

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

THAIS LOPES

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS DE *Citrus reticulata* COM POTENCIAL PARA A FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS

Porto Alegre

2016

THAIS LOPES

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS DE *Citrus reticulata* COM POTENCIAL PARA A FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase Biotecnologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Valente da Silva

Coorientadora: Biotecnologista Fernanda Otesbelgue Pinto

Porto Alegre

2016

“Se você não preenche as suas palavras com a substância da sua vida, elas serão sempre sinos rachados de uma igreja abandonada. Mas muitos invertem a fórmula, preenchendo com meras palavras o vazio das suas vidas.” Olavo de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais pela criação, formação e todo apoio, sem os quais jamais estaria onde estou hoje. Obrigada por serem meus pilares.

Ao meu namorado por ser muito mais que um companheiro: ser meu melhor amigo, meu refúgio e socorro em todos os momentos – seja para ouvir, aconselhar, comemorar e sofrer junto ou por me buscar as 20h no ICBS!

Aos meus queridos pkis por serem exatamente o que são: amigos. Sem vocês, a faculdade não teria sido a mesma coisa. Obrigada por dividirem comigo todas as angústias e dúvidas sobre o curso, os trabalhos, os sentimentos, a vida.

Aos meus queridos amigos de colégio com quem divido uma amizade e irmandade de anos. Obrigada por sempre torcerem e vibrarem comigo.

Aos amigos e companheiros de laboratório pelos cafés, pelo companheirismo e pelas histórias e risadas divididas.

Por fim, e não menos importante, meu eterno agradecimento mais do que especial a minha orientadora, prof^a Patrícia, e a minha coorientadora e querida colega, Fernanda, por me permitirem fazer parte deste belo projeto. Muito obrigada pela orientação, companheirismo, paciência e dedicação com este trabalho!

RESUMO

A cerveja é um produto obtido a partir da fermentação alcoólica de grãos maltados. Boa parte dos insumos utilizados no Brasil para esta produção é importado, incluindo o fermento. Assim, o isolamento de novas linhagens tem sido um aspecto importante na indústria cervejeira, uma vez que possíveis melhoramentos no processo podem ser aplicados pela exploração da biodiversidade natural dos fungos. Com o crescimento significativo do mercado das cervejas artesanais e as novas exigências do consumidor torna-se interessante o isolamento de leveduras que tragam características diferenciadas em relação ao aroma, sabor ou aspecto do produto. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de isolados de leveduras selvagens para fermentação de cervejas. Foi feita caracterização macroscópica da morfologia colonial das linhagens isoladas. Nove leveduras foram selecionadas da casca e da polpa de tangerinas locais (*Citrus reticulata*) utilizando-se os testes de exclusão: fermentação de carboidratos presentes no mosto cervejeiro (glicose, sacarose e maltose); a produção de H₂S, principal causador de *off-flavors*; tolerância a diferentes concentrações de etanol (5% e 10%) e ao estresse osmótico (mosto com densidades 12 °P, 16 °P e 20 °P). Os isolados também foram avaliados quanto a sua capacidade de crescimento em diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C, 25 °C e 37 °C) e à porcentagem de floculação (baixa, média e alta). A identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA, sendo dois isolados do gênero *Saccharomyces*, um do gênero *Candida* e seis do gênero *Pichia*. As leveduras selecionadas apresentaram capacidade de fermentação de glicose, sacarose e maltose; nenhuma, pouca ou média produção de H₂S; tolerância a condições normais de fermentação (5% de etanol, 12 °P). Os testes de floculação e crescimento em diferentes temperaturas auxiliam no enquadramento do estilo de cerveja mais adequado para cada levedura, porém mais estudos são necessários para avaliar o perfil destes isolados. A obtenção de linhagens com fenótipos desejáveis para a produção de cerveja contribuirá para o desenvolvimento científico e tecnológico deste setor, oferecendo um produto biotecnológico nacional como alternativa ao fermento importado e conferindo mais independência e autonomia ao mercado cervejeiro.

Palavras-chave: cerveja, levedura, isolamento, fermentação.

ABSTRACT

Beer is a product obtained by the alcoholic fermentation of malted grains. Most of the ingredients used in Brazil for its production are imported, including yeasts. Therefore, the isolation of national wild yeast has been an important aspect in beer industry, once that possible improvements in the process can be applied by exploiting the natural biodiversity of fungi. The growth of the craft beer market is increasingly looking for a quality product along with a cultural identity that beer can bring to its original region. Thus, this study aimed to analyze the potential of isolated wild yeasts for brewing. The macroscopic characterization of isolate's colonial morphology was made. Nine yeasts were selected from the bark and the pulp of local tangerines (*Citrus reticulata*) using exclusion tests: fermentation of wort carbohydrates (glucose, sucrose, maltose); H₂S production, main responsible for off-flavors; the ability to tolerate ethanol (5% e 10%) and sugar (gravity's wort of 12 °P, 16 °P and 20 °P) different concentrations. The strains were also evaluated for their capacity to grow at different temperatures (10 °C, 20 °C, 25 °C and 37 °C) and flocculation percentage (low, medium and high). Molecular identification was made by sequencing D1/D2 domain 26S rDNA gene having two strains from *Saccharomyces*, one from *Candida* and six from *Pichia* genus. The selected yeasts shown capacity to ferment glucose, sucrose and maltose; none, low or medium production of H₂S; tolerance of normal fermentation conditions (ethanol 5%, 12 °P). The flocculation and growth at different temperatures assays help to classify the suitable beer style for these yeasts, nevertheless more studies are needed to evaluate the profile of the strains. Obtaining lineages with desirable phenotypes for brewing will contribute to the scientific and technological development of this sector, offering a national biotechnological product as an alternative to imported yeast, conferring more independence and autonomy to the brewing market.

Keywords: beer, yeast, isolation, fermentation.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura celular de uma levedura (BIOCOURSEAWARE, 2012).....	18
Figura 2. Curva de crescimento de uma levedura. Absorbância da suspensão celular medida em espectrofotômetro a 600 nm durante diferentes fases do crescimento (HELD, 2010).....	20
Figura 3. Fermentação alcoólica: formação de etanol e gás carbônico a partir do piruvato gerado na glicólise (NELSON & COX, 2012).....	21
Figura 4. Imagem representativa da escala de leitura no tubo de Durham utilizada como critério de análise da fermentação dos carboidratos glicose, sacarose e maltose. a) resultado negativo ou zero; b) resultado +1 (1/3 de preenchimento); c) resultado +2 (2/3 de preenchimento); d) +3 (tubo totalmente preenchido por CO ₂).....	26
Figura 5. Fermentação espontânea do mosto cervejeiro contendo suco extraído da polpa de tangerina.....	32
Figura 6. Resultados representativos do teste de produção de H ₂ S. 1- Heffeweizen; 2- US-05; 3- PB113; 4- Candida albicans ATCC 28367.....	41
Figura 7. Ensaio de tolerância a diferentes concentrações de açúcar e etanol em Ágar DME. Representação da inoculação das leveduras utilizando a técnica replica plate. 0- ausência de crescimento; 1- pouco crescimento; 2- crescimento médio; 3- muito crescimento.....	43

Lista de tabelas

Tabela 1. Teste de tolerância ao estresse osmótico e ao etanol. As leveduras isoladas foram submetidas a seis ensaios, combinando duas diferentes concentrações de etanol e três diferentes concentrações de açúcares do mosto.....	28
Tabela 2. Morfologia colonial das leveduras isoladas e dos controles US-05 e Heffeweizen.....	34
Tabela 3. Resultado da fermentação de diferentes carboidratos pelos isolados. As leveduras comerciais US-05 e Heffeweizen foram utilizadas como controle. F- fermentadora; NF- não-fermentadora.....	38
Tabela 4. Produção de sulfeto de hidrogênio pelas linhagens comerciais US-05, Heffeweizen e pelos isolados fermentadores de maltose. 1- colônias brancas: não produz H ₂ S; 2- colônias bege: produz pequena quantidade de H ₂ S; 3- colônias marrons: média produção de H ₂ S; 4- colônias pretas: alta produção de H ₂ S.....	42
Tabela 5. Tolerância ao estresse osmótico e ao etanol pelas linhagens comerciais US-05, Heffeweizen e pelos isolados selecionados.....	44
Tabela 6. Crescimento das leveduras comerciais US-05, Heffeweizen e dos isolados em quatro diferentes temperaturas. 1- pouco crescimento; 2- crescimento médio; 3- crescimento grande.....	46
Tabela 7. Análise da sensibilidade ao EDTA e do percentual de floculação dos isolados e da linhagem comercial US-05. Classificação das leveduras quanto a floculação: A = alta; M = média; B = baixa.....	49
Tabela 8. Resultado do sequenciamento dos isolados fermentadores de maltose e percentual de identidade.....	51

Lista de abreviaturas e siglas

APA	American Pale Ale
ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
DME	Extrato de Malte Seco (Dry Malt Extract)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleico fosfatado
DO _{600nm}	Densidade Óptica lida a 600 nanômetros
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
h	hora
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio ou Ácido Sulfídrico
HCl	Ácido Clorídrico
IPA	India Pale Ale
MBF	Meio Básico para Fermentação de açúcares
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
°C	Graus Celsius
°P	Graus Plato
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Breve histórico da cerveja.....	12
1.2 A cerveja no Brasil	13
1.3 Escolas e tipos de cervejas	14
1.4 As leveduras.....	16
1.5 Bioquímica da cerveja.....	19
1.6 Citrus reticulata.....	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos:	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Coleta das amostras e isolamento	25
3.2 Seleção das leveduras por testes de exclusão	25
3.2.1 Avaliação da fermentação de fontes de carbono	25
3.2.2 Análise da produção de H ₂ S.....	27
3.2.3 Tolerância ao estresse osmótico e ao etanol.....	27
3.2.4 Análise da porcentagem de floculação	28
3.3 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados	29
3.3.1 Testes morfológicos	29
3.3.2 Crescimento em diferentes temperaturas	29
3.4 Identificação molecular.....	29

3.4.1 Extração de DNA genômico	29
3.4.2 Amplificação do DNA Genômico.....	30
3.4.3 Sequenciamento	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Coleta das amostras e isolamento	32
4.2 Morfologia colonial	32
4.3 Fermentação de diferentes fontes de carbono.....	33
4.4 Análise da produção de H ₂ S	40
4.5 Avaliação da tolerância ao etanol e ao estresse osmótico	42
4.6 Crescimento em diferentes temperaturas	45
4.7 Análise da capacidade de floculação	47
4.8 Identificação molecular.....	49
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
6 BIBLIOGRAFIA	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico da cerveja

Bebidas e alimentos fermentados possuem grande impacto nas sociedades devido à sua importância cultural e econômica, fazendo parte do cotidiano da maioria das pessoas. Inicialmente, as civilizações humanas eram nômades e migravam conforme a disponibilidade de recursos nos locais. O desenvolvimento das atividades de domesticação de animais e cultivo de plantas pelo homem pré-histórico iniciou uma fase de sedentarização humana, levando ao surgimento da agricultura e a formação das primeiras civilizações. Pela necessidade em produzir seu próprio alimento, o homem da Antiguidade passa a aprimorar as técnicas de plantio, desenvolvendo a produção de novos alimentos, principalmente a base de cereais, como os pães. Acredita-se que a evolução destas práticas agropecuárias também está relacionada à produção de vinhos e cervejas devido à vontade dos povos em plantar os insumos utilizados na fabricação destas bebidas (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Os primeiros povos começaram a se estabilizar nas margens de rios, como Tigre, Eufrates, Nilo e Ganges. Estes locais foram o berço das primeiras grandes civilizações, assim como da agricultura e do comércio. Não por acaso, estudos arqueológicos encontraram evidências de que a produção de bebidas fermentadas ocorria desde o período Neolítico encontrando-se, também, vestígios nos Impérios da Mesopotâmia e do Egito, além de registros nos povos da Idade Média (SICARD & LEGRAS, 2011; MORADO, 2009).

Produzida a partir de cereais maltados, lúpulo, água e levedura, acredita-se que a cerveja se originou juntamente às outras bebidas fermentadas produzidas na Antiguidade, possuindo registros arqueológicos em povos da Suméria, da Babilônia e do Egito, sendo também produzida por gregos e romanos durante o apogeu dessas civilizações (VENTURINI, 2000). Durante a Idade Média, a bebida era produzida principalmente em mosteiros onde era comum a adição de ervas e especiarias, como o gengibre, a canela, o cravo-da-índia, o louro, a sálvia e o lúpulo (HORNSEY, 2003) – este introduzido por último, tornou-se popular pelo característico amargor conferido à bebida e também por suas propriedades antimicrobianas, fazendo com que a cerveja durasse mais (MORANO, 2009). Ainda, foi nesta mesma época que o mosteiro de Weihenstephan, localizado na região da Baviera, Alemanha, obteve a primeira licença para produção comercial de cerveja, tornando-se a cerveja mais antiga em atividade no

mundo (MORADO, 2009). Em 1516, com a chamada Lei da Pureza (*Reinheitsgebot*), o duque Guilherme IV, também da Baviera, estabeleceu que a bebida somente seria produzida com o uso do malte de cevada, lúpulo e água, deixando de fora desta lista as leveduras por sua existência ainda ser desconhecida. Em 1993, essa lei se transformou na Lei Provisória da Cerveja Alemã (*Vorläufiges Deutsches Biergesetz*) a qual proíbe o uso de cevada não-maltada e permite o uso de trigo e açúcar de cana. Esta lei é mantida até hoje na Alemanha (VENTURINI *et al.*, 2008; MORADO, 2009).

Os modos de produção e distribuição de cerveja sofreram mudanças decisivas com a Revolução Industrial, contribuindo para o surgimento de grandes fábricas na Inglaterra, na Alemanha, no Império Austro-Húngaro e nos EUA (VENTURINI, 2000). O descobrimento das máquinas a vapor revolucionou a indústria cervejeira. Sistemas de lavagem e resfriamento dos equipamentos, antes difíceis de executar por utilizar mão de obra braçal, foram automatizados; a produção era limitada às épocas mais frias do ano e praticamente imprópria em países tropicais. Em 1859, Carl Von Linde desenvolveu o sistema de refrigeração artificial baseado na compressão do amoníaco. O controle da temperatura permitiu a estabilidade das características organolépticas da bebida, a produção durante todo ano e sua expansão pelo mercado nos países tropicais (DAMASCENO, 2013; HOUGH, 1990). Todos estes aspectos contribuíram para a produção da bebida em larga escala, o surgimento das primeiras grandes empresas cervejeiras e a popularização da bebida em todo mundo.

1.2 A cerveja no Brasil

Considerando a história mundial da cerveja, o Brasil tomou conhecimento da bebida muito tempo depois. As primeiras cervejas chegaram ao nosso país somente no século XVII com a colonização holandesa de Maurício de Nassau, no Recife, pela Companhia das Índias Ocidentais (SANTOS, 2004). Por ser um hábito mais restrito destes povos, a expulsão dos holandeses acabou levando consigo a bebida, que deixou oficialmente o país por cerca de um século e meio. O pouco de cervejas encontradas no Brasil durante este período era fruto do contrabando.

Acredita-se que o hábito de beber cerveja tenha sido trazido com a chegada da família real ao Brasil e a abertura dos portos às nações amigas de Portugal, em 1808 (VENTURINI, 2000). A cerveja consumida era importada da Europa, trazida em barris principalmente pelos comerciantes ingleses. A forte influência comercial que a

Inglaterra exercia sobre Portugal naquela época fazia com que as cervejas inglesas dominassem o mercado brasileiro. Porém, no final do século XIX, o governo nacional aumentou os impostos de importação, tornando inviável a comercialização do produto estrangeiro no país. Uma vez instalada a cultura cervejeira no Brasil, a alta taxa de produtos estrangeiros acaba privilegiando o mercado das primeiras cervejas artesanais, hábito trazido pelos imigrantes alemães os quais inicialmente produziam para consumo próprio (SANTOS, 2004). Então, em 1888 é fundada na cidade do Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia”. Em 1889, a Antártica, que antes era um abatedouro de suínos e possuía uma fábrica de gelos ociosa, inicia-se no ramo das cervejas através do empresário alemão Louis Bücher. Em 1891, a Antártica oficializa-se como “Companhia Antártica Paulista”, sociedade anônima fundada em São Paulo (VENTURINI, 2000). Por anos estas duas grandes empresas competiram no mercado nacional até que, em 1999, a fusão de ambas deu origem à Companhia de Bebidas das Américas (AmBev).

O mercado brasileiro de cervejas comerciais tem característica de oligopólio. Em contrapartida, no início dos anos 2000, começaram a proliferar-se em várias regiões do Brasil microcervejarias com serviço de bar, restaurante e pista de dança (VENTURINI, 2000), sendo a DadoBier a primeira microcervejaria do país - fundada nestes moldes, no ano de 1995, em Porto Alegre.

Anualmente, quase 160 bilhões de litros de cerveja são produzidos ao redor do mundo e o Brasil é um dos cinco maiores produtores. Até o ano de 2011, o Brasil ocupava a 3ª posição mundial em produção de cerveja, com 12,4 bilhões de litros ao ano. Acompanhado neste ranking por China (45 bilhões de litros), Estados Unidos (35 bilhões de litros), Rússia (11,6 bilhões de litros) e Alemanha (10,8 bilhões de litros), o mercado brasileiro encontra-se em grande expansão (CERVESIA, 2011). Atualmente, o setor cervejeiro nacional produz 14,1 bilhões de litros por ano e representa 1,6% do PIB nacional (CERVBRASIL, 2016), mostrando considerável importância econômica.

1.3 Escolas e tipos de cervejas

Diferentemente dos vinhos, nos quais a uva é o principal fator determinante do seu tipo, as cervejas possuem diversas classificações que podem variar de acordo com fatores muito distintos, como a densidade, a cor, o teor alcoólico, a levedura utilizada, o tipo de fermentação e a proporção de malte de cevada (BJCP *et al.*, 2015). De forma

geral, podemos classificar as cervejas quanto ao seu estilo ou quanto ao fermento (levedura) utilizado.

Quanto ao fermento utilizado, as cervejas são classificadas em três grandes famílias conhecidas como *ales*, *lagers* e *lambics*. *Ales* são cervejas de alta fermentação, produzidas entre 15 °C e 25 °C pela espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizando-se por possuírem propriedades organolépticas mais complexas devido à maior concentração de ésteres e álcoois superiores (SAERENS *et al.*, 2010; AMORIM *et al.*, 2013; BERLOWSKA *et al.*, 2015); *lagers* são cervejas de baixa fermentação, produzidas entre 6 °C e 14 °C pela *Saccharomyces pastorianus*, levedura com maior capacidade de floculação, dando a cerveja uma característica menos turva (LIBKIND *et al.*, 2011; BING *et al.*, 2014; HUUSKONEN *et al.*, 2010; BERLOWSKA *et al.*, 2015). As *lambics* são oriundas de fermentações espontâneas com leveduras selvagens geralmente do gênero *Dekkera* (*Brettanomyces*), além de algumas bactérias lácticas e acéticas do meio ambiente (BJCP *et al.*, 2015).

Os estilos de cervejas dividem-se de acordo com as quatro principais escolas cervejeiras do mundo: alemã, belga, inglesa e americana (BJCP *et al.*, 2015). Sob forte influência da Lei da Pureza de 1516, a escola alemã é a mais tradicional, sendo ela o berço das cervejas *lagers* (“estoque”, em alemão). Como só era possível a fabricação de cervejas nos períodos de inverno, os cervejeiros alemães armazenavam grandes blocos de gelo, formados nos lagos e rios, em cavernas onde as cervejas eram guardadas. Devido a este processo, os alemães acabaram selecionando leveduras mais resistentes ao frio, ou de baixa fermentação, produzindo cervejas mais límpidas e com menos sabores indesejados. Estilos como Munich Helles, Bock, Kellerbier, Dunkel e Vienna marcam as *lagers* produzidas nas regiões da Alemanha, Áustria e República Checa.

A escola belga, diferentemente da escola alemã, é marcada pela ousadia e criatividade, principalmente por não ser influenciada pela Lei da Pureza, podendo ter adições de frutas, mel e sementes ou simplesmente fermentadas espontaneamente por microrganismos presentes na atmosfera (*lambics*). Nos mosteiros belgas, foram formulados os estilos mais tradicionais desta escola, como as Trappistas, Blondes e Dubbels, todas cervejas de alta fermentação (*ales*) e bastante condimentadas.

Já a escola inglesa é marcada por um estilo de cerveja diretamente relacionado aos hábitos culturais ingleses. Pelo grande apreço pela bebida e o hábito de frequentar

pubs, as cervejas inglesas costumam ser de teor alcoólico mais baixo, fáceis de beber e servidas em *pints*. Bastante diferente das escolas alemã e belga, a escola inglesa destaca-se por suas *ales* mais escuras, com caráter mais maltado e uma carbonatação mais amena. Cervejas dos estilos IPA, Porter e Stout marcam esta escola.

Das grandes escolas cervejeiras, a americana é a mais jovem e caracterizada pela reinvenção de estilos. A fabricação de cervejas nos Estados Unidos era realizada principalmente pelos imigrantes europeus. Com a promulgação da Lei Seca nos anos 1920, houve a proibição da produção e comercialização de bebidas alcoólicas no país e mais de mil microcervejarias sofreram com esta lei. Somente as empresas cervejeiras que comercializavam outros produtos, como extrato de malte, conseguiram sobreviver (MORADO, 2009). Na segunda metade da década de 40, após o fim da Lei Seca (1933) e o encerramento da Segunda Guerra Mundial (1945), o mercado cervejeiro tornou a reagir. Entretanto, a necessidade de reerguer uma economia gasta pelas guerras fez com que as cervejarias passassem a utilizar grãos mais baratos que a cevada, como o arroz e o milho, criando estilos hoje conhecidos como *American Standard Lager* e *American Light Lager* (MORADO, 2009). Somente nos anos 60, grupos cervejeiros caseiros começaram a se espalhar pelo país, movimento conhecido como *craft brewing*, febre que se espalha cada vez mais pelo planeta até hoje. Atualmente, existem mais de 1.300 microcervejarias em operação nos EUA e sua escola é conhecida pelo desenvolvimento do estilo APA, nos anos 80.

O Brasil não possui uma escola própria, mas observa-se que a cultura cervejeira no país tem crescido cada vez mais e, juntamente, a vontade em desenvolver uma identidade nacional. Muitos cervejeiros já utilizam ingredientes nacionais em suas receitas, como derivados de cana. Recentemente, obteve-se a primeira variedade de lúpulo cultivada no Brasil, na Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais. Cervejarias como Tupiniquim e Colorado já apostam nesta identidade nacional em seus rótulos, além de alguns grupos de pesquisa pelo país que buscam o potencial de leveduras nacionais para a fermentação de cervejas.

1.4 As leveduras

As primeiras leveduras encontradas estavam associadas ao processo de fermentação dos pães. Assim, batizou-se este grupo de microrganismos de leveduras em alusão a palavra latina “*levare*”, a qual significa “fazer crescer”, referindo-se ao

aumento da massa de pão. Em 1680, Anton van Leeuwenhoek foi o primeiro cientista a observar em microscópio a estrutura celular das leveduras, porém sem saber que se tratava de um ser vivo. No século seguinte, em 1789, Antoine-Laurent Lavoisier descreve a natureza química da fermentação: o açúcar presente no mosto é convertido em álcool e gás carbônico. Porém, acreditava-se que a reação ocorria espontaneamente, promovida pelo contato com o ar, sendo as leveduras um mero subproduto deste processo (SCHLENK, 1985). Somente em 1860, os estudos bioquímicos de fermentação realizados pelo francês Louis Pasteur demonstraram que o processo não ocorria magicamente, como se acreditava, mas era realizado por seres vivos: as leveduras. O processo foi comprovado pelo experimento conhecido como “swan neck”, ou pescoço de cisne, no qual Pasteur preencheu um frasco estéril com meio de cultura e o aqueceu. Somente os frascos em que o “pescoço” era quebrado, permitindo a entrada de ar, havia proliferação de microrganismos. Os trabalhos de Pasteur evidenciaram a existência de microrganismos presentes no ar, em sólidos e fluidos, sendo estes os responsáveis tanto pela fermentação alcoólica, ocorrida durante a produção das bebidas, quanto pela “doença” (azedume) dos vinhos e cervejas (fermentação láctica): assim, contrapondo a teoria da geração espontânea. A solução para a deterioração destas bebidas por ele encontrada consistia no aquecimento da bebida a temperatura suficiente para matar a maioria destes microrganismos indesejáveis, fenômeno hoje chamado de “pasteurização”, em sua homenagem. Estas descobertas e teorias possibilitaram aos cervejeiros ter maior controle do processo produtivo, aprimorando a indústria de bebidas e iniciando o processo de domesticação das leveduras (WHITE & ZAINASHEFF, 2010; TORTORA *et. al.*, 2012).

Hoje, sabe-se que leveduras são eucariotos pertencentes ao reino Fungi e constituem o grupo de microrganismos mais utilizados em processos industriais, sendo o gênero *Saccharomyces* o de maior destaque. Tradicionalmente utilizada na indústria de alimentos, a espécie *S. cerevisiae* é um organismo modelo também em diversos estudos devido à sua estrutura celular simples e com aspectos genéticos conhecidos (SHERMAN, 2002). A célula de uma levedura é composta de diferentes componentes (Figura 1), sendo eles: a parede celular, composta de glicanos, mananos, proteínas e lipídeos; a membrana plasmática, composta por glicoproteínas, lipídeos e ergosterol; o citoplasma, porção fluida onde encontram-se as organelas e substâncias como enzimas e

carboidratos de reserva (glicogênio e trealose); e, por fim, o núcleo armazenando o DNA da célula (VIEIRA & FERNANDES, 2012).

As leveduras possuem cerca de 6.000 genes, sendo os primeiros organismos eucarióticos a ter seu genoma sequenciado, em 1996 (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Em condições onde há boa disponibilidade de nutrientes, como é o caso do mosto cervejeiro, as leveduras reproduzem-se por um processo assexuado chamado de brotamento ou gemulação. Na superfície celular, forma-se uma pequena protuberância a qual se transforma em uma célula-filha. As células-filhas formadas são clones, mantendo a estabilidade gênica da população na maioria das vezes – característica fundamental nos processos fermentativos de alimentos. Este processo deixa uma cicatriz de quitina na superfície da célula, sendo usado como uma forma de detectar a idade e, por consequência, a viabilidade aproximada da levedura (VIEIRA & FERNANDES, 2012; CARVALHO *et al* 2006). O número de brotos que uma linhagem de leveduras gera é bastante variável. Enquanto as leveduras cervejeiras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de brotar aproximadamente 30 vezes, leveduras *Saccharomyces pastorianus* não brotam mais de 20 vezes (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Em condições adversas, a levedura pode reproduzir-se também sexualmente por esporos, aumentando a variabilidade genética da população.

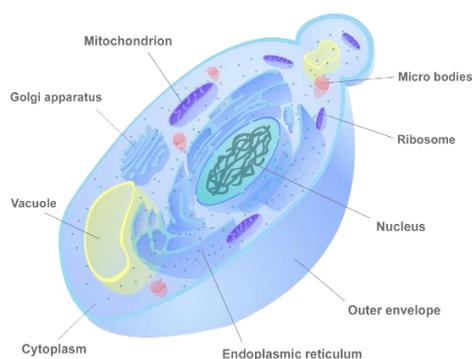


Figura 1. Estrutura celular de uma levedura (BIOCOURSEAWARE, 2012).

As leveduras estão entre os principais agentes na fabricação de bebidas alcoólicas, como cervejas, vinhos, cachaças e sakês (STEENSELS; SNOEK *et al.*, 2014); atualmente, se tem lançado mão de suas propriedades na produção de bioetanol, insulina humana e vacinas contra o vírus da hepatite e o papiloma vírus (HOU *et al.*,

2012). Devido a esta gama de aplicações biotecnológicas das leveduras, há sempre o interesse em buscar o aprimoramento dos processos, como o aumento da produtividade, a síntese de compostos novos e a utilização de recursos alternativos como substrato, de forma a ter um bom custo-benefício entre o rendimento do produto e os custos da sua produção. Entretanto, na maior parte dos processos industriais não são usadas as linhagens mais adequadas a determinados processos ou que possuam melhor desempenho. Isso ocorre por seu uso se dar mais por razões históricas, sem que as linhagens tenham passado por uma cuidadosa seleção para fins específicos (STEENSELS; SNOEK *et al.*, 2014).

Estudos recentes de metagenômica mostraram que a biodiversidade natural dos fungos é vasta e altamente inexplorada, sendo as linhagens industriais representadas por uma pequena fração desta variedade (LITI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). Na produção de cervejas, as principais espécies utilizadas são a *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus*, a qual se acredita ter evoluído a partir de uma hibridização entre a *S. cerevisiae* e a *S. eubayanus* (LIBKIND *et al.*, 2011; BING *et al.*, 2014). Análises de leveduras selvagens e industriais revelaram que a diversidade genética das linhagens utilizadas pela indústria é limitada quando comparada à biodiversidade natural (WANG *et al.*, 2012) devido ao seu uso para fins específicos. Assim, é de grande interesse industrial explorar a diversidade das linhagens selvagens, buscando selecionar e desenvolver novas linhagens industriais que confirmem propriedades organolépticas diferenciadas às cervejas, proporcionando uma maior variedade de sabores e aromas e conquistando um público cada vez mais exigente com um produto de maior valor agregado.

1.5 Bioquímica da cerveja

A produção de cerveja é dividida nas seguintes etapas: maltagem, brassagem, fermentação, maturação, filtração e pasteurização. A maltagem corresponde ao processo de produção do malte. Neste processo a cevada é colocada em tanques com água para ativar a germinação dos grãos. Após aproximadamente 40 h, os grãos são retirados do tanque e permanecem cerca de cinco dias espalhados na sala de germinação. A cevada, então, é seca e o grão germinado passa a se chamar malte. O principal objetivo desta etapa é ativar enzimas presentes no grão de cevada, como α - e β -amilases, celulases, e α -glicosidases. Estas irão catalisar a degradação de polissacarídeos, como a amilose, a

amilopectina e a celulose em açúcares fermentáveis (MORADO, 2009). O amido é a reserva energética presente no endosperma dos grãos e, para que seja liberado, o malte precisa ser aquecido e moído em água. Após a mostura, o mosto líquido é separado, fervido com lúpulo, clarificado, depois resfriado e aerado – processo conhecido como brassagem. Durante a mostura, ocorre a ação das enzimas hidrolíticas, formando carboidratos como maltose, sacarose, glicose, maltotriose e outros glicídios simples, nutrientes necessários para o crescimento das leveduras. A adição do lúpulo é fundamental para conferir o amargor característico e os aromas da cerveja (MORADO, 2009). O lúpulo também possui ácidos com propriedades antimicrobianas, impedindo a ação principalmente de bactérias gram-positivas (HAZELWOOD *et al.*, 2010). A oxigenação do mosto é importante para a formação de esteróis e ácidos graxos, essenciais para a síntese da membrana plasmática e para a reprodução das leveduras.

Uma vez adicionadas as leveduras, o processo fermentativo inicia e pode ser dividido em três fases: adaptativa (lag), exponencial (log) e estacionária (HELD, 2010), formando uma curva de crescimento similar a ilustrada na figura 2.

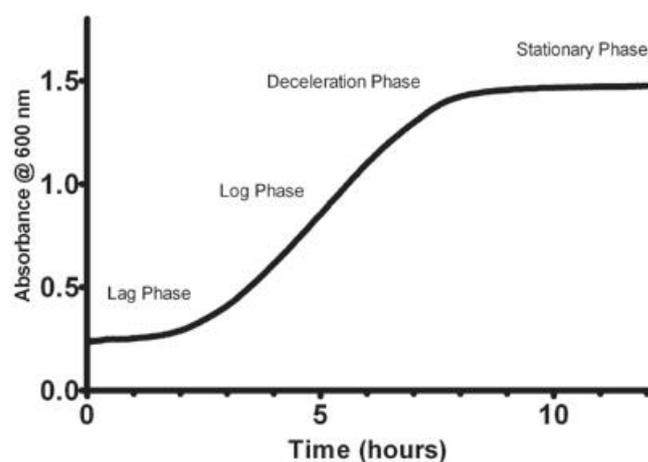


Figura 2. Curva de crescimento de uma levedura. Absorbância da suspensão celular medida em espectrofotômetro a 600 nm durante diferentes fases do crescimento (HELD, 2010).

Durante a fase lag, a levedura irá adaptar-se ao meio e iniciar seu ciclo de divisão celular. Ela utilizará suas reservas de glicogênio como fonte de energia, bem como o oxigênio presente no mosto, para promover a formação do ergosterol, componente essencial da membrana celular, e se multiplicar (PUT, 2012). Na fase

exponencial, os açúcares presentes no mosto são utilizados na via fermentativa, sendo convertidos em etanol e gás carbônico.

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico no qual o piruvato é utilizado para produção de energia em situações de anaerobiose (ausência de oxigênio). Na presença de oxigênio, normalmente prevalece o ciclo respiratório. Entretanto, em ambientes em que há altas concentrações de açúcares, como o mosto cervejeiro, ocorre a fermentação, mesmo na presença de oxigênio – fenômeno chamado de Efeito Crabtree (PRONK *et al.*, 1996). Este processo é uma forma da própria levedura proteger-se contra uma situação de alto estresse metabólico que seria gerado caso todo açúcar fosse metabolizado pela via glicolítica. A via fermentativa regenera a coenzima NAD^+ . Para isso, a enzima piruvato descarboxilase promove a descarboxilação do piruvato, formando acetaldeído e liberando CO_2 . Então, o acetaldeído é reduzido pela enzima álcool desidrogenase, gerando etanol e regenerando NAD^+ . Dessa forma, leveduras como a *S. cerevisiae* são capazes de produzir dois moles de etanol, dois moles de gás carbônico e 2 ATP para cada molécula de glicose (Figura 3) (NELSON & COX, 2012).

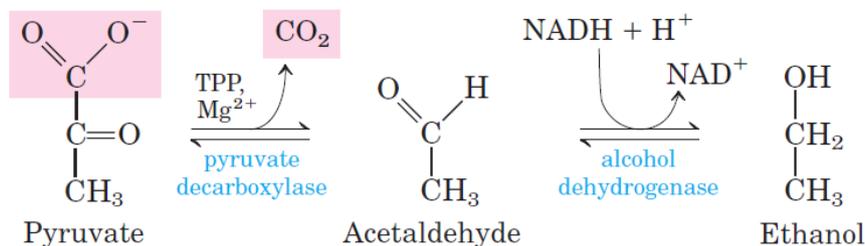


Figura 3. Fermentação alcoólica: formação de etanol e gás carbônico a partir do piruvato gerado na glicólise (NELSON & COX, 2012).

As leveduras utilizam mais facilmente alguns açúcares do que outros. Por isso, possuem preferência pelos açúcares mais simples, com a fermentação destes ocorrendo na seguinte ordem: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose (PALMER, 2006). A capacidade em fermentar estes açúcares é variável entre as diferentes linhagens celulares de leveduras. Esta característica específica de cada levedura juntamente a outros fatores, como a quantidade e a qualidade dos nutrientes disponíveis no mosto, a temperatura e o pH do processo determinarão a taxa de fermentação dos

microrganismos, refletindo no teor alcoólico e nos compostos formados, os quais darão diferentes sabores e aromas à cerveja (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Além do etanol e gás carbônico, compostos como ésteres e álcoois superiores são subprodutos formados no catabolismo de aminoácidos e anabolismo dos carboidratos realizados pelas leveduras a fim de produzir aminoácidos, proteínas e outras moléculas nitrogenadas (COPPOLA, 1982). Os ésteres são compostos voláteis formados por um ácido orgânico e um álcool e desempenham papel fundamental nas características das cervejas, principalmente as *ales*, sendo responsáveis pelos aromas e sabores frutados. Alguns exemplos de ésteres comuns são o acetato de etila (solvente), hexanoato ou caproato de etila (maçã) e o acetato de isoamila (banana). Alguns álcoois superiores, como n-propanol, álcool isoamílico e isobutanol possuem sabor similar ao do etanol, porém podem conferir sabores indesejados, como o de solvente, dependendo do tipo de cerveja produzida e das concentrações nas quais eles se encontram. Outros subprodutos que podem gerar *off-flavors* nas cervejas são o diacetil, composto orgânico pertencente ao grupamento cetona que, em altas concentrações, confere às cervejas sabor e aroma amanteigado; os ácidos orgânicos, como o acético (sabor e aroma de vinagre), láctico e butírico; compostos fenólicos e o gás sulfídrico – sendo este último produto do metabolismo de compostos inorgânicos ou de aminoácidos com átomos de enxofre em sua estrutura, fornecendo um aroma de ovos podres à cerveja (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Durante a fase estacionária, o crescimento da população cessa, a atividade fermentativa diminui e as leveduras reabsorvem grande parte dos compostos de aroma indesejáveis, “amadurecendo” e equilibrando o aroma da cerveja (PALMER, 2006).

1.6 *Citrus reticulata*

A bergamota ou tangerina (*Citrus reticulata*) é uma fruta oriunda da Ásia que chegou ao Brasil trazida pelos portugueses e imigrantes açorianos (WEILER *et al.*, 2006). Bem adaptada ao clima do Rio Grande do Sul, a bergamota é uma fruta simples e fácil de manipular-se em laboratório, possui baixo custo e uma grande popularidade neste estado, possuindo o maior consumo *per capita* (HORTIBRASIL, 2014).

Vegetais, cereais e frutas, incluindo a bergamota, são fontes de leveduras selvagens de algumas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*,

Debaryomyces, Hansenula, Issatchenkia, Kluyveromyces, Metschnikowia, Rhodotorula, Hanseniaspora, Pichia, Kloeckera, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Torulospora e *Zygosaccharomyces*, apresentando grande potencial para o isolamento de novas linhagens de leveduras para a indústria de bebidas alcoólicas (LEE *et al.*, 2011; STEENSELS & VERSTREPEN *et al.*, 2014). Com o advento do crescimento das cervejas “artesanais ou especiais”, cresce também a busca pela qualidade de produção, juntamente com a identidade cultural que a cerveja traz à sua região.

1.7 Justificativa

Ao longo dos séculos, as leveduras foram sendo selecionadas pelos cervejeiros até atingirem as características desejadas à produção de cerveja – capacidade de fermentar carboidratos complexos, como a maltose e a maltotriose; baixa produção de H₂S; resistência ao etanol, a baixo pH, ao estresse osmótico e a capacidade em atingir o nível de flocculação desejado.

Boa parte dos insumos para a fermentação de cervejas é importado, incluindo as linhagens de leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* e, mais raramente, ao gênero *Brettanomyces*. Dessa forma, a utilização de leveduras brasileiras com potencial para a produção de cerveja poderia ser uma alternativa ao uso de fermento importado, abrindo espaço para o desenvolvimento de produtos nacionais para esta finalidade, até então pouco explorada e de interesse para a indústria cervejeira brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar e identificar leveduras selvagens a partir de *Citrus reticulata* (tangerina) com características desejáveis para utilização na fermentação de cervejas.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Isolar leveduras obtidas da polpa e da casca de *C. reticulata*;
- b) Selecionar leveduras com fenótipos desejáveis para produção de cervejas mediante testes de exclusão;
- c) Caracterizar fenotípica e bioquimicamente as cepas selecionadas;
- d) Identificar, usando ferramentas de biologia molecular, os isolados de leveduras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras e isolamento

As amostras foram coletadas de árvores locais durante a época de safra, entre abril e maio de 2016, nas cidades de Guaíba e Barra do Ribeiro, em embalagem estéril, armazenadas em gelo e transportadas para o laboratório de micologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, onde foram realizadas as análises. A polpa e/ou a casca de 13 tangerinas foram maceradas separadamente para extração do suco da fruta e inoculadas em meio líquido contendo 10% de DME e 0,03 mg/L de Zn como $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, com densidade ajustada para 9 °P (BLIECK, 2007). Os tubos falcon foram incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm. Como durante a fermentação os açúcares são consumidos e convertidos em etanol e CO_2 , é possível monitorar o avanço da fermentação pela queda de peso devido ao desprendimento deste gás. Assim, os tubos foram pesados diariamente até a estabilização do peso, indicando o final da fermentação.

Após a fermentação, diluições decimais foram realizadas com água destilada estéril e inoculadas em placas de petri (2% de ágar (p/v), 10% de DME (p/v) 0,03 mg/L de $ZnSO_4$ e 0,1% de cloranfenicol (p/v)), incubadas a 28 °C por três dias. As colônias isoladas com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram semeadas por esgotamento em meio YPD (2% de peptona (p/v), 1% de extrato de levedura (p/v) e 2% de dextrose (p/v)) e incubadas a 28 °C durante três dias. Todas as cepas foram conservadas em criovial com 70% de meio YPD 2% e 30% de glicerol estéril, a -20 °C (OLIVEIRA, 2008; WHITE, 2010).

3.2 Seleção das leveduras por testes de exclusão

3.2.1 Avaliação da fermentação de fontes de carbono

O mosto cervejeiro é composto de diversos açúcares fermentáveis, como glicose, sacarose, frutose, maltose e maltotriose. Estes sacarídeos são resultantes da degradação enzimática dos polissacarídeos presentes no malte. A eficiência no processo de produção de cervejas está diretamente relacionada à capacidade das leveduras em fermentar estes açúcares, principalmente a maltose a qual encontra-se presente em cerca

de 50 a 60% do mosto (STAMBUK *et al.*, 2006). Com o intuito de utilizar as linhagens isoladas na fermentação de cervejas, este estudo analisou a capacidade dos isolados em metabolizar os seguintes açúcares: glicose, sacarose e maltose.

Os isolados e os controles US-05 e Heffeweizen foram cultivados por 48 h para que as células estivessem metabolicamente ativas. Então, as leveduras foram inoculadas com auxílio de uma alça microbiológica estéril em tubo de ensaio contendo 6 ml de MBF (0,75% (p/v) de peptona e 0,45% (p/v) de extrato de levedura) e tubo de Durham invertido. Este meio foi utilizado para avaliação da fermentação dos principais açúcares presentes no mosto cervejeiro, com adição da fonte de carbono a ser analisada: glicose 2% (p/v), sacarose 2% (p/v) ou maltose 2% (p/v). Os tubos foram incubados por 21 dias a 28 °C. As leituras foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21. Foram consideradas leituras negativas quando não houve acúmulo de CO₂ no tubo de Durham, +1 quando somente 1/3 do tubo de Durham estava preenchido pelo gás, +2 quando o gás preencheu 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham estava completamente cheio de gás (Figura 4). Ao final do ensaio, foram consideradas fermentadoras todas as linhagens que obtiveram leituras +2 e +3 no tubo de Durham e não-fermentadoras aquelas que obtiveram leituras 0 e +1. As leveduras comerciais US-05 e Heffeweizen foram utilizadas como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (YARROW *et al.*, 1998; BARNETT *et al.*, 2000).

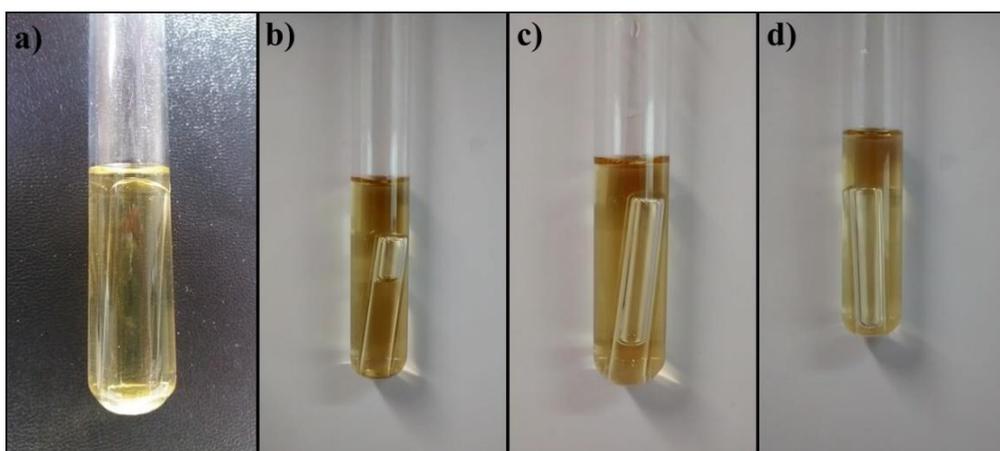


Figura 4. Imagem representativa da escala de leitura no tubo de Durham utilizada como critério de análise da fermentação dos carboidratos glicose, sacarose e maltose. a) resultado negativo ou zero; b) resultado +1 (1/3 de preenchimento); c) resultado +2 (2/3 de preenchimento); d) +3 (tubo totalmente preenchido por CO₂).

3.2.2 Análise da produção de H₂S

A produção de gás sulfídrico (H₂S) foi analisada pela inoculação das linhagens em meio Ágar LA (0,3% (p/v) de peptona, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 4% (p/v) de glicose, 0,02% (p/v) de sulfato de amônio, 0,1% (p/v) de acetato de chumbo, 2% (p/v) de ágar), seguido pela incubação por dez dias a 28 °C. Todas as amostras foram semeadas em triplicata e o ensaio realizado três vezes (ONO *et al.*, 1991).

O crescimento de colônias de coloração preta demonstra alta produção de ácido sulfídrico, gás indesejado na produção de cerveja, pois confere odor semelhante ao ovo (OLIVEIRA *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2010). Foi utilizada a seguinte escala de análise da produção de H₂S: linhagens com colônias brancas ou cremes foram consideradas não produtoras de gás; colônias beges representaram baixa produção; marrom para produção média e preto para produção elevada deste gás (ONO *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2008). A levedura *Candida albicans* ATCC 28367 foi utilizada como controle positivo por tratar-se de uma espécie altamente produtora de H₂S (NICKERSON, 1953). Foram utilizadas também duas leveduras *ales* comerciais bem conhecidas dos cervejeiros: US-05 e Heffeweizen.

3.2.3 Tolerância ao estresse osmótico e ao etanol

A gravidade original (OG) indica a concentração de açúcares do mosto presentes no início da fermentação, podendo ser representada em graus Plato (°P), sendo 1 °P equivalente a 1% do peso em açúcar no mosto (SAERENS *et al.*, 2008). É considerado um mosto com densidade normal entre 11 e 12 °P, enquanto o mosto com densidade entre 14 e 17 °P é considerado de alta densidade e entre 18 e 25 °P de muito alta densidade (HUUSKONEN *et al.*, 2010). Já o teor alcoólico das cervejas varia de acordo com o estilo ou a escola, podendo apresentar concentrações entre 2,5% e 10%, embora ainda existam algumas cervejas que apresentem cerca de 14% ou mais de etanol (MORADO, 2009).

A tolerância ao estresse osmótico do mosto cervejeiro e ao etanol foi analisada pela inoculação das linhagens isoladas em DME com densidades de 12, 16 e 20 °P e com adição de etanol nas concentrações de 5% (v/v) e 10% (v/v), conforme a tabela 1. As amostras foram inoculadas em placa de petri, a 28 °C, por 72 h, nas condições de análise descritas; a inoculação foi realizada utilizando-se a técnica de *replica-plate*. Os

isolados também foram inoculados com o mesmo método em YPD 2% como controle. Os ensaios foram realizados três vezes, em triplicata, e foram selecionadas as leveduras capazes de crescer em, pelo menos, 12 °P e 5% (v/v) de etanol.

Tabela 1. Teste de tolerância ao estresse osmótico e ao etanol. As leveduras isoladas foram submetidas a seis ensaios, combinando duas diferentes concentrações de etanol e três diferentes concentrações de açúcares do mosto.

Ensaio	Etanol % (v/v)	Densidade (°P)
1	5	12
2	5	16
3	5	20
4	10	12
5	10	16
6	10	20

3.2.4 Análise da porcentagem de floculação

Para determinar a capacidade de floculação dos isolados, o ensaio foi realizado, em triplicata, utilizando o teste de Helm's modificado (D'HAUTCOURT & SMART, 1999), com temperatura de crescimento a 28 °C. Leveduras que obtiveram uma porcentagem de floculação de até 50% foram consideradas como de baixa floculação. Entre 50 e 80%, média floculação e, acima de 80%, alta floculação (Tabela 7). As amostras controle foram tratadas com o agente quelante EDTA, o qual possui alta afinidade pelos íons cálcio, prejudicando a floculação das leveduras cujo processo depende deste metal.

Cada isolado foi inoculado em tubos contendo 10 mL de meio YPD 2% e incubados em estufa a 28 °C, por 72 h. Após o período de crescimento, as células na concentração de 10^8 células/mL (DO_{600nm} 0,35 – 0,4) foram lavadas com água destilada ou 0,5 M de EDTA (pH 7,0) e ressuspensas em tampão de lavagem (0,5g/L de sulfato

de cálcio). As leveduras foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em tampão contendo 0,5 g/L de sulfato de cálcio, 6,8 g/L de acetato de sódio, 4,5 g/L de ácido acético glacial e 4% de etanol, com o pH ajustado para 4,5. Foram utilizadas células ressuspensas em 0,5 M de EDTA (pH 7,0) como controle negativo. Após homogeneização, as células permaneceram sem agitação por 15 minutos. Em seguida, foram coletados 100 µL de sobrenadante de cada amostra e diluído em 900 µL de água destilada. A leitura foi realizada em D.O._{600nm}. A porcentagem de floculação foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ floculação} = \frac{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{ Controle} - \text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{ Experimental} \times 100}{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{ Controle}}$$

3.3 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados

3.3.1 Testes morfológicos

As leveduras foram caracterizadas de acordo com suas características coloniais. A caracterização colonial foi realizada pelos seguintes parâmetros: cor, forma, margem, elevação e superfície. Para a análise, os isolados foram cultivados sem estresse por 48 h a 28 °C em Ágar YPD 2%. As colônias foram analisadas em lupa.

3.3.2 Crescimento em diferentes temperaturas

Os isolados foram inoculados em meio YPD 2% e incubados em diferentes temperaturas durante três dias. As temperaturas testadas foram 10 °C, 20 °C, 25 °C e 37 °C.

3.4 Identificação molecular

3.4.1 Extração de DNA genômico

Os isolados foram cultivados em ágar YPD 2% por 48 h. Uma colônia foi selecionada e suspensa em 400 µL de tampão de lise (0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 2% de SDS - pH 8,0). A amostra foi incubada em banho-maria a 65 °C por 60 minutos e, após, foram adicionados 200 µL de acetato de potássio a 5 M

e pH 4,8. Os tubos foram homogeneizados durante 30 segundos e incubados em gelo por mais 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos duas vezes, transferindo o sobrenadante para um novo tubo. Foi adicionado 1,0 mL de isopropanol a -20 °C e os tubos foram agitados por inversão durante 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% ao *pellet* a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em 50 µL de TRIS-EDTA a pH 7,4. 2,5 µL de RNase foram adicionados e os tubos incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A verificação da extração foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.4.2 Amplificação do DNA Genômico

As reações de amplificação foram realizadas por PCR, com volume final de 25 µL, contendo 13,9 µL de água mili-Q, 2,5 µL de tampão, 0,3 µL de dNTPs, 0,8 µL de *primer* senso, 0,8 µL de *primer* anti-senso, 1,5 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 5 µL do DNA diluído. Foi amplificado o domínio D1/D2 da subunidade grande do gene ribossomal 26S. Os *primers* utilizados foram: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'DONNELL, 1993; KURTZMANN & ROBNETT, 1995). As condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, hibridização a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A eficácia da amplificação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT® de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante.

3.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (250 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada *primer* específico (tabela 1) e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP *Cycler*

com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection 3* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"*; *BioLIMS Project "3500_Project1"*; *Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz"*. As sequências foram comparadas com as de linhagens depositadas no GenBank usando o algoritmo "*Basic Local Alignment Search Tool*" (BLAST). Identities iguais ou superiores a 99% permitiram identificar o isolado em nível taxonômico de espécie.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fermentação espontânea

A primeira fermentação foi realizada com a polpa de 3 tangerinas (Figura 4). As linhagens obtidas foram identificadas como: PB111, PB112 e PB113.

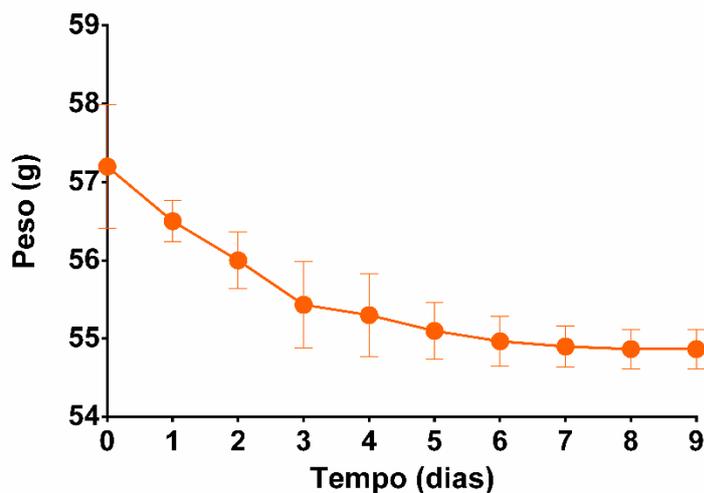


Figura 5. Fermentação espontânea do mosto cervejeiro contendo suco extraído da polpa de tangerina.

A segunda fermentação foi realizada com a casca e a polpa de 10 tangerinas, obtendo-se um total de 34 isolados. As leveduras isoladas das cascas foram identificadas como: CB312, CB331, CB341, CB342, CB351, CB352, CB361, CB362, CB371, CB381, CB382, CB391, CB392, CB393, CB394, CB3101, CB3102. As linhagens obtidas do isolamento das polpas foram: PB311, PB312, PB321, PB322, PB331, PB341, PB342, PB361, PB362, PB371, PB372, PB373, PB381, PB382, PB383, PB3101, PB3102.

4.2 Morfologia colonial

As leveduras foram classificadas segundo os critérios descritos em 3.3.1. Os resultados encontram-se na tabela 2. A morfologia colonial de PB112 não foi realizada uma vez que já se sabia que esta levedura não era capaz de fermentar maltose e, portanto, seria descartada das análises futuras.

Todas as leveduras isoladas obtiveram morfologias muito semelhantes, apresentando colônias de cor branca ou creme, com margens inteiras ou onduladas, elevação convexa ou papilada, superfície lisa ou rugosa, textura cremosa e colônias foscas. Somente dois isolados apresentaram alguma característica diferenciada: PB382 com textura farinosa e CB362 com colônias brilhosas. As morfologias encontradas foram todas similares em algum aspecto às linhagens comerciais US-05 e Heffeweizen e não foi observado algum padrão morfológico entre isolados da casca ou da polpa.

4.3 Fermentação de diferentes fontes de carbono

Todas as linhagens analisadas foram capazes de fermentar glicose. Em relação à fermentação dos outros carboidratos, diferentemente da glicose, 14 linhagens isoladas foram capazes de fermentar sacarose e foram encontrados 9 isolados com capacidade de fermentar maltose: PB111, PB113, CB341, PB341, CB352, PB381, CB382, PB383 e CB392 (Tabela 3). Alguns destes isolados não foram capazes de fermentar sacarose. Por ser um açúcar presente em apenas 1-2% do mosto, o critério principal de seleção foi a capacidade de fermentar maltose, açúcar cuja representatividade no mosto é de 50-60% (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). A capacidade destes isolados em deixar sacarose residual no meio poderia ser utilizada para a produção de cervejas mais adocicadas – característica interessante e que agrada bastante o paladar de alguns consumidores.

Tabela 2. Morfologia colonial das leveduras isoladas e dos controles US-05 e Heffeweizen.

Isolado	Morfologia															
	Cor		Margem		Elevação			Forma			Superfície		Brilho		Textura	
	Branca	Creme	Rosada	Inteira	Ondulada	Plana	Convexa	Papilada	Circular	Irregular	Lisa	Rugosa	Brilhosa	Fosca	Cremosa	Farinosa
US-05	X			X			X		X			X				X
Heffeweizen	X			X			X		X			X				X
PB342	X			X			X		X			X				X
PB382	X			X			X		X			X				X
PB113	X			X			X		X		X					X
PB111	X			X			X		X		X					X
CB394	X			X			X		X		X					X
CB342	X			X			X		X		X					X
CB331	X			X			X		X		X					X
PB312	X			X			X		X		X					X
CB352	X			X			X		X		X					X

Tabela 3. Morfologia colonial das leveduras isoladas e dos controles US-05 e Heffeweizen (continuação).

Isolado	Morfologia															
	Cor		Margem		Elevação			Forma			Superfície		Brilho		Textura	
	Branca	Creme	Rosada	Inteira	Ondulada	Plana	Convexa	Papilada	Circular	Irregular	Lisa	Rugosa	Brilhosa	Fosca	Cremosa	Farinosa
PB362	X			X			X		X		X					X
CB361	X			X			X		X		X					X
CB392	X			X			X		X		X					X
CB381	X			X			X		X		X					X
PB332	X				X			X	X		X		X		X	X
PB331	X				X			X	X		X		X		X	X
CB341	X				X			X	X		X		X		X	X
PB322	X				X			X	X		X		X		X	X
PB321	X				X			X	X		X		X		X	X
CB312	X				X			X	X		X		X		X	X
PB311	X				X			X	X		X		X		X	X

Tabela 4. Morfologia colonial das leveduras isoladas e dos controles US-05 e Heffeweizen (continuação).

Isolado	Morfologia															
	Cor		Margem		Elevação			Forma			Superfície		Brilho		Textura	
	Branca	Creme	Rosada	Inteira	Ondulada	Plana	Convexa	Papilada	Circular	Irregular	Lisa	Rugosa	Brilhosa	Fosca	Cremosa	Farinosa
CB393	X				X			X	X			X		X		X
CB392	X				X			X	X			X		X		X
PB373	X				X			X	X			X		X		X
PB372	X				X			X	X			X		X		X
PB381	X				X			X	X			X		X		X
CB351		X		X			X		X		X			X		
PB361		X		X			X		X		X			X		
CB371		X		X			X		X		X			X		
CB362		X		X			X		X		X		X			
PB341	X			X			X		X			X		X		X
PB383	X			X			X		X			X		X		X

Tabela 5. Morfologia colonial das leveduras isoladas e dos controles US-05 e Heffeweizen (continuação).

Morfologia																
Isolado	Cor			Margem		Elevação			Forma		Superfície		Brilho		Textura	
	Branca	Creme	Rosada	Inteira	Ondulada	Plana	Convexa	Papilada	Circular	Irregular	Lisa	Rugosa	Brilhosa	Fosca	Cremosa	Farinosa
CB382	X			X			X		X			X		X		X

Tabela 6. Resultado da fermentação de diferentes carboidratos pelos isolados. As leveduras comerciais US-05 e Heffeweizen foram utilizadas como controle. F- fermentadora; NF- não-fermentadora.

Isolado/Açúcar	Glicose	Sacarose	Maltose
US-05	F	F	F
Heffeweizen	F	F	F
PB111	F	F	F
PB112	F	NF	NF
PB113	F	F	F
CB312	F	NF	NF
PB311	F	F	NF
PB312	F	NF	NF
PB321	F	NF	NF
PB322	F	NF	NF
CB331	F	F	NF
PB331	F	NF	NF
CB341	F	F	F
CB342	F	NF	NF
PB341	F	F	F
PB342	F	F	NF
CB351	F	NF	NF
CB352	F	NF	F
CB361	F	F	NF
CB362	F	NF	NF
PB361	F	NF	NF
PB362	F	F	NF

Tabela 7. Resultado da fermentação de diferentes carboidratos pelos isolados. As leveduras comerciais US-05 e Heffeweizen foram utilizadas como controle. F- fermentadora; NF- não-fermentadora (continuação).

CB371	F	NF	NF
PB371	F	NF	NF
PB372	F	NF	NF
PB373	F	NF	NF
CB381	F	F	NF
PB381	F	F	F
CB382	F	NF	F
PB382	F	NF	NF
PB383	F	NF	F
CB391	F	NF	NF
CB392	F	F	F
CB393	F	NF	NF
CB394	F	NF	NF
CB3101	F	NF	NF
CB3103	F	NF	NF
PB3101	F	F	NF
PB3102	F	F	NF

Leveduras, como a *S. cerevisiae*, possuem uma ordem preferencial na utilização dos carboidratos: glicose e frutose são os primeiros substratos a serem utilizados pelas células, seguido de sacarose, maltose e, por fim, a maltotriose (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Tal ordem não se dá por acaso. Em *S. cerevisiae*, o metabolismo destes açúcares inicia-se com seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). Moléculas mais simples, como a glicose e a frutose, são transportadas por difusão facilitada, entrando diretamente na via glicolítica. Já dissacarídeos, como a

sacarose e a maltose, são hidrolisados antes de servirem de substrato energético. A hidrólise da sacarose ocorre por meio da enzima invertase a qual precisa ser secretada para fora da célula para que haja a quebra da sacarose em glicose e frutose. Em alguns casos, a sacarose pode adentrar o meio intracelular por transporte ativo onde será hidrolisada por outro tipo de invertase presente neste ambiente. A maltose, porém, é transportada ativamente para o interior celular por transportadores de membrana específicos onde, então, sofrerá ação da enzima maltase, liberando duas moléculas de glicose. Para a fermentação destes glicosídeos, as leveduras precisam expressar os genes relacionados à síntese destas enzimas, assim como os transportadores de membrana e os fatores de transcrição regulatórios destas vias (HERBERTS, 2006; DÁRIO, 2012).

Nem todas as linhagens de leveduras são capazes de expressar os genes essenciais ao transporte e à regulação da fermentação de sacarídeos mais complexos, como a maltose. Uma vez permanecendo na cerveja produzida, este açúcar residual irá conferir à bebida sabores atípicos, além da baixa concentração de etanol (STAMBUK *et al.*, 2006). Sendo este o principal açúcar de interesse por ser componente majoritário do mosto cervejeiro, seguiram-se as análises apenas com as leveduras fermentadoras de maltose.

4.4 Análise da produção de H₂S

O ácido sulfídrico (H₂S) é um produto do metabolismo de alguns compostos inorgânicos presentes no mosto e da biossíntese de aminoácidos com átomos de enxofre em sua estrutura, como a metionina. Durante a fermentação de cervejas, pode haver diferentes níveis de produção desse gás pelas leveduras dependendo das características da linhagem e das condições de fermentação. Mesmo baixas quantidades de sulfeto de hidrogênio são prejudiciais ao produto final. Ele afeta o sabor e o aroma da cerveja, conferindo-a forte cheiro de ovos podres (WHITE & ZAINASHEFF, 2010; SAERENS *et al.*, 2010). Dessa forma, a capacidade na produção de H₂S pelos isolados foi avaliada conforme escala de análise descrita no item 3.2.2 e exemplificada na figura 6. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica e os resultados encontram-se na tabela 4.

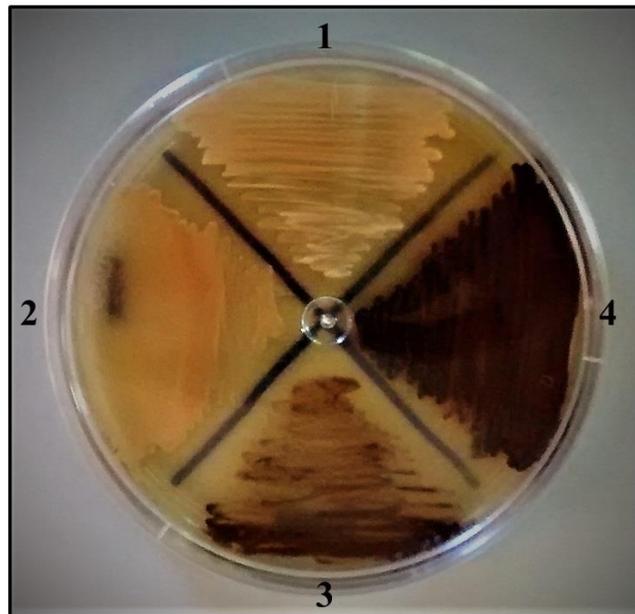


Figura 6. Resultados representativos do teste de produção de H₂S. 1- Heffeweizen; 2- US-05; 3- PB113; 4- *Candida albicans* ATCC 28367.

As linhagens Heffeweizen e US-05 possuem baixa produção de H₂S durante o processo de fabricação de cerveja. Conforme esperado, Heffeweizen apresentou colônias de coloração branca e US-05 colônias bege, indicando nenhuma ou pouca produção, como esperado em linhagens comerciais. Dentre os isolados, somente PB113 apresentou colônias de coloração marrom, ou seja, produção média deste gás – característica indesejada na indústria de cervejas. A exceção de PB111, a qual não apresentou produção de H₂S, o restante dos isolados se mostraram pouco produtores de H₂S, semelhantes à levedura comercial US-05.

Tabela 8. Produção de sulfeto de hidrogênio pelas linhagens comerciais US-05, Heffeweizen e pelos isolados fermentadores de maltose. 1- colônias brancas: não produz H₂S; 2- colônias bege: produz pequena quantidade de H₂S; 3- colônias marrons: média produção de H₂S; 4- colônias pretas: alta produção de H₂S. (*): Ensaio em triplicata.

Isolado	Produção de H ₂ S		
	1	2	3*
US-05	2	2	2
Heffeweizen	1	1	1
PB111	1	1	1
PB113	3	3	3
CB341	2	2	2
PB341	2	2	2
CB352	2	2	2
PB381	2	2	2
CB382	2	2	2
PB383	2	2	2
CB392	2	2	2

4.5 Avaliação da tolerância ao etanol e ao estresse osmótico

Durante o processo de produção de cervejas, as leveduras podem passar por diversas condições estressantes as quais podem afetar a vitalidade e a viabilidade celular. Oscilações de temperaturas, escassez de nutrientes, baixos níveis de pH e anaerobiose são algumas delas (THARAPEL *et al.*, 2008; LEI *et al.*, 2012). Sendo o mosto cervejeiro rico em açúcares, este ambiente acaba conferindo às células das leveduras altas pressões osmóticas. Já o etanol, produto da fermentação utilizado como substrato energético, atinge concentrações elevadas, principalmente ao final da fermentação. A alta concentração deste álcool no meio pode gerar efeitos citotóxicos às leveduras, como a desnaturação de proteínas de membrana, inibição do crescimento, redução do tamanho celular, redução da taxa de respiração, redução da absorção de

glicose, inativação de enzimas e redução do pH citoplasmático (GIBSON *et al.*, 2007). Os prejuízos da integridade celular afetam diretamente o desempenho das leveduras durante a fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Desta forma, mostra-se de grande importância que leveduras cervejeiras apresentem tolerância ao estresse osmótico e ao etanol presentes no mosto cervejeiro. A integridade das células também é importante para a reutilização das leveduras em fermentações subsequentes.

Para analisar a capacidade das leveduras selecionadas em tolerar estas condições, os isolados foram inoculados utilizando a técnica de *replica plate*, conforme indicado na figura 7, sendo cada colônia um isolado diferente. A classificação final encontra-se na tabela 5, em triplicata. Todos os isolados foram capazes de resistir a, pelo menos, 12 °P e 5% de etanol.

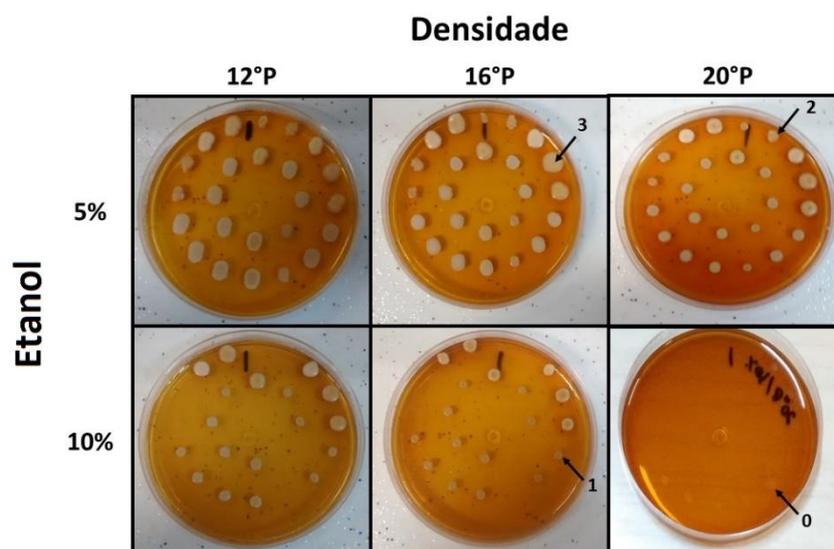


Figura 7. Ensaio de tolerância a diferentes concentrações de açúcar e etanol em Ágar DME. Representação da inoculação das leveduras utilizando a técnica *replica plate*. 0- ausência de crescimento; 1- pouco crescimento; 2- crescimento médio; 3- muito crescimento.

Tabela 9. Tolerância ao estresse osmótico e ao etanol pelas linhagens comerciais US-05, Heffeweizen e pelos isolados selecionados.

Isolado	12°P e 5%	12°P e 10%	16°P e 5%	16°P e 10%	20°P e 5%	20°P e 10%
US-05	2	0	2	0	1	0
Heffeweizen	2	0	2	0	1	0
PB111	3	2	3	1	3	0
PB113	3	2	3	1	3	0
CB341	3	1	3	1	2	0
PB341	3	1	2	1	2	0
CB352	3	0	2	0	1	0
PB381	3	1	3	1	2	0
CB382	3	1	3	1	2	0
PB383	3	1	2	1	2	0
CB392	3	1	3	1	2	0

Todos os isolados apresentaram bom crescimento em 5% de etanol para todos os valores de densidade, com exceção de CB352 o qual apresentou crescimento baixo em 20 °P, valor de densidade considerado muito alto. Em 16 °P e 10% de etanol, este mesmo isolado não apresentou crescimento, indicando ser uma levedura com menor resistência a condições mais extremas de cultivo. Todos os outros isolados apresentaram pouco crescimento nestas mesmas condições. PB111 e PB113 apresentaram bom crescimento em 10% de etanol para valores de densidade considerados normais (12 °P). Nenhum isolado foi capaz de crescer em altas concentrações de etanol e açúcar (20 °P e 10%). As leveduras isoladas foram comparadas aos controles, US-05 e Heffeweizen, que também parecem não resistir a uma concentração de 10% de etanol e 20 °P de densidade original do mosto.

4.6 Crescimento em diferentes temperaturas

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes em processos industriais. Na fermentação de cervejas, o controle da temperatura é essencial para a produção de uma cerveja de alta qualidade: altas temperaturas aumentam a taxa de fermentação e a concentração final de álcoois superiores e ésteres (SAERENS *et al.*, 2008). Também, temperaturas muito altas ou muito baixas afetam a produção de muitos precursores de *off-flavors* no início da fermentação, assim como a temperatura também afeta a capacidade da levedura em reduzir a formação destes compostos indesejados no final da fermentação. O calor no mosto, resultante da fermentação pela levedura, se não contido, também gera situações de estresse metabólico nas células, podendo levar a mutações em alguns casos ou até levá-las à morte devido ao calor extremo (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Tradicionalmente, leveduras do tipo *ale* fermentam entre 16 e 25 °C, enquanto leveduras *lager*, entre 6 e 15 °C. Dessa forma, é importante conhecer a linhagem da levedura com a qual se está trabalhando para um melhor controle da fermentação. Além disso, o estilo de cerveja a ser produzido é afetado diretamente pela temperatura de fermentação (HUUSKONEN *et al.*, 2010; WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

As células de linhagens *lager* possuem menos tolerância a altas temperaturas do que as *ales*. Por isso, um dos métodos laboratoriais de diferenciação entre *ale* e *lager* é a incubação das leveduras a 37°C. Se as células crescerem, serão *ales*, pois as *lagers* não sobrevivem (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Para analisar o perfil das leveduras isoladas, as amostras foram incubadas em 4 diferentes temperaturas (Tabela 6).

Tabela 10. Crescimento das leveduras comerciais US-05, Heffeweizen e dos isolados em quatro diferentes temperaturas. 1- pouco crescimento; 2- crescimento médio; 3- muito crescimento.

Isolado	Temperatura			
	37°C	25°C	20°C	10°C
US-05	1	3	3	1
Heffeweizen	1	3	3	1
PB111	3	3	3	1
PB113	3	3	3	2
CB341	1	3	3	2
PB341	1	3	3	2
CB352	3	3	3	2
PB381	1	3	3	2
CB382	1	3	3	2
PB383	2	3	3	2
CB392	2	3	3	2

Todos os isolados apresentaram ótimo crescimento em 20 e 25 °C e um crescimento satisfatório em 10 °C, com exceção de PB111 a qual apresentou baixo crescimento, mostrando-se sensível a baixas temperaturas. Todos os isolados foram capazes de sobreviver a 37 °C, com destaque para PB111, PB113 e CB352 os quais obtiveram um grande crescimento nessa temperatura.

Todas as linhagens isoladas podem se enquadrar melhor para a produção de cervejas do tipo *ale*, uma vez que apresentaram crescimento igual ou superior aos controles US-05 e Heffeweizen – ambas leveduras *ale* (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

4.7 Análise da capacidade de floculação

Na indústria de alimentos e bebidas, principalmente em processos fermentativos, as células em suspensão precisam ser separadas do meio de cultivo para que possam ser reutilizadas em processos posteriores. Para a indústria de cervejas, é importante que se possa explorar a capacidade de floculação das leveduras cervejeiras, uma vez que este processo barateia o custo de produção.

A floculação é um fenômeno de aglomeração da biomassa o qual ocorre ao final da fermentação. As células aderem-se umas às outras formando flocos macroscópicos que serão coletados da base do fermentador para uso nas próximas fermentações, deixando a cerveja mais clara (GINOVART, 2006). As células em suspensão influenciam a velocidade da fermentação, o sabor da cerveja, a maturação e a filtração (JIN & SPEERS, 1998). Por isso, é crucial que a levedura flocule no momento adequado do processo. Se a levedura não flocula, a cerveja fica turva e com gosto de fermento. Pela floculação ser uma propriedade instável, variando conforme a linhagem e o processo fermentativo, é fundamental compreender o comportamento da linhagem com a qual se está trabalhando.

As lectinas são proteínas de superfície celular com a capacidade de ligar-se reversivelmente em carboidratos. Em *S. cerevisiae*, estas proteínas desempenham papel fundamental na floculação, sendo conhecidas por zimolectinas, diferenciando-as das lectinas de outros organismos (JIN & SPEERS, 1998). Tais proteínas de superfície ligam-se aos receptores de carboidratos localizados na parede celular das células vizinhas durante a floculação. A interação proteína-carboidrato pode ser dependente de cálcio, conforme o fenótipo da levedura, e sensível a açúcares, como a manose e a glicose. O papel dos íons cálcio na mediação deste processo é manter a conformação correta do sítio de ligação das zimolectinas. Alguns parâmetros de fermentação, como a temperatura e o pH, também podem afetar a floculação (STRATFORD, 1989; JIN & SPEERS, 1998).

As leveduras podem ser classificadas quanto a sua floculação como alta, média ou baixa. Linhagens *ale* encontram-se nas três categorias, enquanto que as linhagens lager são predominantemente de floculação média. Leveduras de alta floculação estão geralmente associadas ao baixo consumo de açúcares durante a fermentação (baixa atenuação) e a alta produção de diacetil e ésteres – características comuns nas *ales*

inglesas. Cervejas produzidas com leveduras de flocculação média tendem a apresentar um aspecto mais límpido, em relação às leveduras de baixa flocculação, e maior redução na quantidade de diacetil e ésteres produzidos, enquadrando-se nas *ales* americanas – cervejas geralmente mais lupuladas. Já as leveduras de baixa flocculação são raramente utilizadas na fermentação de cervejas. Com as células permanecendo em suspensão, produzem cervejas mais turvas, dificultando a filtração. Porém, alguns estilos são marcantes por estas qualidades, como as Hefeweizens alemãs e as Wit Beers belgas (WHITE, 2012).

Para analisar a porcentagem de flocculação das linhagens isoladas, foram realizados os procedimentos descritos em 3.2.4 e os resultados encontram-se na tabela 7.

Todos os isolados possuem fenótipo de flocculação dependente de cálcio, ou seja, sensíveis ao EDTA (+). Os isolados CB341, PB341, PB381, PB383 e CB392 apresentaram flocculação baixa, enquanto que os isolados PB111, PB113, CB352 e CB382 foram classificados como leveduras de média flocculação. Destaque para as amostras PB111 e PB113 cujos percentuais de flocculação foram superiores ou iguais à linhagem comercial US-05. Nenhum isolado obteve altas porcentagens de flocculação, como esperado, por se tratar de um fenótipo selecionado nas linhagens de leveduras inglesas e muito incomum em leveduras selvagens.

Estudos já demonstraram que a temperatura pode contribuir para a flocculação das leveduras enquanto que a adição de açúcares, como a glicose e a manose, podem inibir a flocculação (ARAÚJO, 2013). As lectinas possuem maior afinidade por estes carboidratos, assim impedindo a interação entre as células. Portanto, mais estudos são necessários para determinar o perfil exato de flocculação de cada isolado.

Tabela 11. Análise da sensibilidade ao EDTA e do percentual de floculação dos isolados e da linhagem comercial US-05. Classificação das leveduras quanto a floculação: A = alta; M = média; B = baixa.

Linhagem	Sensibilidade ao EDTA	Floculação (%)*	Classificação
US-05	+	56,14%	M
PB111	+	59,09%	M
PB113	+	56,66%	M
CB341	+	32,42%	B
PB341	+	39,00%	B
CB352	+	51,65%	M
PB381	+	32,26%	B
CB382	+	52,09%	M
PB383	+	35,15%	B
CB392	+	26,69%	B

* Valores correspondentes à média entre as porcentagens de três ensaios, realizados em triplicata.

4.8 Identificação molecular

A identificação molecular de leveduras é uma ferramenta importante para o controle de qualidade na indústria de alimentos e bebidas, uma vez que a pureza do inóculo está diretamente relacionada à qualidade da fermentação. KURTZMANN & ROBNETT (1995) demonstraram que a maioria das espécies de leveduras podem ser identificadas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 da subunidade grande (26S) do rDNA a partir do método desenvolvido por O'DONELL (1993).

A correta identificação das espécies, além de fundamental para o controle de qualidade das bebidas, também é de grande importância do ponto de vista taxonômico, ajudando a compreender as relações filogenéticas entre espécies para o desenvolvimento de uma possível cultura mista. Para fins de pesquisa, estas ferramentas moleculares também são importantes no melhoramento genético de leveduras (WINESERVER, 2014).

A diversidade de fungos presentes nas diferentes partes das plantas é vasta devido a gama de substratos que elas podem proporcionar (FOKKEMA, 1991). Devido à alta concentração de açúcares simples e baixo pH, os frutos são potencial habitat de leveduras e diversos estudos já demonstraram que leveduras isoladas de frutos são boas fermentadoras e assimilam glicose, etanol, glicerol e celobiose (PHAFF & STARMER, 1987). GRAÇA *et al.* (2015) encontraram *C. sake*, *P. fermentans*, *Hanseniaspora spp.*, *Candida spp.*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus spp.* e *Cystofilobasidium infirmominiatum* dentre as leveduras mais comuns isoladas de maçãs comercializadas em Portugal, enquanto PRADA & PADNOCCA (1997) postularam que os gêneros *Candida* e *Kloeckera* predominavam dentre as leveduras isoladas de frutos nativos do litoral sul paulista. Ainda, BEZERRA-BUSSOLINI *et al.* (2013) encontraram 13 espécies (*Candida quercitrusa*, *Candida stellata*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Sporidiobolus pararoseus*) a partir de 130 isolados de uvas coletadas na região de Jales, em São Paulo.

No presente estudo, foram encontradas 2 leveduras identificadas como *S. cerevisiae*, 1 *C. lusitaniae* e 6 *P. anômala* a partir do bagaço e das cascas de 13 tangerinas (Tabela 8).

Tabela 12. Resultado do sequenciamento dos isolados fermentadores de maltose e percentual de identidade.

Isolado	Espécie	Identidade
US-05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%
PB111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%
PB113	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%
CB341	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	100%
PB341	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	100%
CB352	<i>Clavispora lusitaniae (Candida lusitaniae)</i>	99%
PB381	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	99%
CB382	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	100%
PB383	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	100%
CB392	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>	99%

Os gêneros encontrados estão de acordo com o esperado provindo de frutos. A prevalência de *P. anomala* dentre estes isolados pode se dar por alguns fatores, como a característica de produzir, nos mais variados habitats em que se encontra, substâncias com capacidade antifúngica (PASSOTH & SCHNÜRER, 2003), possivelmente inibindo competidores. Sendo esta espécie comumente encontrada em bebidas e alimentos fermentados, possuindo papel importante em fermentações espontâneas (MASOUD *et al.*, 2004; SUJAYA *et al.*, 2004), sua prevalência também pode se dar pelo fato das condições de fermentação realizadas neste trabalho serem análogas às da produção de cervejas. Esta espécie é capaz de crescer sob condições estressantes, como uma ampla faixa de pH, altas pressões osmóticas e em condições anaeróbias (FREDLUND *et al.*, 2002). Apesar disso, *P. anomala* não possui uma vasta tolerância ao etanol e, sob condições aeróbias, é considerada Crabtree negativa, apresentando baixa produção deste álcool durante a fermentação (KALATHENOS *et al.*, 1995; FREDLUND *et al.*, 2002; DEDEKEN, 1966; FREDLUND *et al.*, 2004). Estes fatos condizem com os resultados encontrados neste trabalho para a avaliação da tolerância ao etanol e ao estresse osmótico (item 4.5), nos quais os isolados apresentaram bom crescimento em 5% de etanol, para todos os valores de densidade, porém crescimento reduzido em 10% de etanol.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou as primeiras análises a partir do isolamento de leveduras selvagens provindas do bagaço e da casca de tangerinas, coletadas de árvores locais durante a época de safra, entre abril e maio de 2016, nas cidades de Guaíba e Barra do Ribeiro. Dos 37 isolados, 9 foram selecionados pela capacidade em fermentar maltose. PB113 pode não ser uma boa candidata à fermentação de cervejas, uma vez que produz quantidade média de H₂S. CB352, apesar da sensibilidade a condições mais extremas de fermentação, como mostos com densidades alta (16 °P) e muito alta (20 °P), e porcentagens mais elevadas de etanol (10%), ainda poderia ser utilizada para condições fermentativas consideradas normais (12 °P e 5% de etanol).

De todos os isolados, PB111 apresentou resultados satisfatórios até o presente momento, sendo não-produtor de gás sulfídrico e apresentando ótimo crescimento em 5% de etanol, para todos os valores de densidade, e 10% de etanol em densidade normal (12 °P). Apesar da sensibilidade a temperaturas mais baixas, obteve crescimento elevado a 37 °C e uma porcentagem de floculação superior à linhagem comercial US-05. O sequenciamento identificou esta levedura como uma *S. cerevisiae*, espécie largamente utilizada na indústria.

Algumas perspectivas deste trabalho incluem testes complementares àqueles realizados neste estudo, tais como:

- a) Análise da floculação em baixas temperaturas e na presença de açúcar para fins de comparação às condições analisadas neste estudo;
- b) Avaliação da capacidade dos isolados na produção e sensibilidade a toxinas *killer*;
- c) Velocidade de crescimento na presença de glicose e maltose;
- d) Análise da viabilidade celular após processo fermentativo;
- e) Análise de atenuação dos isolados;
- f) Perfil aromático e análise sensorial do produto final.

A obtenção de linhagens com fenótipos desejáveis para a produção de cervejas contribuirá para o desenvolvimento científico e tecnológico do setor, oferecendo um produto biotecnológico nacional como alternativa ao fermento importado e conferindo mais independência e autonomia ao mercado cervejeiro.

6 BIBLIOGRAFIA

AMORIM, B. As duas grandes famílias cervejeiras. *Revista da cerveja*, v. 7, p. 52-54, 2013.

ARAÚJO, T. M. *Caracterização bioquímico-molecular de cepas de Saccharomyces cerevisiae isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a produção de cervejas*. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2013.

BARNETT, J. A. *Yeasts, characteristics and identification*. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811 p.

BERLOWSKA, J.; KREGIEL, D.; RAJKOWSKA, K. Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast*, n. 32, p. 289-300, 2015.

BEZERRA-BUSSOLINE, C. *et al.* Yeast Diversity Isolated from Grape Musts During Spontaneous Fermentation from a Brazilian Winery. *Curr Microbiol.* 67(3), p. 356-361, 2013.

BING, J.; HAN, P.J.; LIU, W.Q. *et al.* Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr Biol.*, n. 24, p. 380-381, 2014.

BIOCOURSEWARE TEAM. *Virtual Yeast Cell*, 2012. Disponível em: <http://www.biocourseware.com/iphone/cell/index_pad.htm> Acesso em: Dezembro de 2016.

BJCP Style Guidelines. 2015. Disponível em: <http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf> Acesso em novembro de 2016.

BLIECK, L.; TOYE, G.; DUMORTIER, F. *et al.* Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Appl Environ Microbiol.*, n. 73, p. 815-824, 2007.

COPPOLA, V. Precipitazione del ferro e del rame nei vini: cause e prevenzioni. *Vignevini*, v. 9, p. 19-21, 1982.

D'HAUTCOURT, O. e SMART, K.A. Measurement of brewing yeast flocculation. *Journal of American Society of Brewery Chemistry*. n. 57, p. 123-128, 1999.

- DAMASCENO, A. Sabor da tradição. *Guia da cerveja*, v. 8, p. 76-85, 2013.
- DÁRIO, M. G. *Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolism de Saccharomyces cerevisiae*. 2012. 153f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- DEDEKEN, R.H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen. Microbiol.* n. 44, p. 149–156, 1966.
- FOKKEMA, N. J. The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view. In *Microbial Ecology of Leaves*, ANDREWS, J. H; HIRANO, S. S. (Eds.), *Springer-Verlag*, New York. p.3-18, 1991.
- FREDLUND, E.; BLANK, L.M.; SAUER, U. *et al.* Oxygen and glucose dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl Environ Microbiol*, n. 70, p. 5905–5911, 2004.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E. *et al.* Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast*, n. 2, p. 395–402, 2002.
- GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.R.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, n. 31, p. 535–569, 2007.
- GINOVART, M.; LÓPEZ, D.; GIRÓ, A.; SILBERT, M. Flocculation in brewing yeast: A computer simulation study. *BioSystems*, n. 83, p. 51-55, 2006.
- GRAÇA, A.; SANTO, D.; ESTEVENS, E. *et al.* Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology*, n. 51, p. 179-185, 2015.
- HAZELWOOD, L.A.; WALSH, M.C.; PRONK, J.T.; DARAN, J.M. Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- α -acids. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 76, p. 318-328, 2010.
- HELD, P. *Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae*, 2010. Disponível em: <<http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>> Acesso em novembro de 2016.

HERBERTS, R. A. *Transporte ativo de α -glicosídeos*: Uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HORNSEY, I. S. *A History of Beer and Brewing*. Cambridge, Reino Unido: RSC Paperbacks, 2003. 762 p.

HORTIBRASIL. *Estatísticas das Tangerinas*, 2014. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/2016-06-03-10-49-48/1190-estatisticas-das-tangerinas.html>> Acesso em: Dezembro de 2016.

HOU, J.; TYO, K.E.; LIU, Z.; PETRANOVIC, D.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology*, n. 12, p. 491–510, 2012.

HOUGH, J.S. *Biotecnología de la cerveza y de la malta*. Saragoça, Espanha: ACRIBIA, S.A. 1990.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V. *et al.* Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. *Appl Environ Microbiol.*, n. 76, p. 1563-1573, 2010.

JIN, YU-LAI; SPEERS, R. A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, v. 31, n. 6±7, p. 421±440, 1998.

KALATHENOS, P.; SUTHERLAND, J.P.; ROBERTS, T.A. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J Appl Bacteriol*, n. 78, p. 245–250, 1995.

KURTZMANN, C.P. & ROBNETT, C.J. Phylogenic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, n. 7, p. 61-72, 1991.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 104, p. 1107-1112, 1992.

- LEI, H.; ZAO, H.; YU, Z.; ZAO, M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n. 166, p. 1562–1574, 2012.
- LIBKIND, D. HITTINGER, C.T., VALÉRIO, E. *et al.* Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, n. 108, p. 14539-14544, 2011.
- LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M. *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, n. 458, p. 337-341, 2009.
- MARONGIU, A.; ZARA, G.; LEGRAS, J.L. *et al.* Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, n. 42, p. 85-92, 2015.
- MASOUD, W; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, n. 21, p. 549–556, 2004.
- MERCADO CERVEJEIRO. *Cervbrasil*. Disponível em: <<http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor>>. Acesso em: 08 de agosto de 2016.
- MORADO, R. *Larousse da Cerveja*. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.
- NICKERSON, W.J. Reduction of inorganic substances by yeasts. I. extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *Journal of Infectious Diseases*, n. 93, p. 43, 1953.
- O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR & Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (pp 225–233). CAB International, Wallingford, UK, 1993.
- OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G. *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Appl Environ Microbiol.*, n. 74, p. 693-701, 2008.

ONO, B.; ISHII, N.; FUJINO, S. *et al.* Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.*, n. 57, p. 3183-3186, 1991.

PALMER, J. J. *How To Brew*. 3 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2006.

PASSOTH, V. & SCHNÜRER, J. Non-conventional yeasts in antifungal application. *Functional Genetics of Industrial Yeasts* (deWinde JH, ed), pp. 297–329. Springer Verlag, Berlin, 2003.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil, pp. 123- 180 in SER, H; HARRISON, J. S. (Eds): *The Biology of Yeasts*, Vol. 1. Academic Press, London, 1987.

POWELL, C.D.; QUAIN, D.E.; SMART, K.A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Microbiology*, n. 3, p. 149-157, 2003.

PRADA, G. M. M.; PAGNOCCA, F. C. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. *Folia Microbiologica*, v. 42, n. 1, p. 39-46, 1997.

PRONK, J. T.; STEENSMA, H. Y; JOHANNES, P. V. D. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 12, p. 1607-1633, 1996.

PUT, D. *The life of yeast cell*, 2012. Disponível em: <<http://morebeer.com/articles/lifeofayeast>>. Acesso em novembro de 2016.

SAERENS, S.M.; DUONG, C.T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol.*, n. 86, p. 1195-1212, 2010.

SAERENS, S.M.; VERBELEN, P.J.; VANBENEDEN, N. *et al.* Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavor formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.*, n. 80, p. 1039-1051, 2008.

SANTOS, S. *Os primórdios da cerveja no Brasil*. 2 ed. Cotia, SP: Ateliê Editorial, 2004.

SCHLENK, F. Early research on fermentation – a story of missed opportunities. *Trends Biochem Sciences*, v. 10, p. 252-254, 1985.

SICARD, D.; LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C R Biol*, n. 334, p. 229-236, 2011.

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

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E. *et al.* Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology*, n. 38, p. 947-995, 2014.

STRATFORD, M. Yeast Flocculation: Calcium Specificity. *YEAST*, v. 5, p. 487-496, 1989.

SUJAYA, I.N.; ANTARA, N.S.; SONE, T. *et al.* Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. *World J Microb Biotechnol*, n. 20, p. 143–150, 2004.

THARAPPEL, C.J.; USHER, J.; CAMPBELL, S.; BOND, U. Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Current Genetics*, n. 53, p. 139-152, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VENTURINI, W.; CEREDA, M. *Biotechnologia industrial vol. 4: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2008.

VENTURINI, W.G. *Tecnologia de cerveja*. São Paulo: ABDR, 2000.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. *Microbiologia Geral*. Inhumas, Goiás: e-Tec Brasil, 2012.

WANG, Q.M.; LIU, W.Q.; LITI, G. *et al.* Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol Ecol.*, n. 21, p. 5404-5417, 2012.

WHITE, C. Flocculation Basics. *White Labs*, 2012. Disponível em: <http://www.whitelabs.com/sites/default/files/Flocculation_help.pdf> Acesso em novembro de 2016.

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

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (org). *The yeasts: a taxonomic study*. *Elsevier*, Amsterdam, p. 77-100, 1998.