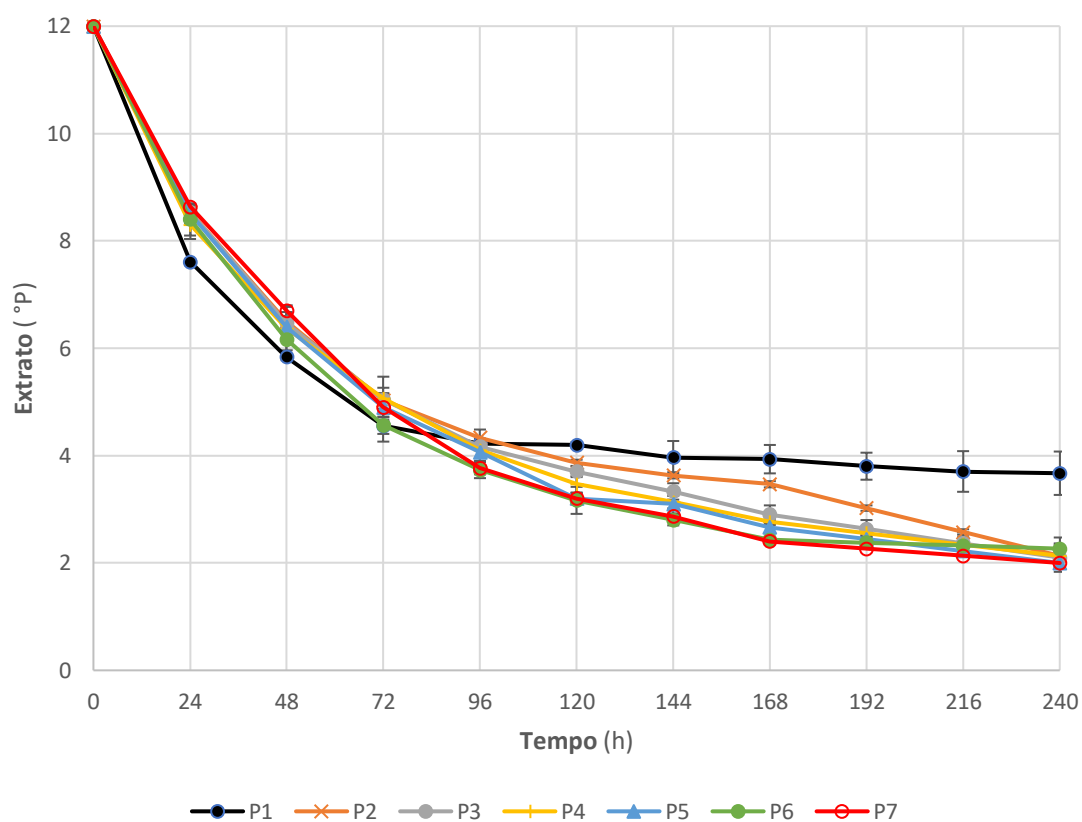


Figura 3.18 Evolução do extrato a partir de mosto de cevada 12°P durante processo fermentativo conduzido a 20 °C para as seguintes proporções entre cepas: **P1** (100% LBGA 287), **P2** (80% LBGA 287 & 20% WB06®), **P3** (60% LBGA 287 & 40% WB06®), **P4** (50% LBGA 287 & 50% WB06®), **P5** (40% LBGA 287 & 60% WB06®), **P6** (20% LBGA 287 & 80% WB06®) e **P7** (100% WB06®) nos tempos de 0 a 240 horas.

Fonte: o próprio autor

A obtenção das cervejas em escala piloto (45 litros) foi realizada conforme adaptação dos itens 2.7, 2.7.1 e 2.7.2 e os resultados físico-químicos podem ser encontrados na Tabela 3.14 a seguir:

Tabela 3.14 Características das cervejas produzidas em *Scale up* pelas linhagens inóculo misto (P4) e WB06® (P7)

	P4 (287/WB06®)		WB06®	
Análises	Inicial	Final	Inicial	Final
Extrato (°P)	12,20±0,05	2,31±0,05	12,20±0,05	2,31±0,05
Densidade (g/cm³)	1,049±0,001	1,009±0,001	1,049±0,001	1,009±0,001
Etanol (% v/v)	-	5,33±0,1	-	5,33±0,1
pH	5,15±0,05	4,24±0,05	5,15±0,05	4,10±0,05

Nota: Fonte: O próprio autor

Conforme pode ser visto na Tabela 3.14, o valor o pH da cerveja obtida com o mix de fermentos (4,24±0,05) foi ligeiramente maior daquele obtido somente com a cepa comercial WB06® (4,10±0,05). Essas medidas vão de encontro à estratégia descrita anteriormente, objetivando uma cerveja final mais equilibrada em termos de acidez perceptível.

Sequencialmente o teste triangular foi aplicado seguindo as diretrizes da NBR 12995 (ABNT, 1993), com objetivo de se avaliar possíveis diferenças significativas, contando com 20 participantes diversos (painel leigo). Ao painel foi solicitado, a partir de um conjunto de 3 amostras, indicar qual amostra diferiria das demais duas idênticas.

Como pode ser notado na Tabela 3.15, os panelistas não puderam discernir entre as cervejas obtidas com o inóculo misto (P4) daquelas fermentadas com a levedura comercial WB06®, ao nível de 0,1% de significância:

Tabela 3.15 Teste triangular para cervejas obtidas após *scale up*

Teste Triangular					
Linhagem de interesse		Avaliadores	Identificações certas		
Simplex	Dupla	Total	Acertos	%	Significância
P4	P7	20	6	30	NS

Nota: P4 refere-se ao inóculo misto (50/50 287/WB06®); P7 refere-se a 100% controle comercial WB06®. Fonte: O próprio autor

A Figura 3.19 contém o gráfico aranha obtido a partir das médias de atributos qualitativos para as cervejas avaliadas por painel treinado:

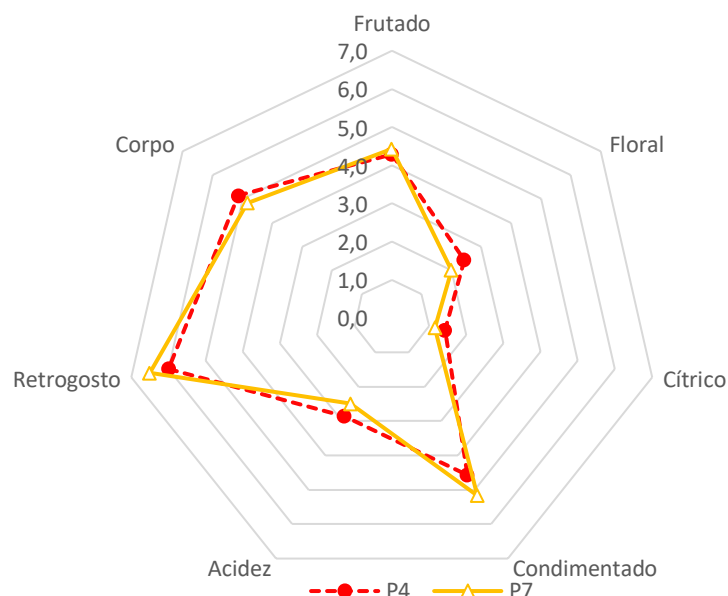


Figura 3.19 - Gráfico aranha a partir das médias das intensidades para os diversos atributos qualitativos. Mix de interesse (**P4**) versus Linhagem comercial WB06® Fermentis (**P7**). Não há diferença estatística significativa entre os atributos avaliados. (ANOVA, $p < 0,05$). **Fonte:** O próprio autor.

Ainda que não nenhuma diferença estatística fosse apontada entre as cervejas obtidas (*Dunkelweizen* 45 litros), ao painel de avaliadores profissionais (PF) foi solicitada a avaliação de sete atributos sensoriais. Como pode ser observado na Figura 3.19, os julgamentos corroboram o teste triangular, caracterizando, adicionalmente, as percepções sensoriais de cada cerveja, para um painel treinado.

As maiores intensidades pontuadas foram para “condimentado” e qualidade do “retrogosto”, ao passo que “floral” e “cítrico” foram características de pouca percepção olfativa.

Por fim, o teste de preferência foi aplicado a fim de se investigar como o produto se comportaria perante o consumidor comum de cervejas. O experimento foi realizado com consumidores não treinados e em escala piloto ou laboratorial, ou seja, sob condições controladas, com faixa de 25 a 50 julgamentos. Conforme tabela 3.16, os consumidores preferiram a amostra P4 feita com mix de fermentos (LBGA-287 & WB06® à P7 (fermentada somente com a levedura comercial WB06®).

Tal resultado levanta questões como a completa representatividade dos 7 atributos solicitados ao painel profissional, assim como o efeito sinérgico de tais

atributos na percepção da bebida como um todo. Outro ponto a ser melhor entendido é se, ao longo da maturação, a expressão tardia de alguns genes poderia trazer alterar as características físico-químicas a ponto de representar um produto de melhor aceitação perante o consumidor final. O teste de preferência aconteceu aproximadamente 2 semanas após o teste triangular.

Tabela 3.16 Teste de preferência para cervejas obtidas na fase de *scale up*

	Teste Preferência					
Linhagens:	P4	P7	Total	Diferença	%	Significância
Julgamentos:	20	5	25	20	80	S

Nota: P4 refere-se ao inóculo misto (50/50 287/WB06®); P7 refere-se a 100% controle comercial WB06®.
 Fonte: O próprio autor

4. Capítulo 4 – Conclusões

O presente trabalho caracterizou cinco linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes das indústrias de bioetanol e ambiente de fabricação de vinhos, que apresentaram, em maior ou menor nível, compatibilidade à aplicação no processo de fabricação de cervejas.

Todas as leveduras apresentaram capacidade de assimilação de maltose, açúcar fundamental do mosto cervejeiro, em níveis similares aos padrões comerciais utilizados. Os ensaios de crescimento em extrato de malte 2% mostraram que todas as linhagens conseguiram se multiplicar em níveis similares às linhagens comerciais, tendo as cepas LBGA-01 e Hv-8 exibido, nesse meio complexo, o maior e menor platô de crescimento, respectivamente. Quando submetidas a condição de elevada pressão osmótica (Extrato malte 20° e 25°P), as linhagens investigadas não tiveram seu crescimento comprometido, semelhantemente ao perfil de crescimento dos padrões industriais.

Para as concentrações de Etanol a 5 e 10% (v/v), assim como quando testadas em meios compostos por uma combinação resinas de lúpulo e etanol, todas leveduras avaliadas apresentaram ritmo de crescimento sutilmente diminuído, contudo semelhante ao comportamento observado para os padrões comerciais. Dessa forma, pode-se inferir que as células em suspensão promoverão as transformações bioquímicas necessárias na cerveja imediatamente após a fermentação primária (*green beer*), conduzindo a uma bebida maturada dentro dos padrões de qualidade sensoriais necessários para a bebida industrial.

Com relação aos aspectos tecnológicos formação de espuma e capacidade de floculação, as leveduras investigadas se comportaram de maneira semelhante às cepas industriais. Dessa forma, espumamento excessivos não são esperados quando da aplicação dessas leveduras industrialmente, assim como a obtenção de cervejas verdes (*green beer*) com número aceitável de células em suspensão, dispensando métodos mais sofisticados e dispendiosos como o uso de centrífugas industriais.

A cinética fermentativa, o tempo de fermentação, o grau de atenuação aparente e a redução do pH da cerveja foram acompanhados e utilizados como *drivers* para o

screening de cepas de maior potencial fermentativo. Todas cinco cepas investigadas mostraram capacidade de fermentação de maltose (entre $89,60 \pm 4,52$ e $99,04 \pm 4,52\%$), porém baixo poder de assimilação de maltotriose (entre $11,76 \pm 1,07$ e $24,17 \pm 1,30\%$). Tais níveis de assimilação dos principais açúcares do mosto cervejeiro podem explicar os graus de atenuação aparente e cinéticas de fermentação obtidos, todos semelhantes ao padrão comercial S04[®] porém inferiores à levedura WB06[®].

A linhagem investigada Hv-8 e o padrão comercial WB06[®] detiveram as maiores capacidade de acidificação do mosto cervejeiro ($\Delta\text{pH } 1,2$). Todavia, todas linhagens mostraram dinâmica de redução do pH similares aos dados encontrados na literatura (Loh, Li Xuan, *et al.*, 2021; Bellut, Konstantin, *et al.*, 2019; Meier-Dörnberg *et al.*, 2017a), com pH mínimo alcançado ao término da fermentação primária.

Cervejas foram obtidas a partir das linhagens LBGA-01, 287, Hv8 e WB6[®](referência) e foram analisadas sensorialmente por painéis sensoriais profissional e leigo. No teste triangular, a cerveja obtida com a levedura comercial WB06[®] mostrou diferença significativa quando comparada par a par com as linhagens-teste. Quando aplicado o teste descritivo, dos sete atributos sensoriais solicitados aos avaliadores profissionais, apenas quatro exibiram diferenças significativas, a saber *acidez*, *retrogosto*, *frutado* e *condimentado*. WB06[®] exibiu pontuação superior para todas essas dimensões, corroborando para o fato dessa levedura já ter passado por processos de adaptação no ambiente cervejeiro, ao contrário das linhagens selvagens avaliadas nesse estudo.

Adicionalmente, as técnicas de HPLC e CG foram aplicadas para avaliação de metabólitos e voláteis de maior importância. As diferenças observadas para os diversos atributos não mostram valores de *off flavors* ou deficiências metabólicas que comprometam o emprego industrial das linhagens em estudo em cervejarias. Ao mesmo tempo, os resultados obtidos auxiliaram na escolha da uma melhor cepa para prosseguimento da fase de *scale up* industrial, a saber a linhagem 287.

Cervejas finais foram obtidas mediante *scale up* e utilização de inóculo misto de fermentos de interesse, resultando em produtos com característica físico-químicas similares e sensorialmente idênticos.

4.1 Perspectivas futuras

As estratégias planejadas e estabelecidas nesse trabalho poderão ser empregadas para na condução de investigações genéticas e fenotípicas para novas linhagens de interesse na produção cervejeira.

As próximas etapas desse trabalho compreendem:

- Sequenciamento do genoma da linhagem de interesse 287, possibilitando a edição genética por CRISPR-Cas9 de genes alvos indesejáveis, como aqueles envolvidos na geração do fenótipo *POF*;
- Prosseguimento com a estratégia de evolução dirigida para a linhagem 287 objetivando sua utilização na indústria cervejeira, assim como a realização de experimentos de genoma e transcriptoma visando-se entender quais modificações foram alcançadas e sua significância;
- Continuidade dos esforços para correlação entre métodos analíticos como HPLC, GC e RMN, de maneira a promover a redução de esforços na quantificação e entendimento de comportamento das principais rotas bioquímicas da fermentação de cerveja;
- Promoção de *scale up* industrial em microcervejarias mediante emprego de volumes praticados normalmente pela indústria cervejeira (250 litros e 1.000 litros) e avaliação:
 - a) das características tecnológicas de interesse como floculação celular, espumamento no *Hoch Kräusen* (maior atividade fermentativa) e recuperação do fermento pós-fermentação primária;
 - b) do perfil aromático resultante da dinâmica da fermentação em recipientes cilindro-cônicos (fermentadores inox típicos cervejeiros);
 - c) da resistência da linhagem empregada quanto à competição junto a outros microrganismos, visto que o ambiente industrial não é asséptico;
 - d) da manutenção da proporção inicial no inóculo misto simultâneo, elucidando acerca da possibilidade ou não de reutilização do fermento recuperado pela indústria.

Referências

- ANDRION, B. C. **Isolamento, caracterização taxonômica e aplicação de leveduras no processo de fabricação de cervejas personalizadas**. 2022. 108f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.
- ARBEFEVILLE, S., HARRIS, A., & FERRIERI, P.. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. **Journal of Microbiological Methods**, 140, set. 2017, 40-46. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.015>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR: 12.995 Teste triangular em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1994. 5 p.
- BAMFORTH, C. W., & KANAUCHI, M.. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, 110(2), mai. 2012, 83-93. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00187.x>. Acesso em: 23 fev. 2023.
- BAMFORTH, C.. **Beer: tap into the art and science of brewing**. Oxford: University Press, 2009. Cap. , p. .
- BASSO, R. F.. **Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas**. 2019. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2019.
- BASSO, R. F., ALCARDE, A. R., & PORTUGAL, C. B.. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. **Food Research International**, 86, ago. 2016, 112-120. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- BELLUT, K., MICHEL, M., ZARNKOW, M., HUTZLER, M., JACOB, F., De SCHUTTER, D. P., ... & ARENDT, E. K.. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, 4(3), ago. 2018, 66. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- BELLUT, K., MICHEL, M., ZARNKOW, M., HUTZLER, M., JACOB, F., ATZLER, J. J., ... & ARENDT, E. K.. Screening and application of *Cyberlindnera* yeasts to produce a fruity, non-alcoholic beer. **Fermentation**, 5(4), dez. 2019, 103. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation5040103>. Acesso em: 10 jan 2023.
- BJCP. Guia de estilos do *Beer Judge Certificate Program*. **BJCP**, 2021. Disponível em: <https://www.bjcp.org/bjcp-style-guidelines/>. Acesso em: 06 de agosto de. 2023.

BORNEMAN, A. R., & PRETORIUS, I. S.. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Genetics**, 199(2), fev. 2015, 281-291. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173633>. Acesso em: 14 out. 2022.

BRANDÃO, W. F. **Análise metabólica quantitativa de fermentação de extrato de malte cervejeiro por ressonância magnética nuclear**. 2021. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, RJ, 2021.

BRIGGS, D. E. **Brewing: science and practice**. London: Woodhead Publishing, 2004. Cap. 10, p. 454-465.

CARVALHO-NETTO, O. V., CARAZZOLLE, M. F., RODRIGUES, A., BRAGANÇA, W. O., COSTA, G. G., ARGUESO, J. L., & PEREIRA, G. A.. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. **Journal of biotechnology**, 168(4), dez. 2013, 701-709. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.025>. Acesso em: 15 mar. 2021.

CIANI, M., MORALES, P., COMITTINI, F., TRONCHONI, J., CANOINICO, L., CURIEL, J. A., ... & GONZALEZ, R.. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. **Frontiers in Microbiology**, 7, mai. 2016, 642. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>. Acesso em: 21 set. 2023.

COGHE, S., BENOOT, K., DELVAUX, F., VANDERHAEGEN, B., & DELVAUX, F. R.. Ferulic acid release and 4-vinylguaicol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(3), jan. 2004. 602-608. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0346556>. Acesso em: 15 dez. 2022.

CURTIN, C. D., LANGHANS, G., HENSCHKE, P. A., & GRBIN, P. R.. Impact of Australian Dekkera bruxellensis strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. **Food microbiology**, 36(2), dez. 2013, 241-247. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.008>. Acesso em: 15 set. 2023.

D'AMORE, T., RUSSELL, I., & STEWART, G. G.. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 4(4), jul. 1989, 315-323. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01577355>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DE OLIVEIRA DIAS, M., & Falconi, D.. The evolution of craft beer industry in Brazil. **Journal of Economics and Business**, 1(4), dez. 2018, 618-626. Disponível em: <https://www.asianinstituteofresearch.org/>. Acesso em: 21 abr. 2019.

ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F., & QUEROL, A.. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic and evolutionary**

microbiology, 49(1), jan. 1999, 329-337. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>. Acesso em: 15 jan 2023.

FONSECA, J. G.. **Desenvolvimento de um método rápido de identificação, ao nível de espécie, de *Lactobacillus* e *Saccharomyces* em dornas de fermentação, por meio da técnica de MALDI-TOF MS: validação molecular e construção do banco de dados espectral**. 2019. 93f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2019.

FRANCO-DUARTE, R., ČERNÁKOVÁ, L., KADAM, S., KAUSHIK, K. S., SALEHI, B., BEVILACQUA, A., ... & RELISON TINTINO, S.. ALEXANDRINO DE SOUZA VC, SHARIFI-RAD J, COUTINHO HDM, MARTINS N, RODRIGUES CF. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. **Microorganisms**, 7(5), mai. 2019, 130. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GARCIA, M. M. E.. **Produção de cerveja: Utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja**. 2013. Dissertação (Doutorado em Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

LORCA MANDUJANO, G. P.. **Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., & GASCUEL, O.. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, 59(3), mai. 2010, 307-321. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

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

HAMMER, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D.. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 1; jun. 2001, 9 p. Disponível em: <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>. Acesso em: 20 set. 2023.

HAZELWOOD L, WALSH M, PRONK J, DARAN J.. Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso-alpha-acids. **Appl Environ Microbiol** 76, jan. 2010, 318–328. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01457-09>. Acesso em: 15 set. 2023.

HE, Y., DONG, J., YIN, H., ZHAO, Y., CHEN, R., WAN, X., ... & CHEN, L.. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a

review. **Journal of the Institute of Brewing**, 120(3), jun. 2014, 157-163. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.145>. Acesso em: 10 jan. 2023.

HOFFMAN, C. S. Preparation of yeast DNA. *Curr Protoc Mol Biol*, v. Chapter 13, p. Unit13 11, mai. 2001, 1934-3647. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265095>. Acesso em: 10 jan 2023.

HOLLATZ, C.. **Análise da fermentação de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2004.

HORNSEY, I. S.. **A history of beer and brewing**. Cambridge: Royal Society of Chemistry., 2003. Cap. 6, p. 284.

HUTZLER, M., KOOB, J., RIEDL, R., SCHNEIDERBANGER, H., MUELLER-AUFFERMANN, K., & JACOB, F.. Yeast identification and characterization. **Brewing Microbiology**. v. 01, jan. 2015, pp. 65-104). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00005-8>. Acesso em: 22 fev. 2023.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 4, abr. 2013, p. 772-80,. ISSN 1537-1719, 0737-4038. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329690>. Acesso em: 10 jan. 2022.

KURTZMAN, C., FELL, J. W., & BOEKHOUT, T. (Eds.). **The yeasts: a taxonomic study**. San Diego: Elsevier. 2011. Cap. 1, p. 3.

LARSSON, S., NILVEBRANT, N. O., & JÖNSSON, L.. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, 57, out. 2001, 167-174. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002530100742>. Acesso em: 15 mar. 2023.

LOH, L. X., NG, D. H., TOH, M., LU, Y., & LIU, S. Q.. Targeted and nontargeted metabolomics of amino acids and bioactive metabolites in probiotic-fermented unhopped beers using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(46), nov. 2021, 14024-14036.

LORCA MANDUJANO, G. P.. **Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

MANDUJANO, G. P. L., ALVES, H. C., PRADO, C. D., MARTINS, J. G., NOVAES, H. R., TEIXEIRA, G. S., ... & da CUNHA, A. F.. Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production. **Food Microbiology**, 103, mai. 2022, 103958.

MARQUES, Wesley Leoricy et al. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov107, 1 fev. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA (2023). **Anuário da Cerveja – Ano referência 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2022/view>. Acesso em: 05 jul. 2023.

MEIER-DÖRNBERG, T., MICHEL, M., WAGNER, R. S., JACOB, F., & HUTZLER, M.. Genetic and phenotypic characterization of different top-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* ale yeast isolates. **BrewingScience**, Freising, v. 70,p. 9-25, jan-fev 2017a.

MEIER-DÖRNBERG, T., HUTZLER, M., MICHEL, M., METHNER, F. J., & JACOB, F.. The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. **Fermentation**, 3(3), ago. 2017b,41. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation3030041>. Acesso em: 12 fev. 2022.

MEUSSDOERFFER, F., ZARNKOW, M.. **Uma história de Lúpulo e Malte**. São Paulo: Power Graphics, 2017. Cap. 3, p.49-53.

MICHEL, M., KOPECKÁ, J., MEIER-DÖRNBERG, T., ZARNKOW, M., JACOB, F., & HUTZLER, M.. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, 33(4), jan. 2016a, 129-144.

MICHEL, M., MEIER-DÖRNBERG, T., JACOB, F., METHNER, F. J., WAGNER, R. S., & HUTZLER, M.. Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, 122(4), nov. 2016b, 569-587. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.381>. Acesso em: 15 mar. 2023.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da Cerveja**. 1. ed. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 440 p.

NAZISS, L.. The German beer law. **Journal of the Institute of Brewing**, Alemanha, 90(6), 351-358, nov-dez. 1984.

NORDSTRÖM, K.. Formation of esters from alcohols by brewer's yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, 70(4),jul-ago. 1964, 328-336. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1964.tb01999.x>. Acesso em: 22 mar. 2022.

NOVAES, H. R. de. **Seleção e caracterização molecular e fermentativa de leveduras personalizadas para a produção de vinhos brasileiros**. 2022. 81f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

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, mar. 2017, p. 13–23. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.389>. Acesso em: 15 mar. 2022.

OLIVER, Garrett. **The Oxford companion to beer**. Ed. 1. Nova Iorque: Oxford University Press, 2012. 1039.

PARAPOULI, M., VASILEIADIS, A., AFAENDRA, A. S., & HATZILOUKAS, E.. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiol** 6 (1), fev. 2020, 1–31. Disponível em: <https://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2020001>. Acesso em: 10 jan. 2023.

PIOVEZAN, M. Cromatografia Gasosa, aula de Análise Instrumental II. Disponível em: <https://docente.ifsc.edu.br/marcel.piovezan/MaterialDidatico/AIN%202/Aula%20Cromatografia%20gasosa%20AIN%202.pdf>. Acesso em: 07/07/2023.

PIRES, E. J., TEIXEIRA, J. A., BRÁNYIK, T., & VICENTE, A. A.. Yeast: The soul of beer's aroma—A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, jan. 2014, 1937-1949. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>. Acesso em: 10 jan. 2023.

POREDA, A., CZARNIK, A., ZDANIEWICZ, M., JAKUBOWSKI, M., & ANTKIEWICZ, P.. Corn grist adjunct—application and influence on the brewing process and beer quality. **Journal of the Institute of Brewing**, 120(1), jan. 2014, 77-81. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.115>. Acesso em: 22 mar. 2023.

POSADA, D.. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, 25(7), abr. 2008, 1253-1256. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>. Acesso em: 10 jan 2023.

PRADO, C. D., MANDRUJANO, G. P., SOUZA, J. P., SGOBBI, F. B., NOVAES, H. R., DA SILVA, J. P., . & CUNHA, A. F.. Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. **Biotechnology for biofuels**, 13, out. 2020, 1-15. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>. Acesso em: 10 jan. 2021.

PREISS, R., TYRAWA, C., KROGERUS, K., GARSHOL, L. M., & VAN DER MERWE, G.. Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. **Frontiers in microbiology**, 2137, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02137> Acesso em: 10 mar. 2022.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em: 15 jan. 2023.

REGENBERG B *et al.* Growth-rate regulated genes have profound impact on interpretation of transcriptome profiling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biology** 7:1–13, 2006.

RICHARD, P., VILJANEN, K., & PENTTILÄ, M.. Overexpression of PAD1 and FDC1 results in significant cinnamic acid decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, 5, fev. 2015, 1-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0103-x>. Acesso em: 22 mar. 2022.

ROMERO-RODRÍGUEZ, R., DURÁN-GUERRERO, E., CASTRO, R., DÍAZ, A. B., & LASANTA, C.. Evaluation of the influence of the microorganisms involved in the production of beers on their sensory characteristics. **Food and Bioproducts Processing**.135, set. 2022, 33-47. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.06.004>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, J. C., ... & SMITH, M.. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, 265(5596), fev. 1977, 687-695. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/265687a0>. Acesso em: 10 jun. 2021.

SCHOLTES, C., NIZET, S., & COLLIN, S.. Guaiacol and 4-methylphenol as specific markers of torrefied malts. Fate of volatile phenols in special beers through aging. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62(39), set. 2014, 9522-9528. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf5015654>. Acesso em: 15 jun 2023.

SIDDIQUI, M. S., THODEY, K., TRENCHARD, I., & SMOLKE, C. D.. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. **FEMS yeast research**, 12(2), Mar. 2012, 144-170. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00774.x>. Acesso em: 23 mar. 2022.

SIPICZKI, M.. Yeast two-and three-species hybrids and high-sugar fermentation. **Microbial biotechnology**, 12(6), mar. 2019, 1101-1108. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13390>. Acesso em: 15 dez. 2022.

SMIT, G., STRAVER, M. H., LUGTENBERG, B. J., & KIJNE, J. W.. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(11), nov. 1992, 3709-3714. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3709-3714.1992>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SOARES, Eduardo V. "Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review." **Journal of applied microbiology** 110.1 (2011): 1-18. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>. Acesso em: 10 jun. 2023.

SOUZA JP de. **Isolamento e caracterização de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* e análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a termotolerância**, 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Genética) -Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

STEENSELS, J., MEERSMAN, E., SNOEK, T., SAELS, V., & VERSTREPEN, K. J.. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. **Applied and environmental microbiology**, 80(22), out. 2014, 6965-6975. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02235-14>. Acesso em: 15 jun. 2022.

STEWART, G. G. *Saccharomyces* species in the production of beer. **Beverages** 2 (4): 34, Dez 2016. Disponível em: . <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>. Acesso em: 15 jun. 2022.

SWIEGERS, J. H., & PRETORIUS, I. S.. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74, abr. 2007, 954-960. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>. Acesso em: 15 jun. 2023.

THOMSON, J. M., GAUCHER, E. A., BURGAN, M. F., DE KEE, D. W., LI, T., ARIS, J. P., & BENNER, S. A.. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Nature genetics**, 37(6), mai. 2005, 630-635. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng1553>. Acesso em: 15 jun. 2023.

TILLOY, V., CADIÈRE, A., EHSANI, M., & DEQUIN, S.. Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **International journal of food microbiology**, 213, nov. 2015, 49-58. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.027>. Acesso em: 15 jun. 2023.

VERSTREPEN, K. J., DEDERLINCKX, G., VERACHETERT, H., & DELVAUX, F. R.. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied microbiology and biotechnology**, 61, jan. 2003, 197-205. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>. Acesso em: 01 out. 2022.

VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G. U. Y., DUFOUR, J. P., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., PRETORIUS, I. S., & DELVAUX, F. R.. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of bioscience and bioengineering**, 96(2), jan. 2003, 110-118. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5). Acesso em: 10 jun. 2023.

VIANA, A. C., PIMENTEL, T. C., DO VALE, R. B., CLEMENTINO, L. S., FERREIRA, E. T. J., MAGNANI, M., & DOS SANTOS LIMA, M.. American pale Ale craft beer: Influence of brewer's yeast strains on the chemical composition and antioxidant capacity. **LWT**, 152, dez. 2021, 112317. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112317>. Acesso em: 10 jun. 2023.

VRIESEKOOP, F., KRAHL, M., HUCKER, B., & MENZ, G.. 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. **Journal of the Institute of Brewing**, 118(4), fev. 2013, 335-345. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.49>. Acesso em: 27 set. 2023.

WALKER, G. M., & STEWART, G. G.. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, 2(4), nov. 2016, 30. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>. Acesso em: 10 jul. 2023.

WANG, Q. M., LIU, W. Q., LITI, G., WANG, S. A., & BAI, F. Y.. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. **Molecular ecology**, 21(22), ago. 2012, 5404-5417. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05732.x>. Acesso em: 10 jul. 2023.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J.. YEAST: The Practical Guide to Beer Fermentation. 1. ed. Colorado: Brewers Publications, 2010, cap. 2, p. 38.

Anexos

Anexo A – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM MICROPLACAS 96 POÇOS

EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM LINHAGENS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA EM MICROPLACAS

LINHAGENS A SEREM UTILIZADAS

LBGA01, LBGA287, LBGA288, Hv8, Hb1, SO4 (controle), WB06 (controle)*

Primeiro experimento utilizar SO4 como controle – fazer duplicata

Segundo experimento utilizar WB06 como controle – fazer duplicata

MEIOS E SOLUÇÕES:

- 1. Preparar YPM 1,25 X (1,25% Extrato de levedura, 2,5% Peptona, e 2,5% de maltose)***

Para 100 mL:

1,25g Extrato de levedura,

2,5g Peptona

2,5g de maltose

***Essa proporção será realizada para que a concentração final de maltose em todos os experimentos seja de 2%**

- 2. Preparar Solução A:**

Diluir a solução de iso- α -ácido 9% (Barth-Haas, Nuremberg, Alemanha) na proporção de 1:1000 **com YPEM 2,5%** (ao invés de água ou etanol)

Preparar 5 mL:

5 μ L de solução de iso- α -ácido 9%

5 mL de YEPD 2,5%

- 3. Preparar Solução B:**

Diluir a solução de iso- α -ácido 9% (Barth-Haas, Nuremberg, Alemanha) na proporção de 1:100 **com YPEM 2,5%** (ao invés de água ou etanol)

Preparar 2 mL:

10 µL de solução de iso-α-ácido 9%

1,99 mL de YEPD 2,5%

EXPERIMENTO**Pré inóculo**

Fazer o pré inóculo em 3 mL de YEPD e deixar overnight a 30 °C

Inóculo

Centrifugar os pre-inóculos a 4000 RPMs por 3 minutos

Ressuspender em 3 mL de água

Medir a DO_{600nm} dos pré inóculos e diluir com água todas as linhagens para $DO_{600nm} = 1$ (usar água como branco). Essa solução será utilizada na proporção de 1:10 de modo que a DO_{600nm} inicial seja de 0,1

O experimento será realizado em duas temperaturas a saber: 20 e 30 °C. Dessa forma os experimentos abaixo devem ser pipetados em 2 placas de acordo com a Figura 01 a seguir:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	EXPERIMENTO
A	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	CONTROLE YPEM 2%
B	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	ETANOL 5%
C	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	ETANOL 10%
D	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LUPULO 50 PPM
E	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LUPULO 90 PPM
F	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	ETANOL 5% + 50 PPM LUPULO
G	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	LBGA-01	LBGA 287	LBGA 288	HV8	Hb01	S04	ETANOL 5% + 90 PPM LUPULO
H	MEIO DE CULTURA												BRANCO

Figura 01 Delineamento experimento de crescimento celular em placas 96 poços com disposição de linhagens de interesse: LBGA-01, LBGA-287, LBGA-288, Hv8 e Hb1 e comerciais: S04 e WB06R® (referência) em meio referência: Controle YPEM 2% e agentes estressores: Etanol 5%, Etanol 10%, Lúpulo 50 ppm, Lúpulo 90 ppm e suas combinações: Etanol 5% & Lúpulo 50 ppm e Etanol 5% & Lúpulo 90 ppm

1. Fileira A - Avaliação de crescimento em YPM 2% (controle)

Por poço de reação (120 µL), preparar:

#108 µL de meio YPM 1,25X – para 13 poços (1404 µL de meio)

#12 µL de inóculo DO 1,0 - para 13 poços (156 µL de inóculo)

2. Fileira B - Avaliação de crescimento em YPM 2%+ Etanol 5% (v/v)

Por poço de reação (120 µL), preparar:

6 µL de etanol 99,5% (v/v) – para 13 poços (78 µL de etanol)

102 µL de YPM 1,25X – para 13 poços (1326 µL de meio)

#12 µL de inóculo DO 1,0 -

3. Fileira C - Avaliação de crescimento em YPEM 2% + Etanol 10% (v/v)

Por poço de reação (120 µL), preparar:

12 µL de etanol 99,5% (v/v) – para 13 poços (156 µL de etanol)

96 µL de YPM 1,25X – para 13 poços (1248 µL de meio)

#12 µL de inóculo DO 1,0

4. Fileira D - Avaliação de crescimento em YPEM 2% + 50 ppm Iso-α-ácido

Por poço de reação (120 µL), preparar:

68 µL de **Solução A** – para 13 poços (884 µL de solução A)

#40 µL de YPEM 1,25X (520 µL de meio)

12 µL inóculo DO 1,0 d

5. Fileira E- Avaliação de crescimento em YPEM 2% + 90 ppm Iso-α-ácido

Por poço de reação (120 µL), preparar:

12 µL de **Solução B** – para 13 poços (156 µL de solução B)

#96 µL de YPEM 1,25X (1248 µL de meio)

12 µL inóculo DO 1,0

6. Fileira F - Avaliação de crescimento em YPEM 2% + Etanol 5% (v/v) e 50 ppm Iso- α -ácido

Por poço de reação (120 μ L), preparar:

6 μ L de etanol 99,5% (v/v) – para 13 poços (78 μ L de etanol)

68 μ L de **Solução A** – para 13 poços (884 μ L de solução A)

34 μ L de YPEM 1,25X (442 μ L de meio)

12 μ L inóculo DO 1,0

7. Fileira G - Avaliação de crescimento em YPEM 2% + Etanol 5% (v/v) e 90 ppm Iso- α -ácido

Por poço de reação (120 μ L), preparar:

6 μ L de etanol 99,5% (v/v) – para 13 poços (78 μ L de etanol)

12 μ L de **Solução B** – para 13 poços (156 μ L de solução B)

90 μ L de YPEM 1,25X (1170 μ L de meio)

12 μ L inóculo DO

Anexo B – RECEITA DE MOSTO CERVEJEIRO INDUSTRIAL (SENSORIAL)

Mosto_cerveja_ufscar

Blonde Ale (18 A)

Type: All Grain
Batch Size: 50,00 L
Boil Size: 57,08 L
Boil Time: 60 min
End of Boil Vol: 55,04 L
Final Bottling Vol: 48,00 L
Fermentation: Ale, Single Stage

Date: 01 May 2023
Brewer: Fish
Asst Brewer:
Equipment: SingleVesselJeferson
Efficiency: 72,00 %
Est Mash Efficiency: 76,1 %
Taste Rating: 30,0



Taste Notes: Mosto definido para atender cervejas com objetivo de teste sensorial o/ cepas teste: LGBA1 / 287 / Hv8 / S04 (padrão comercial)

Prepare for Brewing

☐ Hydrate yeast with 8051,88 ml warm water and add optional 402.6 g of GoFerm
☐ Clean and Prepare Brewing Equipment
☐ Total Water Needed: 71,60 L
☐ Mash Water Acid: None

Water Prep

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
138,89 L	Munich, Germany	Water	1	-	-
13,21 g	Calcium Chloride (Mash)	Water Agent	2	-	-

Mash or Steep Grains

Mash Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
10000,0 g	Pilsner (2 Row) Ger (3,9 EBC)	Grain	3	95,2 %	6,52 L
500,0 g	Carahell (Weyermann) (25,6 EBC)	Grain	4	4,8 %	0,33 L

Mash Steps

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Amada Mosto	Add 36,75 L of water at 36,7 C	35,0 C	2 min
Rep. proteolítico	Heat to 52,0 C over 18 min	52,0 C	20 min
Rep. Beta_amilase	Heat to 68,0 C over 10 min	68,0 C	45 min
Inativação enzimática	Heat to 78,0 C over 1 min	78,0 C	10 min

☐ Sparge Water Acid: None
☐ Fly sparge with 34,85 L water at 75,6 C
☐ Add water to achieve boil volume of 57,08 L
☐ Estimated pre-boil gravity is 1,043 SG

Boil Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
30,00 g	Mandarina Bavaria [9,80 %] - Boil 60,0 min	Hop	5	14,9 IBUs	-

☐ Estimated Post Boil Vol: 55,04 L and Est Post Boil Gravity: 1,047 SG

Cool and Transfer Wort

☐ Cool wort to fermentation temperature
☐ Transfer wort to fermenter
☐ Add water if needed to achieve final volume of 50,00 L

Pitch Yeast and Measure Gravity and Volume

Fermentation Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
12,5 pkg	SafAle English Ale (DCU/Fermentis #G-04) [23,66 ml]	Yeast	6	-	-

Figura 02 Receita de mosto para obtenção cervejas para testes sensoriais – parte I. Fonte: O próprio autor. Obtida mediante software: Beersmith 3 v.3.0.8

☐ Measure Actual Original Gravity _____ (Target: 1,047 SG)
☐ Measure Actual Batch Volume _____ (Target: 50,00 L)

Fermentation

☐ 01 May 2023 - Primary Fermentation (10,00 days at 20,0 C ending at 20,0 C)
☐ 11 May 2023 - Secondary Fermentation (2,00 days at 20,0 C ending at 22,0 C)
☐ 13 May 2023 - Tertiary Fermentation (7,00 days at 22,0 C ending at 10,0 C)

Dry Hop and Bottle/Keg

☐ Measure Final Gravity: _____ (Estimate: 1,013 SG)
☐ Date Bottled/Kegged: 20 May 2023 - Carbonation: Keg with 0,86 bar
☐ Age beer for 7,00 days at 10,0 C
☐ 27 May 2023 - Drink and enjoy!

Notes

Figura 03 Receita de mosto para obtenção cervejas para testes sensoriais – parte II. Fonte: O próprio autor. Obtida mediante software: Beersmith 3 v.3.0.8

Anexo C -TABELA COM NÚMERO MÍNIMO DE JULGAMENTOS NECESSÁRIOS – TESTE TRIANGULAR

Tabela 01 Número mínimo de respostas para que exista diferença significativa entre amostras – Teste Triangular para diversos níveis de probabilidade (α)

Nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
5	4	5	5	5	5	5	-
6	5	5	5	5	6	6	-
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	13	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	14	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17

Fonte: ABNT, NBR 12.995, 1993

Anexo D – MODELO DE FICHA ORGANIZADORA PARA TESTE TRIANGULAR

FICHA DE CONTROLE

Tipo de teste: **TRIANGULAR**

DATA: ____/____/____

PRODUTOS:

A: 543 785 (Exemplo) _____

B: 236 779 (Exemplo) _____

Tabela 02 Disposição de amostras apresentadas ao painel sensorial de forma aleatória e randomizada. Amostras identificadas são representadas por dois códigos distintos.

PROVADORES	POSIÇÃO DAS AMOSTRAS			RESPOSTA DO PROVADOR
1-	A (543)	A (785)	B (236)	
2-	A (785)	B (779)	A (543)	
3-	B	A	A	
4-	B	B	A	
5-	B	A	B	
6-	A	A	B	
7-	A	B	A	
8-	B	A	A	
9-	B	B	A	
10-	B	A	B	
Nº JULGAMENTOS				
Nº DE RESPOSTAS CORRETAS				
OBSERVAÇÕES:				

Fonte: ABNT, NBR 12.995, 1993

Anexo E – Julgamentos sensoriais obtidos em Teste discriminatório por painel profissional (PP) e tratamento estatístico mediante ANOVA

Tabela 03 Resultados do Teste descritivo para julgamentos das Linhagens de interesse: LBGA-01, 287 e Hv8 e Linhagem de referência: WB06® Fermentis. Atributos avaliados: “Frutado”, “Floral”, “Cítrico”, “Condimentado”, “Ácido”, “Retrogosto” e “Corpo”

Julgador	Linhagem	Atributos						
		Frutado	Floral	Cítrico	Condimentado	Ácido	Retrogosto	Corpo
1	LBGA-01	2	3	3	4	3	3	3
2	LBGA-01	6	1	0	4	3	4	4
3	LBGA-01	4	1	0	7	0	4	1
4	LBGA-01	4	0	0	7	5	6	3
5	LBGA-01	3	1	1	4	1	5	4
6	LBGA-01	5	3	5	7	2	4	5
7	LBGA-01	6	2	6	7	3	4	5
1	287	5	5	4	3	3	5	4
2	287	2	0	0	3	5	3	2
3	287	4	1	1	3	0	5	3
4	287	4	2	0	7	4	5	4
5	287	4	1	2	4	1	7	4
6	287	5	4	6	6	1	5	6
7	287	5	5	7	6	1	5	6

1	Hv8	6	3	4	4	4	4	3
2	Hv8	4	1	0	3	4	7	3
3	Hv8	2	4	0	3	1	4	1
4	Hv8	4	1	0	7	4	5	7
5	Hv8	4	2	1	3	1	7	5
6	Hv8	5	6	5	5	4	7	6
7	Hv8	4	7	5	5	4	4	7
1	WB06®	7	3	2	5	2	6	3
2	WB06®	8	2	0	8	5	6	4
3	WB06®	6	2	0	7	1	5	2
4	WB06®	4	0	0	9	6	5	0
5	WB06®	8	4	5	7	3	7	5
6	WB06®	7	5	6	6	4	7	4
7	WB06®	7	5	7	6	4	7	5

Fonte: O próprio autor

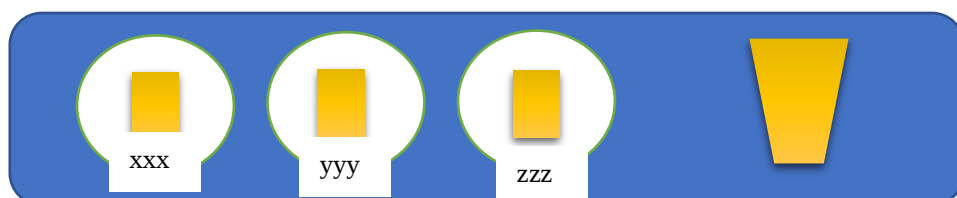
Tabela 04 Tabela de valores médios para julgamentos do painel profissional (PP) e tratamento estatístico por ANOVA

	Atributos						
Linhagem	Frutado	Floral*	Cítrico*	Condimentado	Ácido	Retrogosto	Corpo*
LBGA-01	4,286±1,496 ^a	1,571±1,134	2,143±2,545	5,714±1,604 ^a	2,429±1,618 ^a	4,286±0,951 ^a	3,571±1,397
287	4,143±1,069 ^{ab}	2,571±2,07	2,857±2,854	4,571±1,718 ^{ab}	5,000±1,155 ^b	5,000±1,155 ^a	4,143±1,464
Hv8	4,143±1,215 ^{abc}	3,429±2,370	2,143±2,410	4,286±1,496 ^{abc}	4,286±1,496 ^a	5,000±1,414 ^a	4,571±2,299
WB06®	6,417±1,380 ^d	3,000±1,826	2,857±3,078	7,286±1,113 ^a	2,571±1,718 ^a	6,143±0,899 ^b	3,286±1,799
Valor <i>P</i>	0,00205	0,324090	0,922678	0,004045	0,025939	0,038495	0,540911
F calculado	6,612673	1,219672	0,159235	5,772486	3,682291	3,273584	0,735849
F crítico	3,008786	3,008786	3,008786	3,008786	3,008786	3,008786	3,008786
Significância	S	NS	NS	S	S	S	NS

Nota: Julgamento de sete atributos: “Frutado”, “Floral”, “Cítrico”, “Condimentado”, “Ácido”, “Retrogosto” e “Corpo” para as linhagens de potencial sensorial: LBGA-01, 287 e Hv8, além da linhagem comercial WB06® Fermentis. A cada coluna, resultados seguidos por pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Valores sem letras correspondem a atributos sem diferença estatística pelo teste ANOVA a 5% de significância. Resumo dos resultados do teste ANOVA: S – Significante (F calculado ≥ F crítico e/ou Valor *p* < 0,05); NS – Não Significante (F calculado < F crítico e Valor *p* ≥ 0,05). Fonte: O próprio autor

Anexo F – Modelo de ficha utilizada para condução e coleta de julgamento
(Teste triangular)

TESTE TRIANGULAR



Nome: _____ Data: ____/____/____

Prove as amostras da esquerda para a direita.
Duas amostras são iguais e uma é diferente.
Identifique com um círculo a amostra **diferente**.

Xxx

Yyy

Zzz

Comentários:

Anexo G - SEQUÊNCIA DO ITS DAS LINHAGENS INVESTIGADAS

LINHAGEM "287"

>Contig1 287.fasta.screen.ace.2 from 59 to 670

```
CGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACG
GTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGA
GTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCCAGAGGTAACAAAC
ACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGAAATTTT
AAAATATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTTTCAAACATTCTGTTTGGT
AGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATTTTTTTTTTCC
AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTATAGTTTTACCAA
CTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAA
```

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-81JHV7EW013

Home Recent Results Saved Strategies Help

Take the BLAST survey today [Start survey](#)

[Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾

How to read this report? [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [81JHV7EW013](#) Search expires on 06-09 02:19 am [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID IclQuery_15011

Description None

Molecule type dna

Query Length 612

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) ▾ [Select columns](#) ▾ Show 100 ▾ [?](#)

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate KMRA2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Saccharomyces...	1122	1122	100%	0.0	99.67%	828	OP881680.1
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate KEA2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Saccharomyces...	1120	1120	100%	0.0	99.67%	819	OP881678.1
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate KLB3L internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Saccharomyces...	1120	1120	100%	0.0	99.67%	823	OP881675.1
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate D13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Saccharomyces...	1120	1120	100%	0.0	99.67%	752	QQ275097.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain ITD-1MA-26 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Saccharomyces...	1120	1120	100%	0.0	99.67%	811	OP795946.1

LINHAGEM “288”

>Contig1 288.fasta.screen.ace.2 from 61 to689

```
GTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTCTTGCTATT
CCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGT TATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACA
CTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGGCCCAGAGGT
AACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGG
AAATTTTAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCT
GTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTT
TTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTT
TTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGAT
```

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information [Log in](#)

BLAST® » blastn suite » results for RID-81JXUGPP013 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

[Take the BLAST survey today](#) [Start survey](#)

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title: Nucleotide Sequence

RID: [81JXUGPP013](#) Search expires on 06-09 02:26 am [Download All](#)

Program: BLASTN [Citation](#)

Database: nt [See details](#)

Query ID: Icd|Query_105903

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 629

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show 100](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate D13 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA...	Saccharomyces ...	1162	1162	100%	0.0	100.00%	752	OQ275097.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain ITD-1MA-26 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosoma...	Saccharomyces ...	1162	1162	100%	0.0	100.00%	811	OP795946.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain ITD-1MA-23 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosoma...	Saccharomyces ...	1162	1162	100%	0.0	100.00%	803	OP795944.1

LINHAGEM “Hb1”

>Contig1 HB1.fasta.screen.ace.2 from 36 to 578

```
GCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAG
GCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAA
TTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCAT
TCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTGTG
AAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCCATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGGCATGCCTGTTTGA
GCGTCATTTCTTTTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAAT
TGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCA
```

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-81K3F6TB013 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

Take the BLAST survey today [Start survey](#)

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title: Nucleotide Sequence
 RID: 81K3F6TB013 [Search expires on 06-09 02:29 am](#) [Download All](#)
 Program: BLASTN [Citation](#)
 Database: nt [See details](#)
 Query ID: lcl|Query_95647
 Description: None
 Molecule type: dna
 Query Length: 543
 Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate D13 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA ge...	Saccharomyces...	992	992	100%	0.0	99.63%	752	OQ275097.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain ITD-1MA-36 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal...	Saccharomyces...	992	992	100%	0.0	99.63%	758	OP795952.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain ITD-1MA-26 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal...	Saccharomyces...	992	992	100%	0.0	99.63%	811	OP795946.1

LINHAGEM “Hv8”

>Contig1 HV8.fasta.screen.ace.2 from 643 to 1310

```
GCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAG
GCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAA
TTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCAT
TCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTC
AAAAACAAGAATTTTCGTAACGAAATTTTAAATATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGGCATGCCTGTTTGA
GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAAT
TGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAA
TGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATACTGAGCGTATTG
GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAG
```

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

BLAST® » blastn suite » results for RID-81K6XUDV013 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

Take the BLAST survey today [Start survey](#)

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [81K6XUDV013](#) Search expires on 06-09 02:30 am [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID IclQuery_37201

Description None

Molecule type dna

Query Length 668

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Saccharomyces cerevisiae strain CNMN-Y-33 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA	Saccharomyces...	1234	1234	100%	0.0	100.00%	722	MT841207.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain CNMN-Y-31 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA	Saccharomyces...	1234	1234	100%	0.0	100.00%	737	MT840330.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain T15-20 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA	Saccharomyces...	1234	1234	100%	0.0	100.00%	771	MT522378.1

LINHAGEM COMERCIAL “S04” – PADRÃO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

>Contig1 S04.fasta.screen.ace.2 from 50 to 649

```
AGTCCAGCCGGGCGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT
TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACAC
ACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCCCGAGG
TAACAAACCCCAACAATTTTTTTTTTTTCTTAAATTTTTTCAAAAACAAGAATTTTTGTAACTGG
AAATTTTAAATTTTAAAACTTTCAACAACGGATTTTTTGGTTTTTCCATCGATGAAGAACCCA
AGGAAATGGGATACGTAATTTGAATTGCAAAATCCGGGAATCATTGAATTTTTGAACCCCCC
TTGCCCCCTTGGTTTTCCCGGGGGCCTCCCTGTTGGGGGTCATTTCTTTTCAAACCTTTTTT
TTGGTAGGGAGGGATACTTTTTGGGGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCTTTGGATTTTTT
TTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTT
ACCAACTGCGGCTAATCTTTT
```

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information [Log in](#)

BLAST® » blastn suite » results for RID-81M8GAF9016 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

[Take the BLAST survey today](#) [Start survey](#)

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	81M8GAF9016 Search expires on 06-09 02:48 am Download All
Program	BLASTN Citation
Database	nt See details
Query ID	lclQuery_45101
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	600
Other reports	Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate K29 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Saccharomyces...	909	909	100%	0.0	94.00%	761	MN796449.1
☒	Saccharomyces cerevisiae isolate YMA1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA...	Saccharomyces...	905	905	100%	0.0	93.85%	790	MH299886.1
☒	Saccharomyces cerevisiae strain TU14 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Saccharomyces...	900	900	100%	0.0	93.69%	1202	KU535592.1

LINHAGEM CÂNDIDA SP. – PADRÃO NÃO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

>Contig1 CAN.fasta.screen.ace.2 from 20 to 495

```
TTTTCTTTGAAACAACTTGCTTTGGCGGTGGGCCCAGCCTGCCGCCAGAGGTCTAAACTTACA
ACCAATTTTTTATCAACTTGTACACCAGATTATTACTAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATC
TCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATAT
TCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTT
TGAGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGACTTGGGTTTGCTTG
AAAGACGGTAGTGTAAGGCGGGATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAACATTG
CTTGCGGCGGTAACGTCCACCACGTATATCTTCAAACCTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG
```

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information Log in

BLAST® » blastn suite » results for RID-81MEX7WG013 Home Recent Results Saved Strategies Help

Take the BLAST survey today Start survey

[← Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title Contig1 CAN.fasta.screen.ace.2 from 20 to...

RID [81MEX7WG013](#) Search expires on 06-09 02:52 am [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID IclQuery_61475

Description Contig1 CAN.fasta.screen.ace.2 from 20 to 495

Molecule type dna

Query Length 476

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to
Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Candida sp. (in: Saccharomycetales) clone 87.1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	[Candida] sp. (un...	880	880	100%	0.0	100.00%	494	ON907752
☒	Candida sp. (in: Saccharomycetales) clone 63.2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	[Candida] sp. (un...	880	880	100%	0.0	100.00%	498	ON907750
☒	Candida sp. (in: Saccharomycetales) clone 54.2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	[Candida] sp. (un...	880	880	100%	0.0	100.00%	497	ON907745

Anexo H - RECEITA DE MOSTO CERVEJEIRO INDUSTRIAL (SCALE UP)

25 - Dunkelweizen_Dr.2024

Dunkles Weissbier (10 B)

Type: All Grain
Batch Size: 25,00 L
Boil Size: 35,25 L
Boil Time: 60 min
End of Boil Vol: 31,25 L
Final Bottling Vol: 20,00 L
Fermentation: Ale, Single Stage

Date: 28 Nov 2017
Brewer: Fish
Asst Brewer:
Equipment: SingleVessel_Peixe
Efficiency: 72,00 %
Est Mash Efficiency: 86,4 %
Taste Rating: 30,0



Taste Notes:

Prepare for Brewing

- ☐ No yeast starter used
- ☐ Clean and Prepare Brewing Equipment
- ☐ Total Water Needed: 45,51 L
- ☐ Mash Water Acid: None

Water Prep

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
13,89 L	Munich, Germany (DunkelWeizen)	Water	1	-	-
2,60 g	Calcium Chloride (Mash)	Water Agent	2	-	-
2,00 g	Gypsum (Calcium Sulfate) (Mash)	Water Agent	3	-	-
2,00 ml	Phosphoric Acid 85% (Mash)	Water Agent	4	-	-
1,04 g	Baking Soda (Mash)	Water Agent	5	-	-
0,00 g	Chalk (Mash)	Water Agent	6	-	-
0,00 g	Epsom Salt (MgSO4) (Mash)	Water Agent	7	-	-

Mash or Steep Grains

Mash Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
2,00 kg	Wheat Malt, Bel (3,9 EBC)	Grain	8	38,1 %	1,30 L
1,50 kg	Munich Malt - 10L (19,7 EBC)	Grain	9	28,6 %	0,98 L
1,20 kg	Pilsen Alemão Globalmalt (3,7 EBC)	Grain	10	22,9 %	0,78 L
0,30 kg	Caramunich Malt (110,3 EBC)	Grain	11	5,7 %	0,20 L
0,15 kg	Carafa II (811,6 EBC)	Grain	12	2,9 %	0,10 L
0,10 kg	Carafa II (entrar na filtração) (811,6 EBC)	Grain	13	1,9 %	0,07 L

Mash Steps

Name	Description	Step Temperature	Step Time
arriada	Add 20,75 L of water at 59,5 C	55,0 C	10 min
sacarificação	Heat to 65,0 C over 4 min	65,0 C	60 min
alfa amilase	Heat to 72,0 C over 4 min	72,0 C	20 min
finalização	Heat to 76,0 C over 4 min	76,0 C	5 min

- ☐ Sparge Water Acid: None
- ☐ Fly sparge with 24,76 L water at 76,0 C
- ☐ Add water to achieve boil volume of 35,25 L
- ☐ Estimated pre-boil gravity is 1,039 SG

Boil Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
9,00 g	Hallertau Magnum [12,50 %] - Boil 60,0 min	Hop	14	9,4 IBUs	-

- ☐ Estimated Post Boil Vol: 31,25 L and Est Post Boil Gravity: 1,046 SG

Cool and Transfer Wort

- ☐ Cool wort to fermentation temperature
- ☐ Transfer wort to fermenter
- ☐ Add water if needed to achieve final volume of 25,00 L

Pitch Yeast and Measure Gravity and Volume

Fermentation Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU	Volume
0,6 pkg	Hefeweizen Ale (White Labs #WLP300) [35,49 ml]	Yeast	15	-	-

- ☐ Measure Actual Original Gravity _____ (Target: 1,046 SG)
- ☐ Measure Actual Batch Volume _____ (Target: 25,00 L)

Fermentation

- ☐ 28 Nov 2017 - Primary Fermentation (9,00 days at 17,0 C ending at 17,0 C)

Dry Hop and Bottle/Keg

- ☐ Measure Final Gravity: _____ (Estimate: 1,009 SG)
- ☐ Date Bottled/Kegged: 07 Dec 2017 - Carbonation: Bottle with 117,64 g Corn Sugar
- ☐ Age beer for 15,00 days at 3,0 C
- ☐ 22 Dec 2017 - Drink and enjoy!

Notes