

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JÚLIA MORAES

**Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade
de leveduras no contexto microcervejeiro**

Porto Alegre
2017

Júlia Moraes

Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

PORTO ALEGRE

2017

Júlia Moraes

Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Bonatto

Prof. Dr. Daniel Gelain

Profa. Dra. Patrícia Valente

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, e acredito que mais importante, agradeço ao professor Diego Bonatto por ter me acolhido como aprendiz nos “45 no segundo tempo” e me proporcionar um aprendizado imensurável no estilo “50 anos em 5”. Além dos aprendizados, agradeço a compreensão e paciência durante este período conturbado, se mostrando como exemplo profissional e pessoal a ser seguido.

Agradeço aos meus pais pela inspiração e constante incentivo, e à minha irmã Marina, que mesmo sem saber, me instiga a sempre crescer pessoalmente.

Agradeço a minha família pelo apoio e amor incondicional.

Agradeço, do fundo do coração, ao João Paulo, companheiro e amigo que abdicou de seus finais de semana para me acompanhar em meus experimentos no campus do vale não só por uma, mas por várias vezes. Pela cumplicidade e lealdade que me mostrou esse ano, meu mais sincero agradecimento.

Agradeço às minhas irmãs de coração, Amanda, Carine, Isadora, Mariane, Marina e Victória, que acompanharam minhas crises e as acalmaram com boas conversas e um copo de cerveja.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Marcelo e Bianca, que compartilharam seu conhecimento para que eu pudesse crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

Agradeço a Ligia Weber, maior herança pessoal que a faculdade me deu.

Agradeço a minha avó Adelina, que desde sempre valorizou muito o estudo e formação, não medindo esforços para proporcionar melhores condições a seus filhos e netas. Dedico este trabalho a sua memória.

A todos que, de alguma forma, tornaram este trabalho possível, obrigada!

RESUMO

O crescente número de microcervejarias instaladas no Brasil vem se superando a oferta de insumos para a produção da cerveja, dentre eles, o fermento. Atualmente, existem apenas quatro empresas que comercializam leveduras para a produção de cerveja, sendo apenas duas delas capazes de atender a fábricas com maior produção. Visto isto, para atender a outras regiões, estas empresas transportam o fermento cervejeiro por longas distâncias. Durante este processo, as leveduras acabam sendo expostas a diversas condições, como estresse térmico (devido a falta de refrigeração) e senescência cronológica (devido ao longo tempo de estocagem na empresa e transporte por longas distâncias). Devido a isso, as células chegam ao cervejeiro com baixa capacidade fermentativa devido ao decréscimo de vitalidade e viabilidade. Pensando nisto, este trabalho desenvolveu um teste de vitalidade capaz de estimar o estado fisiológico da levedura baseado no corante resazurina, que é altamente dicromático, apresentando uma mudança colorimétrica proporcional a vitalidade das células altamente detectável a olho nu. Para a padronização do teste, as cepas W34/70 e US-05 foram submetidas a diferentes condições de estresse térmico, e diferentes variáveis, como concentração de resazurina, densidade celular e tempo de incubação do teste foram definidas, usando como comparação o teste de poder de acidificação e avaliando a viabilidade das células pela técnica de azul de metileno. Então, para avaliar a sensibilidade do teste de resazurina, o envelhecimento cronológico de culturas de ambas as cepas foi acompanhado por testes de vitalidade e viabilidade, demonstrando o decréscimo da atividade metabólica e capacidade replicativa das células conforme o aumento do tempo da cultura. Observou-se diferentes taxas de decréscimo da vitalidade e viabilidade entre as cepas. Além disto, foi confirmado o potencial do ensaio de resazurina em prever a capacidade fermentativa de leveduras submetidas a diferentes condições de estresse através de medições de atenuação do mosto, validando a aplicabilidade deste ensaio no contexto microcervejeiro.

Palavras-chave: Leveduras cervejeiras. Vitalidade. Viabilidade. Estresse térmico. Azul de Alamar. Resazurina. Envelhecimento cronológico. Teste de vitalidade. Microcervejaria.

ABSTRACT

The growing of microbrewerys in Brazil has imposing an increase in the production of different supplies for brewing, including yeast biomass for beer fermentation. In Brazil, only four companies produce and sell yeasts for microbreweries, and only two companies are able to attend microbreweries. Additionally, these companies should be able to deliver yeast cells to different states and cities in Brazil. During transport, the yeast cells are exposed to thermal stress (due to the lack of temperature control) and chronological aging (due to the long period of storage and transport). When delivered to the microbreweries, those yeast cells display problems during beer fermentation as the consequence of a lower yeast vitality and viability and affecting beer's quality. Thus, in this work a new colorimetric assay was developed to access the vitality of yeast cells by using resazurin. Resazurin is a highly dichromatic dye, showing a colorimetric change proportional to the yeast cell vitality that can be easily visualized by naked eye. To evaluate the potential of resazurin to differentiate yeast cells with low and high vitality, different yeast ale and lager strains (US-05 and W34/70, respectively) were submitted to heat shock stress and their vitality was accessed by resazurin, testing different variables as concentration of work solution, cellular density and incubation time. The resazurin data, supported by acidification power test, showed a vitality decrease in cells submitted to heat shock stress. Furthermore, the sensibility of the resazurin assay was explored during chronological aging of yeast cells. The assay was capable to detect differences of vitality and viability between yeast strains. In addition, the potencial of the resazurin test to predict the fermentative capacity of stressed and non-stressed yeast cells was observed in wort attenuation assays, confirming the aplicability of resazurin in the microbrewry context.

Keywords: Vitality assay. Chronological aging. Heat shock stress. Brewery yeasts. Resazurin. Alamar blue.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação da estrutura simplificada da levedura *Saccharomyces*. **10**
- Figura 2** - Curva de crescimento celular de leveduras durante o processo fermentativo, com as respectivas fases indicadas: *Lag* (fase adaptativa); Exponencial (fase de maior crescimento celular) e Estacionária (fase onde o crescimento celular se estabiliza)..... **13**
- Figura 3** - Resumo das vias envolvidas na assimilação de glicose e etanol sob condições aeróbicas..... **16**
- Figura 4** - Fórmula molecular do corante azul de Alamar. Quando o composto se encontra na forma oxidada (esquerda), recebe o nome de resazurina; e quando na sua forma reduzida (direita) é chamado de resorufina **17**
- Figura 5** - Desenho experimental do ensaio de resazurina..... **23**
- Figura 6** - Sistema da placa de 96 poços utilizado para o teste de resazurina das culturas de leveduras US-05 (a) e W34/70 (b) submetidas a diferentes condições: estresse agudo, estresse crônico e controle..... **24**
- Figura 7** - Correlação da densidade óptica das cepas W34/70 e US-04 em suspensões com diferentes concentrações celulares estimadas por câmara de Neubauer (em células/mL). Legenda: leitura em 595 nm (a), leitura em 600 nm (b) e leitura em 660 nm (c)..... **27**
- Figura 8** - Curva padrão da concentração celular (em células/mL) e sua respectiva absorvância em 660 nm da cepa W34/70..... **27**
- Figura 9** - Testes de vitalidade das leveduras US-05 e W34/70 submetidas a diferentes condições térmicas: Estresse agudo (12 horas a 39 °C), Estresse crônico (24 horas a 39 °C) e Controle (mantida a 30 °C). Legenda: teste de poder de acidificação da cepa US-05 (a), teste de resazurina da cepa US-05(b), teste de poder de acidificação da cepa W34/70(c) e teste de resazurina da cepa W34/70(d)..... **30**
- Figura 10** - Análise da vitalidade e viabilidade de culturas das cepas US-05 e W34/70 examinadas a cada dois dias, durante onze dias, pelos ensaios poder de acidificação, azul de metileno e resazurina. Legenda: vitalidade da cepa US-05 por poder de acidificação (a), vitalidade da cepa W34/70 por poder de acidificação (b), viabilidade da cepa US-05 por azul de metileno (c), viabilidade da cepa W34/70 por

azul de metileno (d), vitalidade da cepa US-05 pelo teste de resazurina (e) e vitalidade da cepa W34/70 pelo teste de resazurina (f).....**33**

Figura 11 - Atenuação das cepas W34/70 (a) e US-05 (b) submetidas a estresse térmico crônico, estresse térmico agudo e condição controle.....**36**

Figura 12 - Análise da vitalidade e vitalidade das cepas US-05 e W34/70 submetidas a diferentes intensidades de estresse térmico prévio a inoculação no mosto. Legenda: vitalidade da cepa W34/70 por poder de acidificação (a), vitalidade da cepa US-05 por poder de acidificação (b), viabilidade da cepa W34/70 (c), viabilidade da cepa US-05 (d), vitalidade da cepa W34/70 pelo ensaio de resazurina (e), vitalidade da cepa US-05 pelo ensaio de resazurina (f).**37**

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
1.1 Da Mesopotâmia à atualidade.....	7
1.2 Cerveja e Biotecnologia.....	8
1.3 As leveduras cervejeiras.....	9
1.4 A fermentação cervejeira.....	11
1.5 Condições de estresse em leveduras e suas consequências na fermentação cervejeira.....	13
1.6 Análises de vitalidade e viabilidade das leveduras.....	14
1.7 O contexto.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Justificativa.....	19
4. Materiais e Métodos.....	20
4.1 Cepas e culturas de leveduras.....	20
4.2 Análise de viabilidade por azul de metileno.....	20
4.3 Padronização do número de células por absorbância.....	21
4.4 Teste do poder de acidificação.....	21
4.5 Indução de estresse térmico agudo e crônico em culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S.</i> <i>pastorianus</i>	21
4.6 Padronização do teste de vitalidade com resazurina.....	22
4.7 Avaliação da vitalidade e viabilidade durante o envelhecimento cronológico de leveduras.....	25
4.8 Teste de fermentação.....	25
5. Resultados e Discussão.....	26
5.1 Correlação da absorbância de uma amostra e sua concentração celular estimada por câmara de Neubauer.....	25

5.2 Padronização do teste de resazurina.....	29
5.3 Uso da resazurina para avaliação do envelhecimento cronológico.....	32
5.4 Estresse térmico e sua consequência na fermentação.....	35
6. Conclusão.....	39
7. Referências.....	39

1. Introdução

1.1 Da Mesopotâmia à atualidade

Não é equivocado afirmar que alguns dos acontecimentos mais importantes na história da ciência, tecnologia e da civilização estão relacionados a um dos produtos biotecnológicos mais antigos da história: a cerveja.

Ironicamente, apesar da produção de cerveja ser “recheada” de tecnologia atualmente, sua descoberta foi um cômico acaso. Evidências indicam que a história da cerveja se originou na região da Mesopotâmia, com indícios que datam desde 6.000 AEC (Antes da Era Comum) a 3.000 AEC (Sicard & Legras 2011), a partir de uma massa de pão de centeio levemente cozida, que acidentalmente foi embebida em água (Darby et al. 1977; Samuel 1996), passando a apresentar um sabor diferente e agradável devido à fermentação espontânea dos açúcares dos grãos. Desde então, a cerveja se tornou cada vez mais popular, e seu processo de fabricação que antes foi acidental, agora era bastante padronizado. O malte, constituído por grãos de cevada germinados, era moído, misturado com água e assado. Do pão resultante, eram retirados pedaços que eram embebidos em água, ocorrendo então a fermentação alcoólica (que, por ser desconhecida até então, era vista como “mágica divina”) (Hornsey 2007).

Até o início da Idade Média, as mulheres eram as responsáveis pela produção de cerveja. Por estar muito ligado à preparação de comida, os egípcios viam esta tarefa como doméstica, e, portanto, relacionada a responsabilidades femininas (Hornsey 2007). Por isso, a cerveja foi atribuída a uma deusa, Ninkasi. Foi só por volta século XIII da Era Comum (EC) e com a popularidade do cristianismo aumentando, que os homens assumiram a tarefa de fabricação da cerveja, que se tornou uma prática muito comum em mosteiros, visto que o conteúdo nutritivo desta bebida ajudava os monges a passarem por longos períodos de jejum (Rabin & Forget 2014).

O consumo dessa bebida fermentada crescia com sua popularidade e, simultaneamente com a sociedade, a cerveja foi se aprimorando. Durante esta época, utilizavam-se uma gama de aditivos na fabricação da cerveja, como uvas, tâmaras e outras especiarias (Hornsey 2007). O uso do lúpulo, adicionado à cerveja para conferir amargor, aroma e sabor, foi implementado na fabricação cervejeira apenas no século IX da EC devido a sua capacidade bacteriostática e conservante,

além de suas características sensoriais (Hornsey 2007), dando origem a cervejas que mais se aproximam com as que consumimos hoje em dia.

Com a preocupação de se estabelecer padrões que garantissem a qualidade na fabricação desta bebida, em 1516, foi criada a “Lei da Pureza”, que determinava os únicos ingredientes passíveis de serem utilizados na fabricação da cerveja: água, cevada e lúpulo (Morado 2009; Aquarone et al. 2001). Nota-se que as leveduras, responsáveis pela etapa de fermentação alcoólica, sequer foram incluídas na lista, devido ao seu ainda desconhecimento.

Devido a sua importância nutricional e social, a necessidade de produzir cerveja desperta nossa criatividade desde muito cedo na história e, por consequência, o desenvolvimento tecnológico na humanidade se relaciona muito com a fabricação desta bebida. Acredita-se que o “bem-estar” que a cerveja proporcionava persuadiu as pessoas a criar inúmeras invenções em cadeia com o objetivo de se fazer melhores cervejas. Desde então, grandes marcos da história devem créditos a esta bebida. Historiadores sugerem que a revolução neolítica, caracterizada pela domesticação dos grãos (Childe 2014), ocorreu devido ao anseio de se produzir cerveja (Hornsey 2007). Outros marcos históricos relacionados à cerveja consistem na invenção da refrigeração artificial, aprimoramento do termômetro, desenvolvimento da escala do pH e há indícios de que até a criação da escrita se relaciona com a cerveja, se desenvolvendo da necessidade de gravar a produção e distribuição da cerveja (Fagan & Beck 1996), e ainda há quem diga que a roda foi inventada devido à necessidade de distribuir e transportar esta bebida.

1.2 Cerveja e Biotecnologia

Não há dúvidas que a cerveja e a Ciência caminham lado a lado. Prova disto é a relação desta bebida com alguns dos maiores marcos no desenvolvimento da biotecnologia, como o isolamento de culturas de células e mapeamento genético. Em 1883, poucos anos após Luis Pasteur finalmente conseguir comprovar a existência das leveduras e sua função na fermentação da cerveja (Barnett & Euge 2000), o cientista Emil Hansen se tornou o primeiro a isolar uma cultura pura de levedura, nomeada *Saccharomyces carlsbergensis* (Olesen et al. 2002). Havia, naquele tempo, o que os cervejeiros chamavam de “Doença da Cerveja”, que se tratavam de lotes de cervejas com características sensoriais fora do padrão (azedas)

ou com curtíssima vida útil. Deste ponto nasceu o trabalho de Hansen, que começou a estudar a cerveja “doente” e constatou a presença de leveduras “selvagens”, ou seja, outras que não aquelas que eram originalmente inoculadas no mosto. Assim, Hansen desenvolveu um método para isolar e cultivar culturas puras de leveduras, revolucionando a indústria cervejeira (Hansen 1886).

A produção de cerveja é extremamente sensível e repleta de pontos críticos. Para reduzir o risco de produção de lotes “errados”, cientistas investem há décadas esforços para dominar os genomas das leveduras e técnicas de manuseio. Portanto, a manipulação e a seleção genética desses organismos para acumular características de interesse acaba sendo de extrema importância. Tendo isto em vista, pesquisadores contratados por cervejarias utilizavam a técnica de AFLP (do inglês, *amplified fragment length polymorphism*) para distinguir cepas de leveduras com boas performances fermentativas (Hansen & Kielland-Brandt 1994; Fujii et al. 1996; Børsting et al. 1997; Tamai et al. 1998; Yamagishi & Ogata 1999) e, assim, selecionar artificialmente leveduras com características de interesse, mapear genes de interesse e diferenciar espécies (Walther et al. 2014).

1.3 As leveduras cervejeiras

“Incríveis números de esferas são vistas, as quais são ovos de animais. Quando colocadas em solução açucarada, elas incham, eclodem e animais se desenvolvem delas, os quais se multiplicam em alta velocidade. Dentes e olhos não são identificados. Em um indivíduo pode-se identificar claramente o estômago, trato intestinal, anus e alguns órgãos de excreção de urina” (Wöhler (anonymous), 1839). Assim foram descritas as primeiras leveduras visualizadas em microscópio. Tão importantes, porém nem sempre notadas, estes fungos unicelulares são essenciais para a fabricação de inúmeras comidas e bebidas fermentadas, dentre elas, a cerveja.

Como citado anteriormente, o processo de fermentação alcoólica foi considerado “mágica divina”(Morado 2009). Depois de “magia”, a fermentação alcoólica foi descrita como processo puramente químico, explicada como uma reação química espontânea promovida pelo contato entre o mosto e o ar, onde a levedura era considerada um mero subproduto (Schlenk 1985). Foi apenas em meados de 1800 que este processo foi relacionado às leveduras, graças aos

estudos de Pasteur (Barnett & Euge 2000). A descoberta destes seres microscópicos e seu papel na fermentação alcoólica resultou em inúmeros avanços na fabricação da cerveja e vinho, que impulsionaram o desenvolvimento da pesquisa científica naquela época. As pesquisas começaram a agregar profissionais multidisciplinares, e o casamento entre as áreas de química e biologia permitiu a exploração da atividade metabólica celular, dando origem a um dos ramos mais importantes da ciência: a bioquímica (Schlenk 1985)

Desde sua descoberta, a levedura tornou-se alvo de inúmeros estudos que contribuíram para o processo científico no geral, auxiliando a elucidar variados processos bioquímicos e metabólicos das células eucarióticas. Atualmente, temos amplo conhecimento do metabolismo e genoma das leveduras, e a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é comumente usada como modelo de célula eucariótica em diversos estudos biológicos justamente por ser um organismo simples com aspectos genéticos bem estabelecidos (Sherman et al. 2002).

A estrutura da levedura é definida pela presença de uma parede celular, citoplasma, vacúolo, núcleo e organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Figura 1).

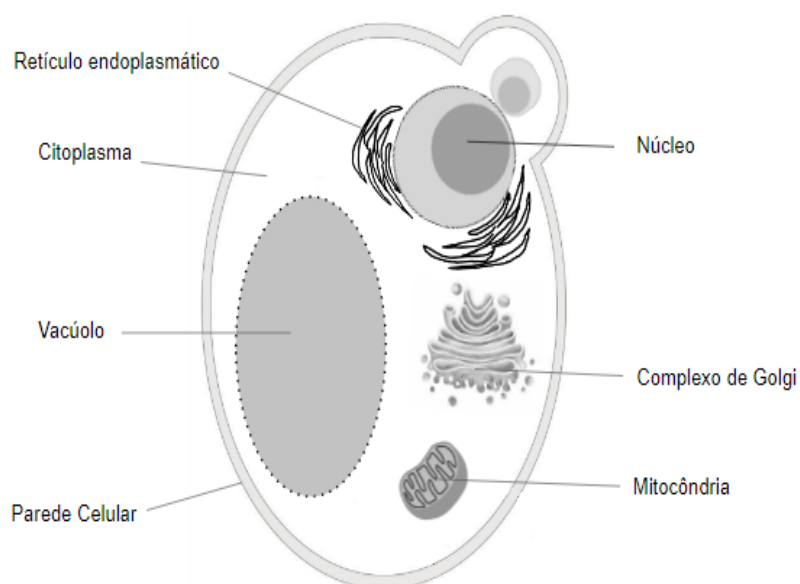


Figura 1: Representação da estrutura celular simplificada da levedura *Saccharomyces*

A

reprodução assexuada (mitose) das leveduras se dá por brotamento e, mais raramente, de maneira sexuada através da produção de esporos (meiose) (Brand & Bento 2006). A seleção artificial das leveduras fez com que estas perdessem a

capacidade de esporular, garantindo a constância das características de interesse das cepas por meio da diminuição da variabilidade genética ao longo das gerações (White & Zainasheff 2010; Sicard & Legras 2011).

Curiosamente, os cervejeiros selecionavam cepas de leveduras mesmo antes de saber de sua existência, coletando a “espuma mágica” das melhores cervejas e reaproveitando-a na próxima fermentação. É possível observar um exemplo desta seleção nas leveduras cervejeiras denominadas de *Crabtree* positivas, capazes de fermentar mesmo em condições aeróbicas, reprimindo a respiração em elevadas concentrações de açúcares e aumentando a produção de etanol (De Deken 1966).

Atualmente existem centenas de cepas de leveduras comercializadas para o uso na fabricação de cerveja. As leveduras mais comuns na indústria cervejeira são do gênero *Saccharomyces* (Brand & Bento 2006). São duas as principais espécies de leveduras cervejeiras: *S. cerevisiae*, chamadas também de leveduras Ale, e *S. pastorianus*, que parece ter evoluído de uma hibridização entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, também chamadas de leveduras Lager (Bing et al. 2014; Libkind et al. 2011). A diversidade entre estas inúmeras cepas encontradas no mercado estão associadas com a produção de diferentes compostos aromáticos, floculação, capacidade de fermentar diferentes carboidratos, temperaturas ótimas de fermentação distintas, além de diferentes tolerâncias a estresses (Boulton & Quain 2008; White & Zainasheff 2010). A partir destas características singulares de cada cepa, se escolhe a levedura mais adequada para o tipo de cerveja a ser produzido. Por exemplo, se a fabricação se trata de uma cerveja estilo *Imperial Russian Stout*, estilo com aromas e sabores que remetem a café ou chocolate amargo e de cor que varia de preto a marrom avermelhado escuro, a levedura a ser utilizada deverá ter alta tolerância a estresse osmótico, devido a alta concentração de açúcares presente neste estilo de cerveja, além de produzir compostos aromáticos que remetem a aromas e sabores típicos deste estilo.

1.4 Fermentação cervejeira

A fabricação cervejeira é um processo de múltiplos estágios que envolvem a conversão biológica de materiais *in natura* em produto final (Walker 1998). Um desses processos se trata da etapa de fermentação.

A fermentação cervejeira é simplesmente definida como a habilidade da célula de levedura em metabolizar eficientemente os constituintes do mosto (carboidratos, em sua maioria) em etanol, gás carbônico e outros subprodutos responsáveis pelos inúmeros sabores e aromas da cerveja usando o mecanismo bioquímico da fermentação (Stewart & Russell 1986).

O desempenho das leveduras durante a fermentação cervejeira é influenciado e controlado por vários fatores, dos quais estão as características genéticas da levedura, a disponibilidade de nutrientes e as condições físico-químicas do mosto (como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, entre outros) (Brand & Bento 2006).

A fermentação é dividida em três fases distintas: *lag* (adaptativa), exponencial (exp) e estacionária (Lodolo et al. 2008)(Figura 2). Cada fase é caracterizada pela densidade celular presente no mosto em células/mL e consumo de diferentes compostos do mosto (aminoácidos, açúcares, oxigênio, lipídeos, entre outros) (Boulton & Quain 2008)

Inicialmente, logo após a levedura ser inoculada no mosto, estas iniciam a fase *lag*. Este é um momento de adaptação das células ao ambiente. Nesta etapa, as células utilizam as reservas intracelulares de glicogênio e trealose para sintetizar proteínas, lipídeos de membrana e ergosterol, além de consumir nutrientes do mosto (Boulton & Quain 2008). Alguns cuidados precisam ser tomados durante esta etapa, como taxas de inóculo e temperatura. Fases lag muito curtas, caracterizadas por altas taxas de inóculo ou altas temperaturas (que aceleram a reprodução celular), podem gerar precursores de aromas indesejáveis ou também conhecidos como *off-flavors* (White & Zainasheff 2010), como por exemplo o acetolactato, produzido da síntese de valina, que sofre oxidação no mosto, dando origem à diacetila – responsável pelo desagradável aroma de manteiga na cerveja.

Na fase exponencial, as leveduras consomem a maior parte dos carboidratos do mosto, principalmente mono e dissacarídeos, como glicose, frutose, maltose e sacarose, gerando energia química para manter a mitose e produção de subprodutos da fermentação, como gás carbônico, etanol e diferentes compostos aromáticos como álcoois superiores, ésteres e compostos sulfurados (Boulton & Quain 2008).

Durante a fase estacionária, a atividade das leveduras é voltada para a reabsorção dos *off-flavors*, como diacetila e acetaldeído, equilibrando e amadurecendo o sabor da cerveja (White & Zainasheff 2010; Boulton & Quain 2008). Por fim, as leveduras floculam, cessando a etapa de fermentação na produção cervejeira.

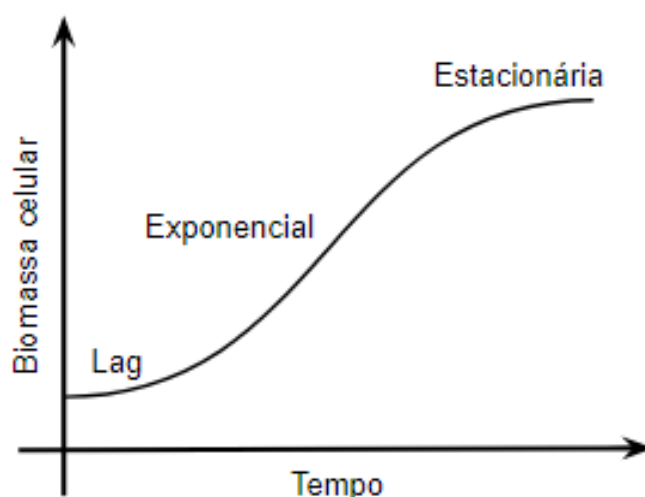


Figura 2: Curva de crescimento celular de leveduras durante o processo fermentativo, com as respectivas fases indicadas: Lag (fase adaptativa); Exponencial (fase de maior crescimento celular) e Estacionária (fase onde o crescimento celular se estabiliza)

1.5 Condições de estresse em leveduras e suas consequências na fermentação cervejeira

A levedura *S. cerevisiae* apresenta rápida resposta molecular quando exposta a condições de ambiente desfavoráveis, chamada de resposta ao estresse (Gibson et al. 2007). Quando submetida a esta condição, a levedura realiza uma “reprogramação” transcricional, ativando a expressão de genes relacionados a vias celulares responsáveis pela resposta a cada tipo de estresse: térmico, osmótico, escassez de nutrientes, pH, entre outros (Gibson et al. 2007).

A alteração do transcriptoma devido ao estresse sinaliza condições de crescimento não favoráveis para as células e acaba suprimindo o ciclo celular e a

fermentação (Gasch et al. 2000). Devido a esta reprogramação transcricional, ocorre uma alteração drástica do perfil de produção de compostos aromáticos durante a fermentação cervejeira, resultando na presença de altas concentrações de *off-flavors* e metabolização incompleta dos açúcares do mosto (White & Zainasheff 2010). Desta forma, podemos entender que uma boa cerveja depende diretamente da “saúde” da levedura usada (caracterizada por boa viabilidade e vitalidade celular). Quando pensamos em escala industrial, onde ocorre a fermentação de no mínimo 1.000 L de mosto, os cuidados com a estocagem das leveduras são extremamente importantes, pois grandes concentrações de *off-flavors* inviabilizam a comercialização do produto final, resultando em desperdício de matéria-prima e prejuízo financeiro. Portanto, a implementação de ensaios que predizem a viabilidade e vitalidade da levedura é essencial para garantir a qualidade e reprodutibilidade no processo de fabricação da cerveja.

1.6 Análises de vitalidade e viabilidade das leveduras

Um processo de fermentação otimizado exige leveduras viáveis e metabolicamente ativas. Sendo assim, os ensaios de viabilidade e vitalidade são essenciais na rotina da indústria para avaliar a qualidade do fermento.

A viabilidade, no contexto cervejeiro, é definida como a capacidade da célula de crescer e se replicar (Bendiak & Smart 2000). Dentre os ensaios mais comuns para prever a viabilidade das leveduras está o método de contagem de unidades formadoras de colônias (em inglês, CFU – *colony forming unit*). Porém, o tempo necessário para se conseguir colônias visíveis é muito longo, sendo uma técnica pouco viável de ser implementada na rotina de uma microcervejaria. Outro ensaio comum para prever a viabilidade do fermento e frequentemente aplicado na rotina das pequenas e grandes fábricas é o teste do azul de metileno, onde se estima a porcentagem de células viáveis pela ausência ou presença do corante no meio intracelular visualizado por microscópio (Sami et al. 1994). Existem ainda outros testes que se utilizam de corantes fluorescentes e citômetros de fluxo, mas que denotam o uso de reagentes e equipamentos que estão distantes da realidade financeira de uma microcervejaria.

Por outro lado, a definição da vitalidade está mais relacionada com o estado metabólico da célula viável, podendo variar de muito ativa para sem nenhuma

atividade fisiológica (Imai 1999; Bendiak & Smart 2000). No contexto microcervejeiro, o ensaio mais comum para prever a vitalidade das leveduras é o teste de acidificação do meio (poder de acidificação ou ensaio PA) (Kaka et al. 1988). Apesar de sua fácil execução, seu preparo é considerado complexo e demorado, uma vez que é necessário a lavagem das leveduras, o que exige uma centrifuga disponível. Além do método proposto por Kaka et al. (1998), há outros testes que se baseiam na avaliação de moléculas redutoras por células metabolicamente ativas (Nachlas et al. 1980), por meio de corantes a base de tetrazólio, tais como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) e XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Slater et al. 1963).

A produção de moléculas redutoras é comumente usada para avaliação da vitalidade de microrganismos devido à sua relação direta com vias metabólicas (via das pentoses, fermentação e respiração, por exemplo) (Nachlas et al. 1980). O balanço redox intracelular é resultado da atividade de enzimas chamadas de desidrogenases, responsáveis pela produção de moléculas redutoras como NADH^+ e NADPH^+ (Ying 2008). que funcionam como doadores de elétrons às moléculas do corante que possui um anel tetrazólico na sua estrutura e que altera sua cor quando reduzido. Sendo assim, quanto mais metabolicamente ativa a levedura está, maior será a produção de moléculas redutoras e, portanto, uma maior mudança colorimétrica (proporcional a vitalidade do microrganismo) será observada.

Na via fermentativa de leveduras, as desidrogenases estão presentes em inúmeras etapas como, por exemplo, na conversão de acetaldeído em acetato, produzindo moléculas redutoras como subprodutos (Figura 3). Quando sob condições de estresse, a atividade destas enzimas é suprimida, portanto, não ocorrerá produção de moléculas redutoras suficientes para se verificar alteração de cor do corante.

Embora os ensaios colorimétricos de vitalidade sejam práticos, as alterações colorimétricas não são facilmente detectadas a olho nu, sendo necessário o uso de um espectrofotômetro para quantificar a mudança colorimétrica e posterior predição da viabilidade das leveduras, inviabilizando a implementação destes ensaios em microcervejarias.

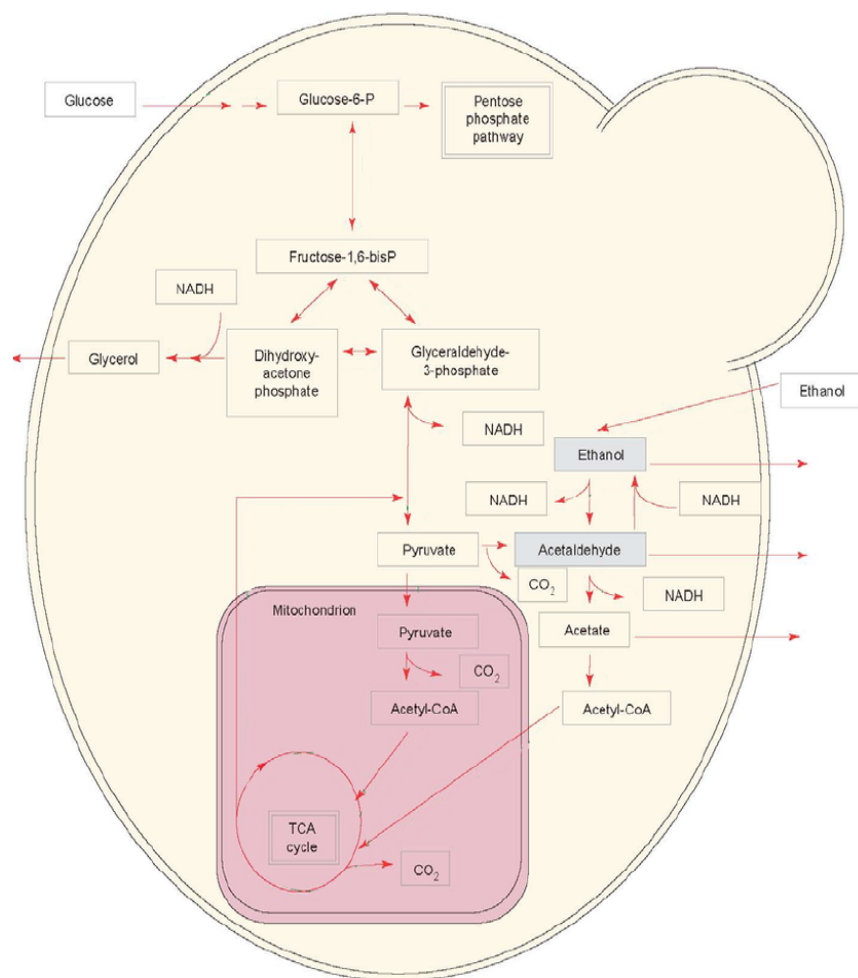


Figura 3: Resumo das vias envolvidas na assimilação de glicose e etanol sob condições aeróbicas. Alterado de (Piskur et al. 2006)

O azul de Alamar, cujo o ingrediente ativo é a resazurina (nome IUPAC: 7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona), monitora o ambiente redutor de uma célula viva. É um corante azul não-fluorescente que, quando reduzido a resorufina (Figura 4), se altera para a cor rosa altamente fluorescente. A resazurina atua como um aceptor de elétrons, podendo ser reduzido por NADPH^+ ou NADH^+ , agindo como indicador da vitalidade de microrganismos. Portanto, quanto maior a concentração de moléculas redutoras produzidas por uma célula ativa, mais o corante tenderá para a cor rosa-pink. O diferencial deste corante em relação aos previamente citados está no fato de ser altamente dicromático, possibilitando uma estimativa da vitalidade da cultura de leveduras a olho nu (Kreft & Kreft 2009), sem a necessidade do uso de um espectrofotômetro.

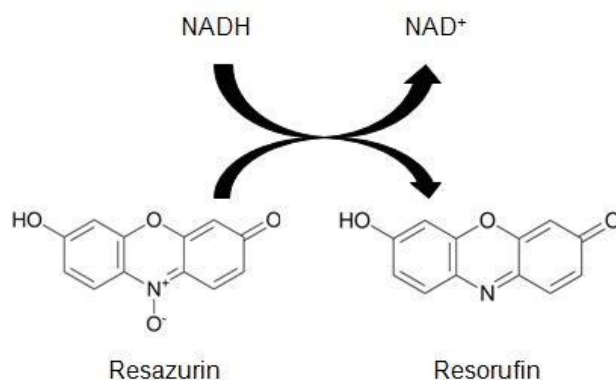


Figura 4: Fórmula molecular do corante azul de Alamar. Quando o composto se encontra na forma oxidada (esquerda), recebe o nome de resazurina; e quando na sua forma reduzida (direita) é chamado de resorufina

1.7 O contexto

No Brasil, há apenas quatro empresas que comercializam biomassa de leveduras: Bio4 (localizada no em Curitiba, PR), Levteck (localizada em Florianópolis, SC), Fermento Labs (localizada em Porto Alegre, RS) e Dr Yeast (localizada em Vitória, ES). Destas, apenas duas têm capacidade de produzir biomassa suficiente para atender microcervejarias. Visto isto, para atender o restante do país, as empresas são obrigadas a transportar seus produtos por longas distâncias até o cliente.

As leveduras são comercializadas de duas maneiras: líquidas ou secas (liofilizadas). As culturas secas passam por um processo de liofilização que remove a água intracelular de materiais biológicos congelados por sublimação. Esta técnica é capaz de “pausar” o ciclo celular, fazendo com que a célula entre em estado de quiescência, garantindo sua conservação por meses ou anos (Day & Stacey 2007; Miyamoto-Shinohara et al. 2000). A liofilização é considerada método de referência para conservação a longo prazo de microrganismos por ser bastante reprodutível e eficiente; porém, nem todas as cepas de leveduras cervejeiras são passíveis de liofilização (devido a baixa viabilidade celular que resulta desta técnica) (Ellis & Roberson 1968).

Outra forma de comercialização de leveduras é em forma líquida, por meio do armazenamento de culturas em fase estacionária em meio de cultura ou mosto. Neste caso, o metabolismo das leveduras segue ativo devido à disponibilidade de nutrientes, levando a acidificação do meio em que estão armazenadas (dentro

outros fatores moleculares) (Burtner et al. 2009), causando o que chamamos de “envelhecimento cronológico” (Fabrizio & Longo 2003), caracterizado por inúmeras mudanças fisiológicas e morfológicas na levedura, sendo um exemplo o decréscimo de vitalidade e viabilidade da cultura. Além do envelhecimento cronológico, as leveduras mantidas em meio de cultura ou mosto são mais susceptíveis a variações de temperaturas devido à maior retenção de calor em líquidos. Visto isto, a comercialização dos chamados “fermentos líquidos” tem menor tempo de validade e são mais delicados quando se trata das condições de armazenamento e transporte.

Durante o transporte, as leveduras passam por diversos estresses como, por exemplo, alterações drásticas de temperatura, e muitas vezes chegam ao seu destino com capacidade fermentativa reduzida devido as condições de estocagem não próprias (Gibson et al. 2007; Letters 2013). Nesse contexto, as microcervejarias que as recebem nem sempre dispõem de equipamentos ou conhecimento para avaliar a qualidade das leveduras.

Desta forma, este trabalho propõe validar o composto resazurina como indicador da viabilidade e vitalidade de leveduras, através da criação e padronização de um ensaio passível de ser executado em microcervejarias.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do corante resazurina (azul de Alamar) como indicador da vitalidade de culturas de leveduras cervejeiras cultivadas em laboratório.

2.2 Objetivos Específicos

- 1)** Obter correlação do número de células estimado por câmara de Neubauer e sua respectiva absorbância.
- 2)** Avaliar a concentração de resazurina capaz de diferenciar a viabilidade e vitalidade de culturas de leveduras cervejeiras que foram submetidas diferentes intensidades de estresse térmico (agudo e crônico) com mudança de cor perceptível a olho nu.

- 3) Avaliar a densidade celular necessária para diferenciar a vitalidade e viabilidade de culturas que foram submetidas diferentes intensidades de estresse térmico (agudo e crônico) com mudança de cor perceptível a olho nu.
- 4) Avaliar o tempo ideal de incubação do teste de resazurina para se obter boa sensibilidade e clara visualização da mudança colorimétrica.
- 5) Avaliar a sensibilidade do teste de resazurina usando como comparação o teste de poder de acidificação do meio.
- 6) Avaliar o potencial de predição da capacidade fermentativa do teste de resazurina em leveduras submetidas a diferentes estresses térmicos (agudo e crônico).

3. Justificativa

Visto que microcervejarias não dispõem de equipamentos ou até mão de obra qualificada para a avaliação da vitalidade das culturas usadas para a fase da fermentação da produção de cerveja, é necessário que se busquem ensaios alternativos simples e rápidos para estimar o estado metabólico da biomassa de leveduras.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cepas e culturas de leveduras

Neste trabalho foram utilizadas três cepas do gênero *Saccharomyces*: cepa W34/70 (representando a espécie *S. pastorianus* ou cepa Lager) e as cepas S-04 e US-05 (representando a espécie *S. cerevisiae* ou cepa Ale). As cepas foram adquiridas da empresa Fermentis em sua forma liofilizada. As leveduras foram hidratadas em meio de cultura YPMG líquido (3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L bacto-peptona e 10 g/L glicose) e posteriormente plaqueadas em meio YPMG sólido (de mesma composição que o YPMG líquido, adicionando-se 15 g/L de ágar bacteriológico para solidificação) e estocadas a 4 °C.

Para os ensaios deste projeto foram feitas culturas líquidas das diversas cepas em meio YPMG líquido. Para isto, as leveduras foram recuperadas tirando-se

uma amostra da cultura estocada em YPMG sólido sob refrigeração e inoculando-a em meio YPGM líquido. Para crescimento, as culturas foram mantidas sob agitação de 180 rotações por minuto (rpm) a 28 °C até atingirem a fase estacionária ($1-3 \times 10^8$ células/mL).

O número de células foi determinado através de contagem por câmara de Neubauer e ajustado conforme os experimentos.

4.2 Análise de viabilidade por azul de metileno

O número de células viáveis foi obtido pela técnica de coloração por azul de metileno (AM). A solução consiste em uma solução 0,1 M de azul de metileno misturada na proporção 1/10 com tampão glicina 0,1 M de pH 10,6 (Sami et al. 1994). Para o teste de AM, uma alíquota contendo uma concentração de células de 10^7 células/mL foi misturada na proporção 1:1 com a solução de AM alcalino. Após 15 minutos de incubação, uma amostra de 10 μ L foi analisada em câmara de Neubauer, considerando as células coradas como não-viáveis e as células não-coradas, viáveis. O percentual de células viáveis foi estimado segundo a fórmula:

$$Viabilidade() = \frac{(\sum tc - \sum cm)}{(\sum tc)} \times 100$$

Onde $\sum tc$ é o somatório do número total de células (tc) visualizado em câmara de Neubauer (contendo um número igual ou superior a 150 células) e $\sum cm$ é o somatório de células coradas com azul de metileno (consideradas não viáveis). Os testes foram feitos em triplicatas biológicas utilizando o teste t de Student para avaliar a diferença estatística, considerando valores de $p < 0,05$ como significativos.

4.3 Padronização do número de células por absorbância

Para a padronização dos testes de poder de acidificação e resazurina, foram feitas diversas correlações entre a densidade celular estimada por câmara de Neubauer em uma amostra e sua respectiva absorbância. Para isto, amostras de 1 mL de culturas em fase estacionária das cepas S-04 e W34/70 foram centrifugadas a 7.200 rpm durante 2 minutos e ressuspendidas em água destilada estéril com volume necessário para ajustar as concentrações celulares para 10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 células/mL e, por fim, lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 660 nm, 600 nm e 595 nm, usando água destilada como “branco” da amostra.

4.4 Teste do poder de acidificação

O ensaio para predizer a vitalidade da cultura de leveduras foi realizado conforme descrito por Kaka et al. (1988) com adaptações feitas por Matoulková & Sigler (2008). Para a realização do teste, uma amostra de 1 mL da cultura em fase estacionária foi retirada e sua concentração celular foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. Então, alíquota da cultura foi retirada e centrifugada a 10.000 rpm por três minutos e o precipitado celular foi lavado três vezes com água destilada estéril. Após a terceira lavagem, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em água destilada com pH ajustado para 6,3 e o pH da solução celular foi monitorado durante 10 minutos. Após este período, 1,5 mL de uma solução de glicose 50% (p/v) foi adicionada a solução e o pH foi monitorado por mais 10 minutos. O teste foi feito com 15 mL de uma suspensão celular com concentração de 5×10^7 células/mL mantida sob agitação magnética a 25 °C para evitar sedimentação das leveduras.

O poder de acidificação (PA) das células se dá pela seguinte fórmula:

$$PA = (pH_0 - pH_{10}) + (pH_{10} - pH_{20})$$

Onde pH 0 é o pH observado no início do experimento (6,3), pH 10 é o valor de pH após 10 minutos do início do experimento e pH 20 é o valor de pH observado após 10 minutos da adição de glicose. Os testes de poder de acidificação que acompanharam a padronização do teste de resazurina e o envelhecimento cronológico das culturas foram feitos em triplicatas, utilizando o teste t de Student pareadas com a condição controle (no primeiro caso) e com o terceiro dia (no segundo caso) para avaliar diferenças estatísticas, considerando valores de $p < 0,05$ como significativos.

4.5 Indução de estresse térmico agudo e crônico em culturas de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*

Para avaliação da sensibilidade do teste de resazurina, as culturas passaram por duas diferentes intensidades de estresses térmicos: estresse “agudo” (12 ou 18 horas a 39 °C) e estresse “crônico” (24 horas a 39 °C). Para isto, uma cultura de aproximadamente 500 mL foi mantida em condições adequadas de crescimento (30

°C a 180 rpm) até atingir a fase estacionária. Então, as culturas foram divididas em três grupos: (i) Controle (mantida a 30 °C), (ii) 12 ou 18 h ou estresse agudo (estresse térmico por 12 ou 18 horas) e (iii) 24 h ou estresse crônico (estresse térmico por 24 horas). Os testes de poder de acidificação e de resazurina foram feitos logo após o término do tempo de estresse.

4.6 Padronização do teste de vitalidade com resazurina

Inicialmente, foram definidas as seguintes condições: concentração da solução de resazurina, tempo de incubação e densidade celular necessária para se obter uma mudança colorimétrica detectável a olho nu capaz de diferenciar culturas de células que passaram por diferentes estresses térmicos (conforme descrito no item anterior) usando sempre a comparação com o teste-padrão que, neste caso, é o poder de acidificação do meio. Para isto, seguindo o esquema descrito na Figura 6, 0,5 mL de culturas de leveduras das cepas US-05 e W34/70, submetidas ou não ao estresse térmico (como descrito no item anterior), foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão fosfato 0,1M de pH 7,4 (Millonig 1962), tendo sua concentração ajustada para 10^7 células/mL ou 10^8 células/mL. Para avaliação da melhor concentração de resazurina, uma solução-estoque de 5 nM foi diluída para as seguintes soluções de trabalho: 2,5 nM, 1,25 nM, 1 nM e 0,5 nM. Após, incubou-se 100 µL da suspensão celular com 100 µL da solução de resazurina em placas de 96 micropoços a 30 °C (Conforme Figura 7a e 7b) e suas mudanças colorimétricas foram acompanhadas por fotos em diferentes tempos de incubação durante três horas.

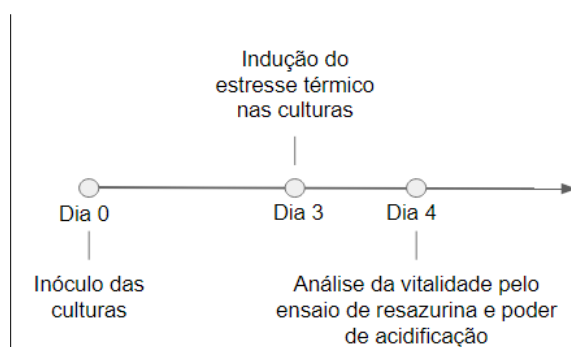


Figura 5: Desenho experimental do ensaio de resazurina.

a

Condição Controle - US-05				Estresse crônico - US-05			
2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL					I	
1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL					II	
1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL					III	
0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL					IV	

Estresse agudo - US-05

b

Estresse crônico - W34/70				Condição Controle - W34/70			
1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL				
2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	2,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL						
1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1,25 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL						
1 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	1 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL						
0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁷ células/mL	0,5 nM de resazurina 1 x 10 ⁸ células/mL						

Estresse agudo - W34/70

Figura 6: Sistema da placa de 96 poços utilizado para o teste de resazurina das culturas de leveduras US-05 (a) e W34/70 (b) submetidas a diferentes condições: estresse agudo, estresse crônico e controle. Os números I, II, III e IV correspondem a soluções de resazurina 2,5 nM, 1,25 nM, 1 nM e 0,5 nM, respectivamente.

4.7 Avaliação da vitalidade e viabilidade durante o envelhecimento cronológico de leveduras

A fim de acompanhar o decréscimo de vitalidade e viabilidade conforme a biomassa de leveduras vai entrando em senescência (Powell et al. 2003), culturas de cepas Ale e Lager foram acompanhadas durante duas semanas através dos ensaios de poder de acidificação, resazurina e azul de metileno. Para isto, as cepas W34/70 e US-05 foram propagadas em 1 L de meio YPMG líquido e mantidas sob agitação de 180 rpm até alcançarem a fase estacionária. A vitalidade e viabilidade das culturas foram analisadas a cada dois dias a partir do terceiro dia. Para o teste de resazurina, incubou-se uma solução celular de 10^8 células/mL ressuspensa em tampão fosfato com igual volume de uma solução 0,5 nM de resazurina a 30 °C durante 2 horas. Os ensaios de poder de acidificação e azul de metileno foram feitos conforme descritos anteriormente.

4.8 Teste de fermentação

A medição de densidade do mosto durante a fermentação é um indicador da taxa de atenuação da cerveja, ou seja, taxa de consumo dos açúcares fermentáveis pelas leveduras durante o processo (Boulton & Quain 2008).

Para que o teste do resazurina seja implementado na rotina de uma microcervejaria, é desejável que ele seja sensível o suficiente para diferenciar a vitalidade de uma biomassa de leveduras. Para isto, as culturas passaram por estresses térmicos de 18 e 24 horas e posteriormente sua vitalidade foi analisada pelo teste de poder de acidificação e resazurina, e sua viabilidade pela técnica de azul de metileno. Então, as leveduras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 4 minutos e inoculadas em mosto 15 °P (para cepas Ale) e 12 °P (para cepas Lager), nas concentrações de $1,25 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^7$ células/mL, respectivamente. Para melhor mimetizar o processo de fermentação que ocorre em microcervejarias, foi adicionado ao mosto extrato de iso-alfa-ácidos, onde 1,2 mL do extrato a cada 1.000 L de mosto corresponde ao aumento de 1 IBU (do inglês *International Bitter Units* ou IBUs) a fim de se obter um amargor correspondente a 25 IBUs no mosto.

As fermentações ocorreram a 10 °C para a cepa W34/70 e a 18 °C para a cepa US-05, e a atenuação aparente do mosto foi acompanhada a cada dia através de um refratômetro em escala °Brix. Para a correção e ajuste de escala para densidade específica (kg/m^3) foi utilizado o software *Brewzor Calculator* (disponível em https://play.google.com/store/apps/details?id=com.brewzor.calculator&hl=pt_BR).

5. Resultados e Discussão

5.1 Correlação da absorbância de uma amostra e sua concentração celular estimada por câmara de Neubauer

As leituras de absorbância das diferentes concentrações celulares (em células/mL) mostraram uma ótima correlação entre as cepas W34/70 e S-04 ($r^2_{595 \text{ nm}} = 0,9992$, $r^2_{600 \text{ nm}} = 0,9993$ e $r^2_{660 \text{ nm}} = 0,9991$) (Figura 7a à 7c), indicando que é confiável utilizar a densidade óptica para estimar a concentração celular em número de células/mL.

Segundo Matoulková & Sigler (2008), uma concentração de 1,35 g de leveduras em 15 mL corresponde a uma $A_{660} = 3,85$. Levando em conta os resultados obtidos neste trabalho a partir da concentração celular em células/mL estimada por câmara de Neubauer (Figura 8) e sua respectiva absorbância, e baseando-se nos resultados de Matoulková & Sigler (2008), chegou-se a uma concentração ideal de 5×10^7 células/mL para a execução do ensaio de poder de acidificação, por meio da fórmula descrita na Figura 6.

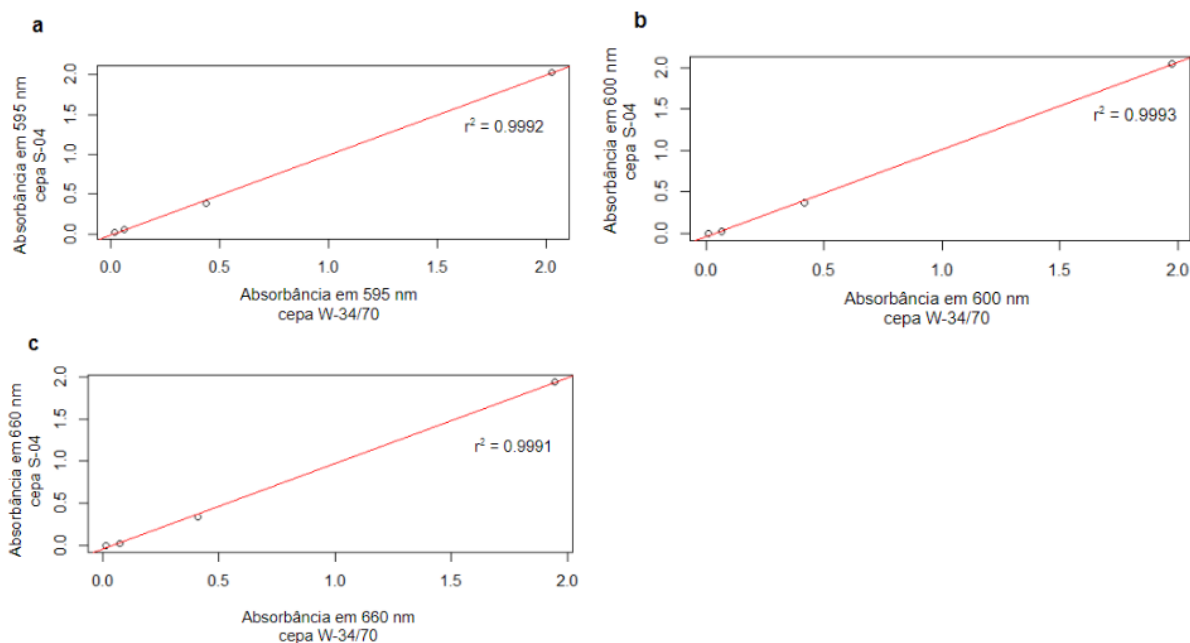


Figura 7: Correlação da densidade óptica das cepas W34/70 e US-04 em suspensões com diferentes concentrações celulares estimadas por câmara de Neubauer (em células/mL). O teste foi feito em triplicatas e a média dos valores foi usada para a correlação. Legenda: leitura em 595 nm (a), leitura em 600 nm (b) e leitura em 660 nm (c)

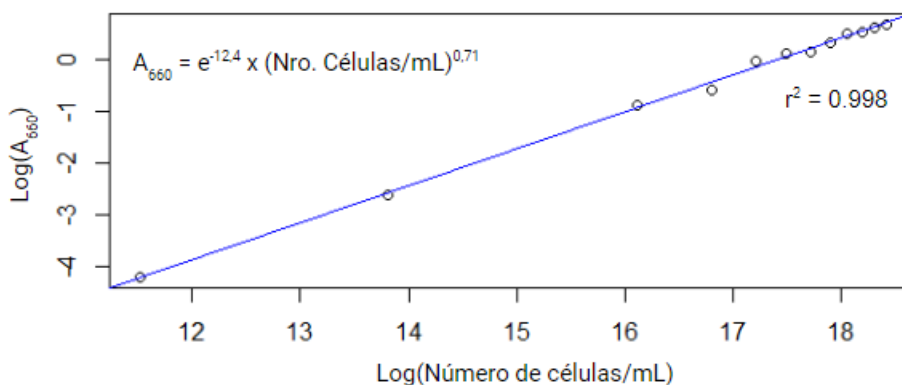


Figura 8: Curva padrão da concentração celular (em células/mL) e sua respectiva absorbância em 660 nm da cepa W34/70.

A estimativa da densidade celular em uma amostra é extremamente importante para a realização correta de inúmeros ensaios. Dentre os métodos mais utilizados para estimar a densidade celular estão: peso, absorbância e contagem em câmara de Neubauer (Woodward 1968).

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana é um dos métodos mais comuns aplicados em laboratório para estimar a concentração celular. Esta técnica se baseia no desvio que um feixe de luz de certo comprimento de onda sofre quando atinge a suspensão celular, e a percentagem de luz não desviada é medida por um sensor no aparelho. Através disto, se calcula a Densidade Óptica (D.O.) da cultura (que corresponde à absorbância da amostra), sendo a percentagem de luz absorvida proporcional a quantidade de células na amostra (Koch 2007).

Matoulková & Sigler (2008) otimizaram o ensaio de poder de acidificação correlacionando os resultados de diferentes técnicas usadas para estimar a concentração celular: peso úmido (em gramas) de leveduras ressuspendidas em água e a respectiva O.D. desta suspensão, calculando a densidade celular (em unidades de absorbância) ideal para o ensaio. Porém, a morfologia e tamanho das células influenciam na taxa de absorbância da luz, o que pode tornar esta técnica não muito segura para estimar o número de células de uma amostra, visto que estas características variam entre cepas e espécies de leveduras. Visto isto, este trabalho buscou correlacionar a densidade óptica e suas concentrações celulares estimadas por câmara de Neubauer (em número de células/mL), utilizando as cepas W34/70 e S-04 (que possuem características morfológicas diferentes), a fim de assegurar se a

leitura da absorbância da amostra é uma técnica confiável para estimar a densidade celular, determinando, assim, a concentração celular em número de células/mL ideal para o ensaio de poder de acidificação.

Os dados obtidos pela correlação da leitura da absorbância e a concentração celular estimada por câmara de Neubauer (em células/mL) das leveduras S-04 e W34/70 (Figura 7a à 7c) demonstram que as características singulares de cada cepa não influenciam na absorbância da amostra neste caso específico, sendo seguro utilizar a densidade óptica para estimar a concentração celular em número de células/mL. Este resultado é importante para unificar os dados gerados por técnicas como peso úmido e contagem por câmara de Neubauer, com os resultados obtidos por meio da absorbância da amostra, como medição da densidade celular, proporcionando uma correlação das técnicas mais usadas para estimar a concentração de células.

5.2. Padronização do teste de resazurina

Os dados obtidos pelo teste de resazurina e pelo ensaio de poder de acidificação evidenciaram as alterações metabólicas nas culturas das cepas US-05 e W34/70 submetidas a estresse crônico (Figuras 9a à 9d). O resultado do ensaio de resazurina (Figura 9b e 9d) corrobora com o resultado do teste de poder de acidificação (Figura 9a e 9c), ambos indicando decréscimo significativo da vitalidade de culturas que foram submetidas a estresse térmico crônico quando comparado com a cultura controle. Porém, não foi observado decréscimo da vitalidade em culturas submetidas a estresse agudo em ambos os testes de vitalidade (Figura 9), indicando provavelmente que o tempo de 12 horas em altas temperaturas não é suficiente para alterar o estado metabólico da célula de ambas as cepas (US-05 e W34/70).

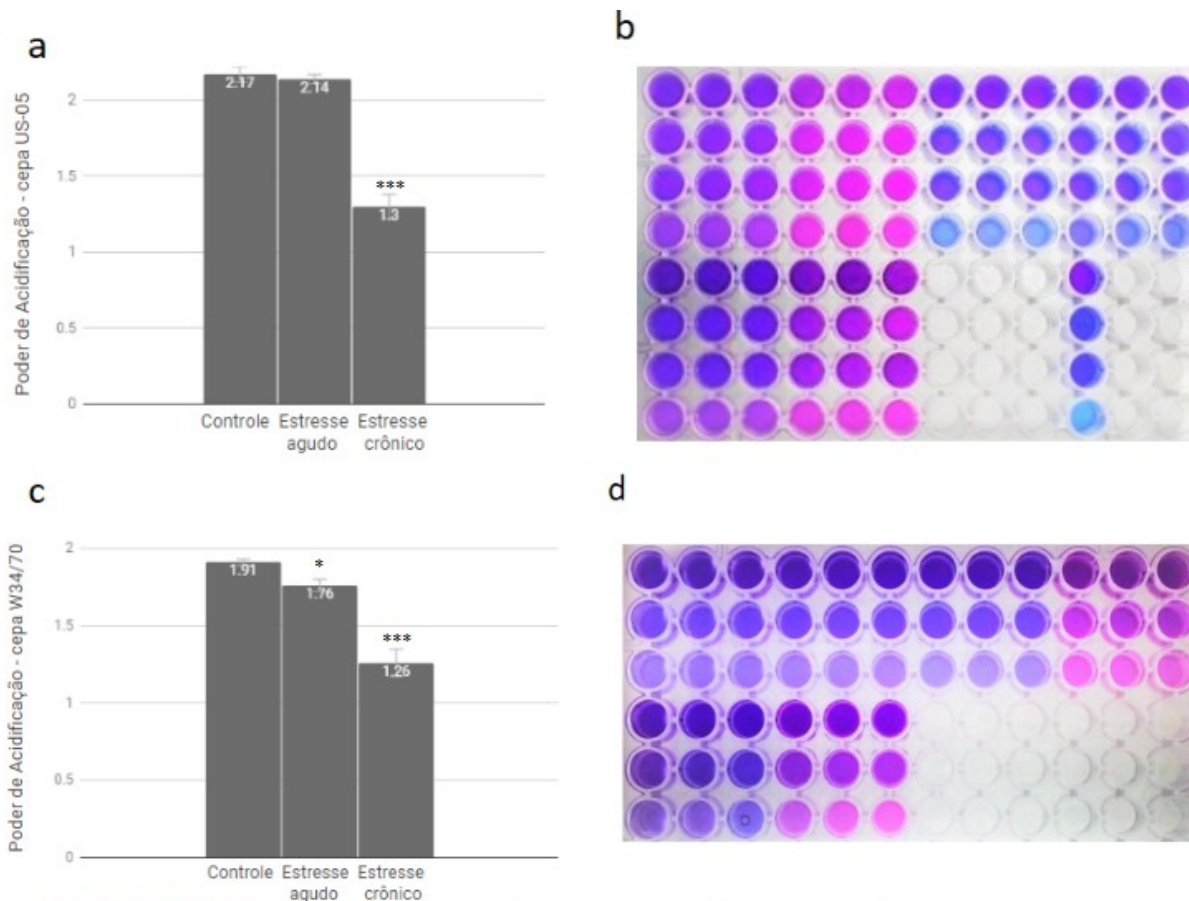


Figura 9: Testes em triplicata da vitalidade das leveduras US-05 e W34/70 submetidas a diferentes condições térmicas: Estresse agudo (12 horas a 39 °C), Estresse crônico (24 horas a 39 °C e Controle (mantida a 30 °C). Legenda: teste de poder de acidificação da cepa US-05 (a), teste de resazurina da cepa US-05 (b), teste de poder de acidificação da cepa W34/70 (c) e teste de resazurina da cepa W34/70 (d). (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$

As análises da vitalidade e viabilidade são essenciais para garantir um processo fermentativo adequado. Em um contexto microcervejeiro, a avaliação destas características deve se dar por ensaios passíveis de serem implementados em microcervejarias, ou seja, que não exijam equipamentos sofisticados e que sejam de fácil execução.

Dentre os ensaios mais comuns em microcervejarias para avaliar a vitalidade de leveduras está o teste de poder de acidificação. Durante a fermentação, as leveduras acidificam o meio através da expulsão de H^+ pela proteína de membrana

Pma1 (Sigler et al. 1983). Portanto, uma forma eficiente e rápida de avaliar a vitalidade das leveduras é mensurar a extrusão de íons H⁺ através de um pHmetro, sendo a variação do pH do meio proporcional à atividade metabólica das células (Kaka et al. 1988). Apesar da execução aparentemente fácil, o preparo deste ensaio o torna impraticável na rotina de microcervejarias brasileira devido à etapa de lavagem prévia ao ensaio, que além de demorada, exige uma centrífuga, um equipamento bastante caro no contexto microcervejeiro.

Além do método proposto por Kaka et al. (1998), há outros testes que se baseiam na avaliação de moléculas redutoras por células metabolicamente ativas (Nachlas et al. 1980), por meio de corantes a base de tetrazólio, tais como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) e XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Slater et al. 1963). Tais ensaios se baseiam na mudança colorimétrica como quantificadora da atividade metabólica. Embora práticos, estes ensaios exigem um espectrofotômetro para mensurar a alteração de cor, e, por isso, não são nem cogitados em microcervejarias.

Com o objetivo de desenvolver um novo método para avaliação da vitalidade de leveduras escolheu-se o corante azul de Alamar, cujo principal ingrediente ativo é a resazurina, por ser altamente dicromático e proporcionar uma mudança colorimétrica detectável a olho nu. Para isto, culturas das cepas W34/70 e US-05 foram mantidas em diferentes condições de estresse térmico, como descrito no item 4.6 (Figura 5). Então, foram testadas diferentes densidades celulares, concentrações de resazurina e tempo de incubação a fim de descobrir qual a combinação que melhor proporciona uma mudança colorimétrica capaz de diferenciar a vitalidade de leveduras que passaram por diferentes estresses térmicos. A avaliação da vitalidade foi feita logo após as condições de estresse e se deram pelos ensaios de resazurina e poder de acidificação, comparando a sensibilidade entre eles. Os resultados da vitalidade das culturas observados pelo ensaio de resazurina corroboraram com os resultados do teste de poder de acidificação, se mostrando tão sensível quanto.

Para o ensaio ser aplicado na rotina de microcervejarias, é desejável que este seja capaz de diferenciar leveduras com baixa vitalidade. Nesse contexto, os valores de concentração celular, concentração de resazurina e tempo de incubação que melhor evidenciaram as diferenças de vitalidade foram, respectivamente: concentração celular de 1×10^8 células/mL; uso de uma solução de trabalho de 0,5

nM de resazurina seguido de duas (02) horas de incubação a 30 °C, sendo estas variáveis mantidas para os futuros ensaios de resazurina neste trabalho.

Neste trabalho, a resazurina se mostrou como potencial ensaio de vitalidade para ser aplicado à rotina de microcervejarias pois apresentou uma ótima sensibilidade, sendo capaz de diferenciar vitalidades de leveduras que passaram por diferentes intensidades de estresse. Além de sensível, este ensaio, quando comparado com outros métodos colorimétricos, dispensa o uso de equipamentos sofisticados como espectrofotômetro devido a sua alteração de cor bastante perceptível a olho nu (Figura 9b e 9d), além de ser mais prático (e aparentemente tão sensível quanto) que o teste padrão de poder de acidificação. O resultado da concentração celular ideal para o teste se mostrou bastante interessante, visto que os fermentos líquidos são comercializados em culturas de densidade celular $1-5 \times 10^8$ células/mL, sendo o teste de resazurina facilmente adaptável para avaliar a vitalidade de culturas líquidas.

Para melhor verificação da sensibilidade do teste de resazurina, seria interessante avaliar mais variados estados metabólicos e cepas de leveduras, usando sempre a interpretação qualitativa para este ensaio, visto que se trata de uma aplicação para um contexto microcervejeiro.

5.3 Uso da resazurina para avaliação do envelhecimento cronológico

Os dados obtidos pelos ensaios de poder de acidificação, resazurina e azul de metileno mostraram decréscimo da viabilidade e vitalidade conforme as culturas vão entrando em envelhecimento cronológico (Figura 10a à 10f), sendo este processo muito mais acentuado e rápido na cepa W34/70 (Figura 10b, 10d e 10f), que demonstrou uma queda tanto na vitalidade quanto na viabilidade a partir do sétimo dia. Por outro lado, a cepa US-05 se mostrou muito mais “robusta”, sofrendo um decréscimo na vitalidade apenas a partir do 11º dia (Figura 10a e 9e) e nenhuma queda significativa foi observada na viabilidade desta cepa durante o envelhecimento cronológico (Figura 10c).

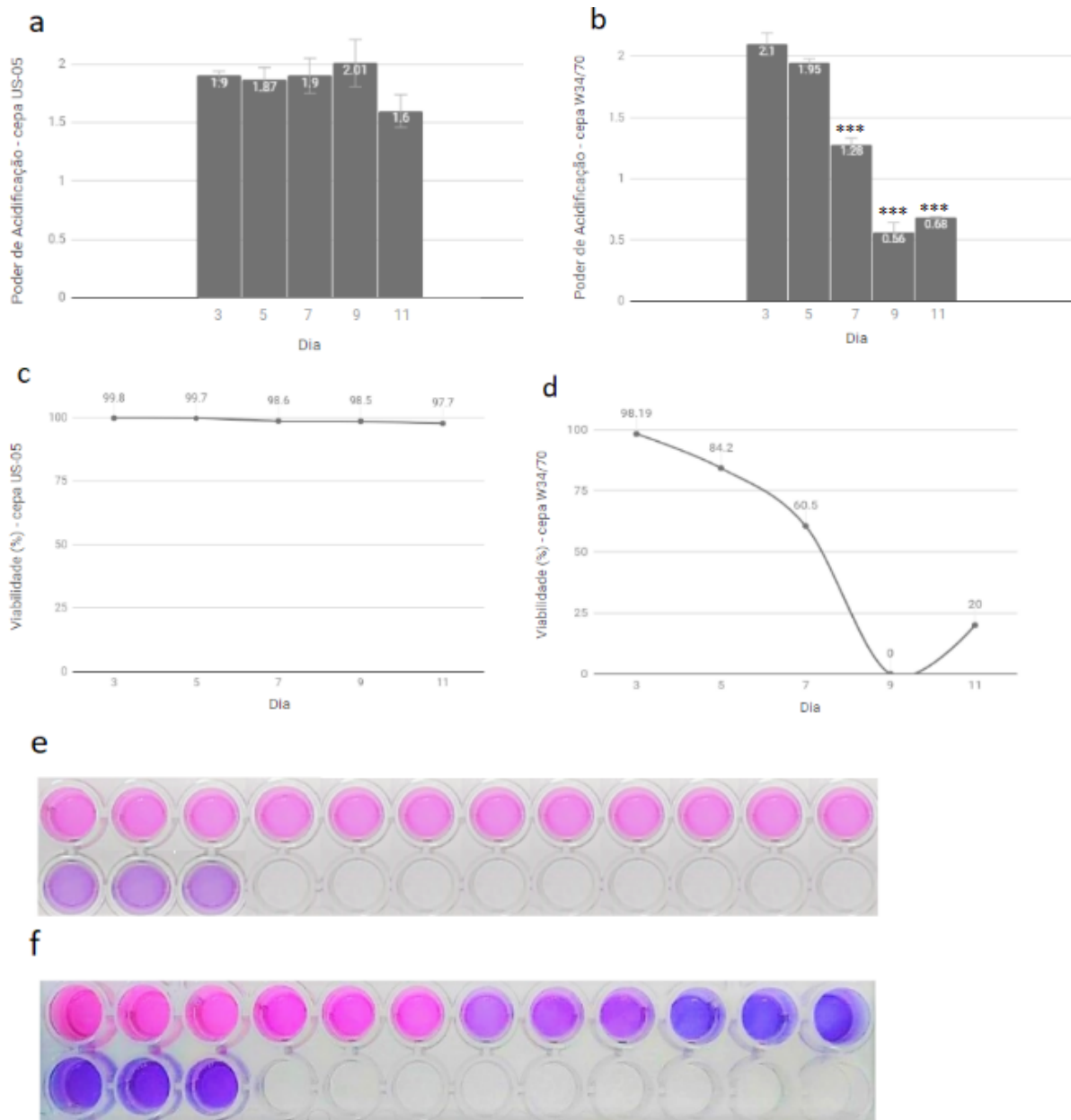


Figura 10: Análise em triplicatas da vitalidade e viabilidade de culturas das cepas US-05 e W34/70 examinado a cada dois dias, durante onze dias, pelos ensaios poder de acidificação, azul de metileno e resazurina. Legenda: vitalidade da cepa US-05 por poder de acidificação (a), vitalidade da cepa W34/70 por poder de acidificação (b), viabilidade da cepa US-05 por azul de metileno (c), viabilidade da cepa W34/70 por azul de metileno (d), vitalidade da cepa US-05 pelo teste de resazurina (e) e vitalidade da cepa W34/70 pelo teste de resazurina (f). Valores de $p < 0,001$ (***) quando comparado com o terceiro dia.

Durante a fase estacionária, ocorre a depleção dos nutrientes extracelulares, forçando a levedura a utilizar suas reservas energéticas (glicogênio e trealose) para manter os mecanismos celulares essenciais.

Sabe-se que as leveduras sofrem dois tipos de envelhecimento: replicativo e cronológico. O envelhecimento replicativo se trata do número de divisões que uma célula sofre, que é limitado (Sinclair et al. 1998). Já o envelhecimento cronológico se relaciona mais ao tempo de vida da levedura após a fase replicativa, por exemplo, uma célula-mãe que já gerou seu último broto é considerada envelhecida replicativamente, porém, esta ainda pode ter um tempo de vida cronológico longo após seu período reprodutivo, sendo considerada jovem cronologicamente.

Durante a fase estacionária da curva de crescimento, quando há depleção de nutrientes extracelulares, a levedura reduz seu metabolismo e se mantém viva utilizando suas reservas energéticas intracelulares (glicogênio e trealose) (Fabrizio & Longo 2003). Embora reduzido, o metabolismo da levedura segue ativo, fazendo com que a célula entre lentamente em um estado de envelhecimento cronológico, evidenciado por diversas mudanças moleculares e genéticas, levando a alterações morfológicas e fisiológicas (Motizuki & Tsurugi 1992) e, conseqüentemente, ao decréscimo de vitalidade, viabilidade e, posteriormente, a apoptose (Fabrizio & Longo 2003; Herker et al. 2004).

Neste trabalho, notou-se que a cultura da cepa W34/70 atingiu o estado de senescência cronológica muito antes da cepa US-05, se observando um decréscimo de vitalidade e viabilidade logo no sétimo dia, enquanto na cepa Ale (US-05) este decréscimo só foi observado no 11º dia e de maneira mais sutil (Figura 10a à 10f). Esta diferença de tempo de vida cronológico provavelmente se dá pelas diferenças genéticas entre as cepas ainda não explicadas pela literatura.

No contexto brasileiro, o envelhecimento cronológico das culturas é de importante controle quando se trata da comercialização de leveduras, pois, levando em conta as inúmeras alterações que este fenômeno causa às células, a compra de culturas envelhecidas por parte do cliente pode causar grandes prejuízos financeiros, visto que a “idade” da levedura influencia na capacidade fermentativa desta, além das características sensoriais da cerveja serem intimamente dependentes da integridade fisiológica e replicativa da levedura. Pensando nisto, este trabalho acompanhou o envelhecimento cronológico de culturas em fase estacionária através de ensaios de vitalidade e viabilidade, buscando desenvolver um ensaio a base de resazurina sensível o suficiente para acompanhar o decaimento da vitalidade de leveduras em estado de senescência cronológica.

O ensaio de resazurina se mostrou bastante promissor, mostrando mudanças colorimétricas condizentes com o decréscimo de vitalidade observado pelo ensaio padrão (poder de acidificação). Para melhor avaliar a senescência cronológica de leveduras pelo ensaio de resazurina, é desejável que se acompanhe as culturas por um período mais longo tendo, assim, o panorama completo da vida cronológica das células.

5.4 Estresse térmico e sua consequência na fermentação

Os dados da atenuação aparente obtidos por refratômetro demonstram que o estresse térmico agudo e crônico afeta a capacidade fermentativa de cada cepa de maneira diferente (Figura 11a e 11b). Enquanto o estresse agudo não alterou a taxa de atenuação do mosto em cepas US-05 (Figura 11b), este teve um impacto negativo na fermentação da cepa W34/70, que apresentou uma maior fase *lag* quando comparado a condição controle (Figura 11a). Porém, as culturas submetidas a estresse crônico de ambas as cepas (US-05 e W34/70) demonstraram fermentações mais lentas, com estendida fase *lag* (Figura 11a e 11b).

Os dados obtidos por meio do ensaio de poder de acidificação e resazurina concordam com os resultados da taxa de atenuação, evidenciando o decréscimo de vitalidade (Figura 12a à 12f) em fermentações ditas como lentas, que tiveram uma maior fase *lag*. Enquanto o estresse agudo não altera a vitalidade nem viabilidade de leveduras US-05, este teve um impacto negativo na vitalidade e viabilidade de leveduras W34/70. Por outro lado, o estresse crônico pareceu afetar a vitalidade de ambas as cepas, porém, somente a viabilidade da cepa Lager sofreu decréscimo, enquanto a viabilidade da cepa Ale parece não ter sofrido alterações.

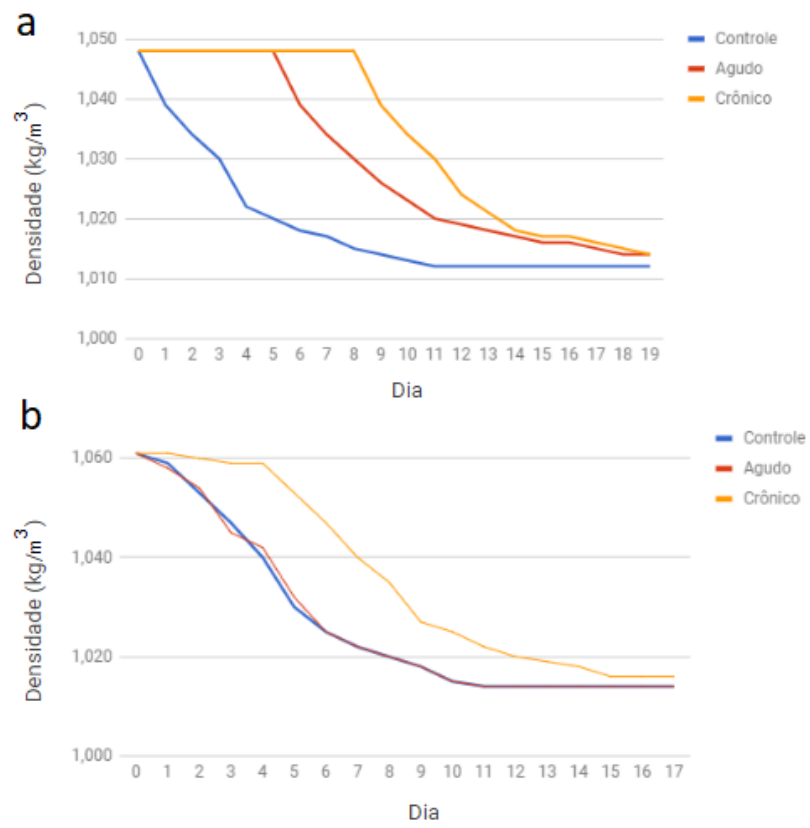


Figura 11: Atenuação das cepas W34/70 (a) e US-05 (b) submetidas a estresse térmico crônico, estresse térmico agudo e condição controle.

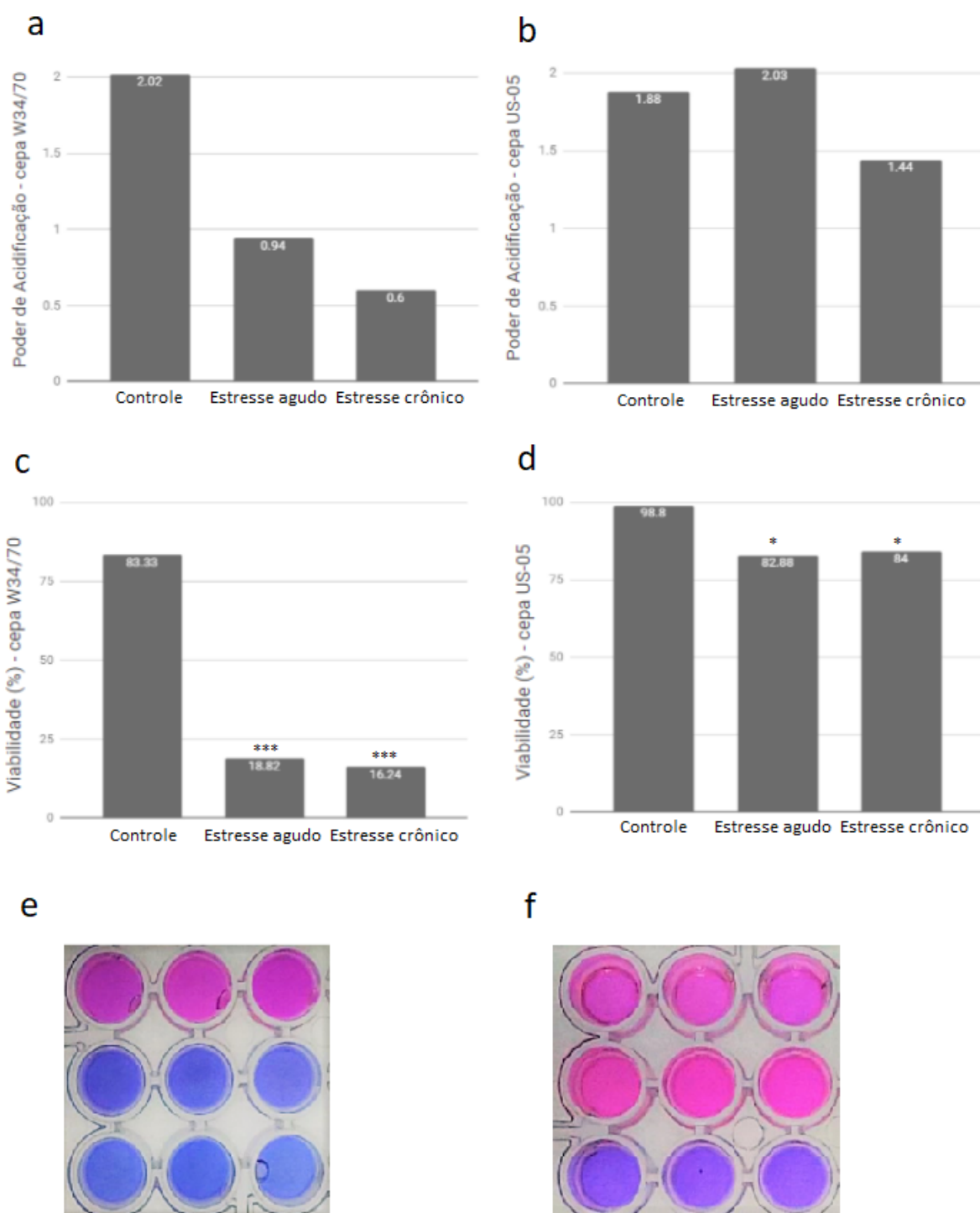


Figura 12: Análise da vitalidade e vitalidade das cepas US-05 e W34/70 submetidas a diferentes intensidades de estresse térmico prévio a inoculação no mosto. Legenda: vitalidade da cepa W34/70 por poder de acidificação (a), vitalidade da cepa US-05 por poder de acidificação (b), viabilidade da cepa W34/70 (c), viabilidade da cepa US-05 (d), vitalidade da cepa W34/70 pelo ensaio de resazurina (e), vitalidade da cepa US-05 pelo ensaio de resazurina (f). Valores de $p < 0,001$ (***) e $p < 0,05$ (*) quando comparado com controle..

Além do envelhecimento cronológico, as leveduras líquidas comercializadas também estão sujeitas a diversas condições desfavoráveis como, por exemplo, estresse térmico devido à falta de controle da temperatura durante o transporte destas. Devido a isto, as leveduras muitas vezes chegam ao seu destino com baixa capacidade fermentativa, devido ao decréscimo de viabilidade e vitalidade causado pelo estresse térmico durante o transporte.

Sabe-se que, durante condições de estresse, as células exibem uma resposta adaptativa rápida, realizando uma espécie de “reprogramação” molecular (Gasch et al. 2000), que permite que estas sobrevivam mesmo em condições desfavoráveis. O genoma das leveduras contém diversas sequências responsivas ao estresse. Visto isso, inúmeras vias metabólicas são alteradas durante estas condições, sendo um exemplo, a via fermentativa. Quando as leveduras são expostas a temperaturas acima da sua faixa ideal (25-30 °C) estas sofrem o que chamamos de “estresse térmico”. Esta condição pode gerar inúmeros efeitos na célula: desnaturação de proteínas, brotamento atípico, ciclo celular mantido na fase G1, aumento da fluidez da membrana plasmática e conseqüente redução da permeabilidade de nutrientes, redução do pH intracelular, dentre outros (Letters 2013). Além destas alterações físicas ocorridas na célula, mudanças moleculares também ocorrem, como a expressão das chamadas proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock proteins* ou HSPs), que auxiliam na adaptação das células ao estresse (McAlister & Finkelstein 1980), e dos fatores transcricionais Msn2p e Msn4p, responsáveis pela sinalização do estresse (Marchler et al. 1996). Devido a todos estes fenômenos que a célula de levedura sofre quando exposta a altas temperaturas, sua capacidade replicativa e atividade metabólica também sofrem alterações, influenciando, assim, na habilidade fermentativa da levedura.

Este trabalho buscou avaliar o efeito do estresse térmico na taxa de atenuação do mosto, buscando desenvolver um ensaio capaz de prever a atividade fermentativa da levedura. Para isto, leveduras das cepas US-05 e W34/70 foram submetidas a diferentes intensidades de estresse térmico e tiveram sua vitalidade e viabilidade avaliadas logo antes de serem inoculadas em mosto.

Os resultados mostraram que as culturas que apresentaram uma coloração mais rosada no teste de resazurina demonstraram uma taxa de atenuação bastante satisfatória, evidenciando uma melhor vitalidade, confirmada pelo teste de poder de

acidificação (Figura 12). Também foi observada uma maior tolerância ao estresse térmico das leveduras Ale (US-05), visto que a alta temperatura afetou mais a viabilidade, vitalidade e taxa de atenuação da cepa Lager (W34/70) quando comparado a cepa Ale. Isto deve ser explicado devido às diferenças genéticas de cada cepa, sendo a W34/70 mais adaptada ao frio (Cardinali & Martini 1994), e provavelmente tendo uma resposta molecular mais sensível ao estresse térmico.

Independente da cepa e de sua tolerância ao estresse, o teste de resazurina se mostrou bastante promissor para prever a capacidade fermentativa de leveduras, sendo muito interessante sua implementação em microcervejarias.

6. Conclusão

Este trabalho demonstrou que o teste de resazurina possui um alto potencial para ser aplicado na avaliação da vitalidade de leveduras em microcervejarias. Neste estudo, o ensaio foi desenvolvido e padronizado com sucesso, se mostrando capaz de detectar diferentes vitalidades de leveduras que foram submetidas a senescência cronológica e variados estresses térmicos, se mostrando tão sensível quanto o método padrão que, neste caso, é o poder de acidificação. Além disso, o teste de resazurina se mostrou bastante satisfatório em sua habilidade de prever a capacidade fermentativa das leveduras, característica de bastante interesse no contexto microcervejeiro, e, devido a isto, demonstrando potencial de futura comercialização. Contudo, para melhor avaliar a sensibilidade deste ensaio, seria necessária a análise de variadas cepas de leveduras e intensidades ou tipos de estresse. Além disso, seria interessante aprofundar os dados obtidos através de análises transcricionais comparativas entre cepas Ale e Lager, buscando explicar as diferenças de tolerância ao estresse térmico e senescência observadas neste trabalho.

7. Referências

- Aquarone, E. et al., 2001. *Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*, Edgard Blucher.
- Barnett, J.A. & Euge, P., 2000. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries , 1850 ± 1880. , pp.755–771.

- Bendiak, D. & Smart, K., 2000. Review of metabolic activity tests and their ability to predict fermentation performance. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, pp.34–43.
- Bing, J. et al., 2014. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Current biology*, 24(10), pp.R380–R381.
- Børsting, C. et al., 1997. *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional genes encoding the Acyl-CoA binding protein, one similar to the ACB 1 gene from *S. cerevisiae* and one identical to the ACB 1 gene from *S. monacensis*. *Yeast*, 13(15), pp.1409–1421.
- Boulton, C. & Quain, D., 2008. *Brewing yeast and fermentation*, John Wiley & Sons.
- Brand, G. & Bento, C.V., 2006. ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 1º PARTE – AS LEVEDURAS.
- Burtner, C.R. et al., 2009. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 8(8), pp.1256–1270. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.8.8.8287>.
- Cardinali, G. & Martini, A., 1994. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), pp.791–797.
- Childe, V.G., 2014. *New light on the most ancient East*, Routledge.
- Darby, W.J., Ghalioungui, P. & Grivetti, L., 1977. Food: the gift of Osiris-v. 1-2.
- Day, J.G. & Stacey, G., 2007. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, Springer Science & Business Media.
- De Deken, R.H., 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44(2), pp.149–156.
- Ellis, J.J. & Roberson, J.A., 1968. Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. *Mycologia*, pp.399–405.
- Fabrizio, P. & Longo, V.D., 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging cell*, 2(2), pp.73–81.
- Fagan, B.M. & Beck, C., 1996. *The Oxford companion to archaeology*, Oxford Companions.
- Fujii, T. et al., 1996. Nucleotide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Genes from Lager Brewing Yeast, *Saccharomyces*. *Yeast*, 12, pp.593–598.
- Gasch, A.P. et al., 2000. Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes P. A. Silver, ed. *Molecular Biology of the Cell*,

11(12), pp.4241–4257. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15070/>.

Gibson, B.R. et al., 2007. *Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling*,

Hansen, E.C., 1886. *Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques: Méthodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues*,

Hansen, J. & Kielland-Brandt, M.C., 1994. Saccharomyces carlsbergensis contains two functional MET2 alleles similar to homologues from S. cerevisiae and S. monacensis. *Gene*, 140(1), pp.33–40.

Herker, E. et al., 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 164(4), p.501 LP-507. Available at:
<http://jcb.rupress.org/content/164/4/501.abstract>.

Hornsey, I.S., 2007. *A history of beer and brewing*, Royal Society of Chemistry.

Imai, T., 1999. The assessment of yeast vitality—the past and the future. *Brew Guardian*, 128, pp.20–27.

Kaka, B.B. V, Simpson, W.J. & Hammond, J.R.M., 1988. Prediction of the Fermentation Performance of Brewing Yeast with the Acidification Power Test. , 94, pp.153–158.

Koch, A.L., 2007. Growth measurement. In *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition*. American Society of Microbiology, pp. 172–199.

Kreft, S. & Kreft, M., 2009. Quantification of dichromatism: a characteristic of color in transparent materials. *JOSA A*, 26(7), pp.1576–1581.

Letters, R.B., 2013. Overview on Brewing Yeast Stress Factors. , 18(5), pp.8559–8572.

Libkind, D. et al., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), pp.14539–14544.

Lodolo, E.J. et al., 2008. The yeast Saccharomyces cerevisiae—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7), pp.1018–1036.

Marchler, G., Schuller, C. & Ruis, H., 1996. The Saccharomyces cerevisiae zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). , 15(9), pp.2227–2235.

- McAlister, L. & Finkelstein, D.B., 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 93(3), pp.819–824.
- Millonig, G., 1962. Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. In *Electron microscopy*. Elsevier, p. P-8.
- Miyamoto-Shinohara, Y. et al., 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41(3), pp.251–255.
- Morado, R., 2009. *Larousse de cerveja*, Larousse do Brasil.
- Motizuki, M. & Tsurugi, K., 1992. The effect of aging on protein synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mechanisms of ageing and development*, 64(3), pp.235–245.
- Nachlas, M.M., Margulies, S.I. & Seligman, A.M., 1980. Sites of Electron Transfer to Tetrazolium Salts in the Succinoxidase System. , 235(9).
- Olesen, K. et al., 2002. The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. *FEMS yeast research*, 2(4), pp.563–573.
- Piskur, J. et al., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics*, 22(4), pp.183–186.
- Powell, C.D., Quain, D.E. & Smart, K.A., 2003. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance , attenuation and £ oculation. , 3, pp.2–3.
- Rabin, D. & Forget, C., 2014. *Dictionary of Beer and Brewing*, Routledge.
- Sami, M., Ikeda, M. & Yabuuchi, A.S., 1994. Evaluation of the Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination. , 78(3), pp.212–216.
- Samuel, D., 1996. Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science*, 273(5274), p.488.
- Schlenk, F., 1997. Early Research on Fermentation—A Story of Missed Opportunities. *Cornish-Bowden (ed.)*, pp.43–50.
- Schlenk, F., 1985. Early research on fermentation—a story of missed opportunities. *Trends in Biochemical Sciences*, 10(6), pp.252–254.
- Sherman, B.F., Sherman, M.F. & Enzymol, M., 2002. Getting Started with Yeast. , 41(2002), pp.3–41.
- Sicard, D. & Legras, J., 2011. Comptes Rendus Biologies Bread , beer and wine : Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex ` re et vin :

- domestication des levures du complexe d ' espe. *Comptes rendus - Biologies*, 334(3), pp.229–236. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.016>.
- Sigler, K., Pascual, C. & Romay, C., 1983. Intracellular control of proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia microbiologica*, 28(5), pp.363–370.
- Sinclair, D., Mills, K. & Guarente, L., 1998. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), pp.533–560.
- Slater, T.F., Sawyer, B. & Sträuli, U., 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77(Supplement C), pp.383–393. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006300263905134>.
- Stewart, G.G. & Russell, I., 1986. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(6), pp.537–558.
- Tamai, Y. et al., 1998. Co-existence of two types of chromosomes in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*, 14(10), pp.923–933.
- Walker, G.M., 1998. *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons.
- Walther, A., Hesselbart, A. & Wendland, J., 2014. Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World ' s First Pure Culture Lager Yeast. , 4(May), pp.783–793.
- White, C. & Zainasheff, J., 2010. *Yeast: the practical guide to beer fermentation*, Brewers Publications.
- Wöhler (anonymous), 1839. *Demystified secret of alcoholic fermentation*.
- Woodward, J.D., 1968. Istitute of brewing analysis committee measurement of yeast concentration. , 74, pp.427–429.
- Yamagishi, H. & Ogata, T., 1999. Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Systematic and applied microbiology*, 22(3), pp.341–353.
- Ying, W., 2008. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*, 10(2), pp.179–206.