

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS
COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

FERNANDA OTESBELGUE PINTO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente da Silva
Coorientadora: Dr^a. Sandra Denise Camargo Mendes

Porto Alegre
Março/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS
COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Fernanda Otesbelgue Pinto
Biotecnologista/UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente da Silva
Coorientadora: Dr^a. Sandra Denise Camargo Mendes

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Março/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pinto, Fernanda Otesbelgue
Isolamento, seleção e caracterização de leveduras selvagens com potencial para a produção de cerveja /
Fernanda Otesbelgue Pinto. -- 2018.
95 f.
Orientador: Patrícia Valente da Silva da Silva.

Coorientador: Sandra Denise Mendes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Cerveja. 2. Levedura. I. da Silva, Patrícia Valente da Silva, orient. II. Mendes, Sandra Denise, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Para chegar aonde ninguém chegou, é
preciso fazer coisas que ninguém fez.”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela incrível oportunidade de obter o título de Mestre, através de um ensino de excelência.

À minha orientadora Patrícia Valente da Silva, pela oportunidade de ser sua aluna e de desenvolver este projeto. Obrigada pela confiança e pela ajuda. À minha coorientadora Sandra Denise Camargo Mendes sempre muito atenciosa, obrigada por todo apoio. Ao Professor Marco Antonio Zachia Ayub pelo auxílio e por abrir as portas de seu laboratório. Aos professores do PPGMAA pelos ensinamentos e pela dedicação.

Aos colegas Thaís Lopes, Audren Monteiro, Renata Ott, Carina Timotheo, Gabriele Gross, Fernanda Fraga, Mariana Fensterseifer Fabrício e Maurício Ramirez em especial, pela ajuda na realização deste trabalho. Aos demais colegas do laboratório de micologia e à Professora Maria Lúcia Scroferneker, que se encarregaram de fazer esta caminhada mais leve e alegre, muito obrigada!

À minha família e amigos. Obrigada pelo apoio e carinho de sempre!

Ao Wilson Oliveira Dias, por sempre apoiar meus sonhos, compreender a minha ausência e segurar as pontas quando foi preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

Aos demais, que de alguma forma contribuíram com este trabalho, deixo minha gratidão.

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

Autor: Fernanda Otesbelgue Pinto

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Denise Camargo

RESUMO

As leveduras utilizadas na produção de cerveja são principalmente do gênero *Saccharomyces*. Porém, com o advento do crescimento das microcervejarias, em especial no Brasil, outras espécies e linhagens de leveduras têm se mostrado interessantes, demonstrando potencial em contribuir com o sabor, o perfil aromático da cerveja e as novas exigências do consumidor. Apesar disso, poucos estudos investigam o isolamento de novas leveduras para a produção de cerveja. O objetivo deste estudo foi o isolamento, seleção e caracterização de linhagens de leveduras selvagens com potencial para a produção de cerveja. As leveduras foram isoladas a partir de cinco frutos e selecionadas através de testes de exclusão para fermentação de açúcares, produção de H₂S, tolerância ao estresse osmótico e por etanol. O total de 92 isolados foi obtido, resultando em 13 leveduras selecionadas pelos testes de exclusão. As leveduras selecionadas foram identificadas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 (LSU rDNA) ou da região ITS1-5.8S-ITS2 e caracterizadas por testes bioquímicos e morfológicos, análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa, análise do perfil de floculação, crescimento em diferentes temperaturas e em etanol, velocidade de fermentação, atenuação aparente e açúcar redutor. A produção de toxina *killer* foi testada para a avaliação de uma futura cultura mista entre CB341 e uma levedura comercial. Por fim, foi realizada a produção de cerveja, seguida pela análise sensorial descritiva realizada por nove avaliadores treinados. Foram identificadas três diferentes espécies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kurtzmaniella sp. nov.*). As leveduras CL011, PB111, PB113, PA511 (*S. cerevisiae*) e CB341 (*W. anomalus*) apresentaram os perfis aromáticos mais interessantes e foram escolhidas para a produção de cerveja. Os resultados deste estudo demonstraram potencial para utilização dos isolados na produção de cerveja.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93p.) Março, 2018.

ISOLATION, SELECTION AND CHARACTERIZATION OF WILD YEASTS WITH POTENTIAL FOR BREWING

Author: Fernanda Otesbelgue Pinto

Advisor: Prof. Dr. Patrícia Valente

Co-Advisor: Prof. Dr. Sandra Denise Camargo

ABSTRACT

Yeasts used in the production of beer belong to the genus *Saccharomyces*. However, with the flourishing of the microbreweries, especially in Brazil, other species and strains have proved interesting, demonstrating potential for contributing to the flavor, the aromatic profile of the beer and the new demands of the consumer. Although, few studies investigate the isolation of new yeasts for brewing. The aim of this study was the isolation, selection and characterization of wild strains of yeasts for brewing. Yeasts were isolated from five different fruits and selected from exclusion tests for carbohydrate fermentation, H₂S production, tolerance to osmotic and ethanol stress. A total of 92 isolates were obtained, resulting in 13 yeasts selected. Yeasts selected were identified by sequencing the D1/D2 domain (LSU rDNA) or ITS1-5.8S-ITS2 region and characterized by biochemical and morphological tests, volatile compound analysis by gas chromatography, flocculation profile, growth at different temperatures and in ethanol, fermentation velocity, apparent attenuation and reducing sugar. The production of killer toxin was tested for the evaluation of a future mixed culture between CB341 and a commercial yeast. Finally, the beer production was carried out followed by sensorial analysis by nine well-trained evaluators. Three different species were identified (*Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kurtzmaniella sp. nov.*). Yeasts strains CL011, PB111, PB113, PA511 (*S. cerevisiae*) and CB341 (*W. anomalus*) showed the most interesting aromatic profiles and were chosen for brewing. Results of this study showed potential for utilization of the selected isolates in brewing.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) March, 2018.

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral.....	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	História e Origem da Cerveja	3
3.2	Processo Produtivo	5
3.3	Classificação	7
3.4	Características Genéticas e Fisiológicas das Leveduras Cervejeiras .	8
3.4.1	Leveduras Cervejeiras.....	8
3.4.2	Utilização de Carboidratos.....	9
3.4.3	Tolerância a Diferentes Tipos de Estresse	9
3.4.4	Compostos Aromáticos e <i>Off Flavors</i>	9
3.4.5	Floculação	12
3.4.6	Reprodução e Genoma	13
3.5	Bioquímica da Cerveja	13
3.6	Isolamento de Leveduras Selvagens para a Produção de Cerveja ...	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Isolamento das Leveduras.....	16
4.2	Linhagens Controle	16
4.3	Preparo do Inóculo	16
4.4	Seleção das Leveduras por Testes de Exclusão.....	16
4.4.1	Avaliação da Fermentação de Fontes de Carboidratos.....	17
4.4.2	Análise da Produção de H ₂ S	17
4.4.3	Tolerância ao Estresse Osmótico do Mosto	17
4.4.4	Tolerância ao Estresse por Etanol.....	18
4.5	Caracterização Fenotípica e Bioquímica	18
4.5.1	Testes Morfológicos	18
4.5.2	Testes de Assimilação de Fontes de Carbono	19
4.5.3	Testes de Assimilação de Fontes de Nitrogênio.....	19
4.5.4	Teste de Crescimento em NaCl.....	19
4.5.5	Teste de Crescimento em Ciclohexamida	19
4.6	Identificação Molecular	20

4.6.1	Extração de DNA Genômico.....	20
4.6.2	Amplificação de DNA Genômico	20
4.6.3	Sequenciamento.....	21
4.7	Análise dos Compostos Voláteis	21
4.7.1	Preparo da Amostra	22
4.7.2	Análises Quantitativas	22
4.7.3	Cálculo da Atividade Olfativa (OAV)	22
4.8	Caracterização das Leveduras para a Produção de Cerveja	22
4.8.1	Análise do Perfil de Flocculação	22
4.8.2	Crescimento em Diferentes Temperaturas.....	24
4.8.3	Teste de Crescimento na Presença de Etanol	24
4.8.4	Teste de Fermentação em Mosto Cervejeiro.....	24
4.8.4.1	Atenuação Aparente e ABV Estimado	24
4.8.4.2	Velocidade de Fermentação.....	25
4.8.4.3	Açúcar Redutor.....	25
4.8.5	Produção de Toxina <i>Killer</i>	25
4.9	Produção de Cerveja	26
4.10	Análise do Teor de Etanol	26
4.11	Análise Sensorial.....	26
4.12	Análise Estatística	27
5.	RESULTADOS	28
5.1	Isolamento de Leveduras de Frutos	28
5.2	Seleção de Leveduras por Testes de Exclusão.....	28
5.3	Testes Morfológicos e Sequenciamento.....	30
5.4	Análise dos Compostos Voláteis	33
5.5	Caracterização das Leveduras Seleccionadas.....	37
5.5.1	Perfil de Flocculação	37
5.5.2	Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas	40
5.5.3	Teste de Crescimento na Presença de Etanol	43
5.5.4	Teste de Fermentação em Mosto Cervejeiro.....	44
5.5.5	Produção de Toxina <i>Killer</i>	45
5.6	Produção de Cerveja	46
5.7	Análise Sensorial.....	47

6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	60
8.	PERSPECTIVAS	60
9.	REFERÊNCIAS	61
10.	APÊNDICES	72

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Isolamento de Leveduras a partir de Diferentes Frutos.....	28
Tabela 2. Morfologia Colonial das Leveduras Isoladas.....	31
Tabela 3. Morfologia Celular e Sequenciamento Molecular.....	31
Tabela 4. Assimilação de Fontes de Carbono.....	32
Tabela 5. Assimilação de Fontes de Nitrogênio.....	32
Tabela 6. NaCl, Ciclohexamida e Compostos Amiloides.....	33
Tabela 7. Valor da Atividade Olfativa (OAV).....	34
Tabela 8. Perfil de Floculação.....	40
Tabela 9. Porcentagem de Crescimento em Etanol.....	43
Tabela 10. Atenuação, ABV e Açúcar Redutor.....	45
Tabela 11. Análise Sensorial.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma do Processo Produtivo de Cerveja.....	6
Figura 2. Influência do Metabolismo no <i>Flavor</i> da Cerveja.....	12
Figura 3. Fermentação Alcoólica.....	14
Figura 4. Leitura da Capacidade Fermentativa.....	29
Figura 5. Produção de H ₂ S.....	29
Figura 6. Tolerância ao Estresse Osmótico.....	29
Figura 7. <i>Heat Map</i> dos Compostos Voláteis.....	38
Figura 8. Perfil de Floclulação.....	39
Figura 9. Crescimento dos Isolados em Diferentes Temperaturas.....	41
Figura 10. Crescimento na Presença de Etanol.....	43
Figura 11. Desprendimento de CO ₂ durante a Fermentação do Mosto.....	45
Figura 12. Produção de Cerveja.....	46
Figura 13. Quantificação do Teor de Etanol.....	47
Figura 14. Análise Sensorial.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
AEC	Antes da era comum
ABV	Álcool por volume (<i>Alcohol by volume</i>)
AmBEV	Companhia de Bebidas das Americas
AATase	Álcool Acetil Transferase
ADQ	Análise descritiva quantitativa
ASBC	<i>American Society of Brewing Chemists</i>
ADLH	Álcool Desidrogenase
BJCP	Programa de certificação de juízes (<i>Beer Judge Certification Program</i>)
CG	Cromatografia Gasosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DO _{600nm}	Densidade ótica em 600nm
(DVB/CAR/PDMS)	Divinilbenzeno/ carboxeno/polidimetilsiloxano (<i>Divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDC1	(<i>ferulic acid descarboxylase</i>)
FG	Densidade Final (<i>Final Gravity</i>)
x g	Força Gravitacional
GC-FID	Cromatografia Gasosa com detector por ionização de chama (<i>Gas chromatography – flame ionization detector</i>)
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (<i>Gas chromatography/ Mass spectrometry</i>)
h	Horas
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HS-SPME	Microextração em fase sólida (<i>Headspace solid phase microextraction</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
ITS	Região espaçadora transcrita interna (<i>Internal transcribed spacer</i>)
L	Litro
M	Molar
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
MBF	Meio básico para fermentação de açúcares
OAV	Valor de atividade olfativa (<i>Odour activity value</i>)
OG	Densidade Original (<i>Original Gravity</i>)
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
p/v	Peso por volume
YM-MB	Extrato de levedura – Extrato de malte – azul de metileno (<i>Yeast extract – Malt extract – methylene blue</i>)
YCB	(<i>Yeast Carbon Base</i>)
YNB	(<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPD	Extrato de levedura, peptona, dextrose (<i>Yeast extract, peptone, dextrose</i>)
PAD1	(<i>phenylacrylic acid decarboxylase</i>)
POF	(<i>phenol off-flavor</i>)
RPM	Rotações por minuto
4-VG	4-vinilguaiaicol

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida do mundo (78,2% do consumo mundial), assim como uma das mais antigas da humanidade, evidenciando sua importância econômica, cultural e histórica (Sachs *et al.*, 2001; Garofalo *et al.*, 2015). As leveduras atualmente utilizadas na produção de cerveja foram selecionadas pelo ser humano por centenas de anos e, pela maior parte do tempo, sem o conhecimento da sua existência, dando origem às atuais linhagens industriais. A grande maioria das linhagens industriais é de origem europeia (belga, inglesa ou alemã) e apresenta características genéticas e fisiológicas distintas das leveduras presentes no ambiente, conhecidas como “leveduras selvagens” (Gallone *et al.*, 2016). A produção de cerveja é realizada com a utilização de leveduras das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (Ales), *Saccharomyces pastorianus* (Lagers) e do gênero *Brettanomyces*, menos comumente empregadas (Morado *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2014). Porém, estudos metagenômicos têm demonstrado que as linhagens industriais representam apenas uma pequena fração da biodiversidade natural de fungos existente (Liti *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Dessa maneira, diversos grupos de pesquisa têm realizado isolamentos e triagens em bancos de leveduras, demonstrando a diversidade genética e o potencial da utilização de espécies e linhagens não clássicas na indústria de bebidas alcoólicas (Pellegrine *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2005; Comitini *et al.*, 2011; Fujihara, *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2013; Tapsoba *et al.*, 2015; Figueiredo *et al.*, 2016; Gamero *et al.*, 2016; Šuranská, *et al.*, 2016), contudo poucos estudos investigam o isolamento de leveduras para a produção de cerveja. O crescente aumento das microcervejarias, variedades de estilos e marcas disponíveis no mercado tem resultado em novas exigências do consumidor, abrindo espaço para novos produtos. Dessa maneira, o isolamento de novas leveduras, abrangendo linhagens de *Saccharomyces* e *Brettanomyces*, além de outros gêneros e espécies de leveduras, tem se mostrado interessante, podendo contribuir com o sabor, o perfil aromático e a complexidade da bebida (Steensels *et al.*, 2014). O objetivo deste estudo foi o isolamento, seleção e caracterização de leveduras a partir de diferentes frutos para a obtenção de linhagens com fenótipos interessantes para a produção de cerveja, buscando explorar a biodiversidade de leveduras brasileira, até então pouco estudada para esta finalidade, e contribuindo para o desenvolvimento científico e tecnológico do setor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar, selecionar e caracterizar leveduras selvagens com fenótipos interessantes para a produção de cerveja.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar leveduras a partir da casca e polpa de diferentes frutos;
- 2.2.2 Selecionar leveduras com fenótipos desejáveis para produção de cerveja mediante os seguintes testes de exclusão:
 - 2.2.2.1 Avaliação da fermentação de fontes de carbono;
 - 2.2.2.2 Análise da produção de sulfeto de hidrogênio;
 - 2.2.2.3 Tolerância ao estresse osmótico do mosto;
 - 2.2.2.4 Tolerância ao estresse por etanol;
- 2.2.3 Realizar caracterização celular e morfológica dos isolados obtidos;
- 2.2.4 Realizar identificação molecular dos isolados obtidos pelo domínio D1/D2 ou região ITS1-5.8S-ITS2;
- 2.2.5 Analisar os compostos voláteis produzidos pelas leveduras selecionadas por cromatografia gasosa;
- 2.2.6 Caracterizar as leveduras selecionadas para a produção de cerveja a partir dos testes:
 - 2.2.6.1 Análise do perfil de floculação;
 - 2.2.6.2 Crescimento em diferentes temperaturas;
 - 2.2.6.3 Crescimento em diferentes concentrações de etanol;
 - 2.2.6.4 Avaliação da atenuação aparente;
 - 2.2.6.5 Velocidade de fermentação;
 - 2.2.6.6 Açúcar redutor;
- 2.2.7 Produzir cervejas com as leveduras selecionadas e analisar o teor de etanol por HPLC;
- 2.2.8 Testar as cervejas produzidas por análise descritiva quantitativa (ADQ).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 História e Origem da Cerveja

As leveduras têm sido utilizadas por milhares de anos na fermentação de bebidas alcoólicas e alimentos, tais como cerveja, vinho, saquê e pães (Samuel *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 2008; Sicard *et al.*, 2011). O momento em que o ser humano passou a fazer utilização do fermento de forma consciente é desconhecido, porém é provável que no período neolítico, as primeiras bebidas e alimentos fermentados tenham surgido espontaneamente pela exposição dos mesmos às leveduras selvagens do ambiente (Lodolo *et al.*, 2008; Morado *et al.*, 2011; Sicard *et al.*, 2011). Acredita-se, baseado em evidências moleculares, que a primeira bebida fermentada tenha sido produzida na vila neolítica de Jiahu na China em 7000 AEC, a primeira cerveja na Mesopotâmia de 5400-5000 AEC e, anos mais tarde, tenha surgido a primeira cervejaria no Egito. Já a primeira menção sobre cerveja foi na Mesopotâmia, em um poema chamado “Homem Selvagem” (Homan *et al.*, 2004; Morado *et al.*, 2011).

Na Ásia as bebidas fermentadas eram feitas principalmente de arroz (saquê), enquanto no Egito e na Mesopotâmia eram feitas de frutas (vinho), mel (hidromel) e cereais (cerveja). Acredita-se que a cultura cervejeira nascida no Crescente Fértil, onde a cevada crescia de forma selvagem, influenciou os povos germânicos e celtas, devido às rotas migratórias, os quais se tornaram produtores e consumidores de cerveja (Sicard *et al.*, 2011). Na idade média, a cerveja era um produto de atividade caseira e de consumo doméstico (Barnett *et al.*, 2000). A partir do século VI, a bebida passou a ser fabricada em mosteiros, onde foi introduzida a utilização de lúpulo (*Humulus lupulus*), em substituição ao *gruit*, mistura de ervas e especiarias, como o louro, cravo-da-índia, gengibre, sálvia e canela (Hornset *et al.*, 2003). Em 1516, o Duque Guilherme IV instituiu a Lei da Pureza (*Reinheitsgebot*) na Baviera, demonstrando atenção para a qualidade da produção de cerveja e com objetivo de controlar a demanda de trigo. A lei estabelecia que os únicos ingredientes permitidos na fabricação da cerveja eram a água, o malte de cevada e o lúpulo. O fermento ainda era desconhecido. Em 1993, esta lei foi alterada para A Lei Provisória da Cerveja Alemã (*Vorläufiges Deutsches Biergetz*), permanente até os dias atuais na Alemanha (Morado *et al.*, 2011). Além disso, o emprego da fermentação, apesar da falta de conhecimento do processo bioquímico, foi uma alternativa para a preservação

dos alimentos e ao consumo da água que, muitas vezes, não eram seguros (Morado *et al.*, 2011; Sicard *et al.*, 2011).

No século XVI, surgiram as linhagens de leveduras que dariam origem à família *Lager* ou de baixa fermentação. A descoberta ocorreu com o armazenamento de cervejas a baixas temperaturas em adegas, dando origem a cervejas mais leves e claras, ganhando, dessa maneira, rápida popularidade (Sicard *et al.*, 2011). Antes do surgimento das *Lagers*, as cervejas eram somente fermentadas à temperatura ambiente, conhecidas como família *Ale* ou de alta fermentação. Na época, as leveduras não eram conhecidas, porém estudos posteriores demonstraram que as cervejas *Ales* são fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto as cervejas *Lagers* são fermentadas por *Saccharomyces pastorianus*, que possui a capacidade de realizar fermentações a baixas temperaturas. Acredita-se que a levedura *Saccharomyces pastorianus* evoluiu de uma hibridização entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*, visto que 99,5% do genoma da parte não *S. cerevisiae* de *S. pastorianus* é idêntica à de *S. eubayanus* (Libkind *et al.*, 2011; Bokulich. *et al.*, 2013; Bing *et al.*, 2014).

No início do século XX, foi criada a lei que proibia a produção e comércio de bebidas alcoólicas nos Estados Unidos, a Lei Seca. Neste período havia cerca de 1260 microcervejarias no país, que foram forçadas a fecharem as portas (Morado *et al.*, 2011). Em 1933 a lei foi revogada, ao mesmo tempo em que a indústria deste país passava por grandes mudanças, revolucionando assim, a indústria cervejeira. Após 13 anos de lei seca, os novos consumidores já não estavam mais habituados com a cerveja e a indústria cervejeira passou a utilizar a adição de adjuntos (milho, arroz) para garantia da produção de grandes volumes de cerveja a um baixo custo. Dessa maneira, surgiram os estilos mais populares do mundo, as *American Standard Lagers* e as *American Light Lagers*, cervejas claras e neutras no que se refere à porcentagem de álcool, amargor, sabor e complexidade de aromas (Morado *et al.*, 2011). Entre a década de 70 e 80, as microcervejarias voltaram a fazer parte do mercado cervejeiro dos Estados Unidos e na década de 90 ocorreu uma grande explosão de microcervejarias, permitindo a recuperação da cultura cervejeira do país.

No Brasil, a cerveja chegou junto com as colônias europeias, sendo o primeiro documento conhecido, um anúncio de venda de cerveja no Jornal do Comércio do Rio de Janeiro, em 27 de outubro de 1836, e a primeira cerveja produzida industrialmente, a Bohemia em 1853, fabricada atualmente pela AmBev – Companhia de Bebidas das

Américas, oriunda de uma fusão entre as cervejarias Brahma e Antártica em 1999 (de Paula Santos *et al.*, 2003; AmBev, 2016).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior consumidor de cerveja do mundo, atrás apenas da China e dos Estados Unidos (SEBRAE *et al.*, 2014), e o quarto maior produtor de cerveja, contribuindo fortemente para a economia do Brasil e respondendo por 1,7% do PIB (Produto Interno Bruto), com o consumo oscilando em torno dos 60 litros per capita/ano (CERVBRASIL *et al.*, 2014). Os estilos *American Standard Lagers* e *American Light Lagers* dominam o mercado, mas assim como outros diversos países, o Brasil tem apresentado um aumento significativo no surgimento de microcervejarias, vivenciando uma mudança cultural semelhante às décadas de 70 e 80 nos Estados Unidos e compreendendo o aparecimento de diferentes estilos e marcas que oferecem aos consumidores novas bebidas com maior complexidade sensorial e que contribuem para o desenvolvimento da cultura cervejeira do país (Gómez-Corona *et al.*, 2015). Apesar das microcervejarias representarem menos de 1% do mercado nacional, este nicho apresenta crescimento potencial e a expectativa de que o setor passe para 2% do setor cervejeiro no país até 2023 (Abrabe *et al.*, 2015).

3.2 Processo Produtivo

A produção de cerveja pode ser dividida nas etapas de maltagem, brassagem, fermentação e maturação (Figura 1). O malte é proveniente principalmente de grãos de cevada, através de um processo em que a temperatura e umidade de germinação são controladas, ativando proteases e as enzimas α -amilase e β -amilase do grão, aumentando o teor de açúcares fermentáveis e de nitrogênio solúvel, conhecido como maltagem. Neste processo os grãos passam pelas fases de maceração, germinação e secagem. Geralmente a cevada chega às cervejarias já na forma de malte (Morado *et al.*, 2011; Filho *et al.*, 2005). A próxima etapa é a brassagem, dividida em moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e resfriamento. A moagem do malte expõe o amido e o conteúdo do grão para que na etapa de mosturação as amilases ativadas realizem a conversão do amido em carboidratos menores fermentáveis ou não fermentáveis. Nessa etapa de mosturação, o malte é adicionado à água e submetido a diferentes temperaturas e períodos que favorecem a atividade de α -amilase, β -amilase ou ambas, dependente do estilo de cerveja (Venturini *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2014). Em seguida é realizada a retirada de sólidos através da filtração, separando o bagaço da parte líquida, e o mosto é

fervido juntamente com a adição de lúpulo (*Humulus lupulus*), que confere o amargor característico da cerveja, devido à presença de α -ácidos e diferentes aromas, relacionados à presença de óleos essenciais. Além disso, apresenta propriedades antibacterianas (Filho *et al.*, 2005; Hazelwood *et al.*, 2010)

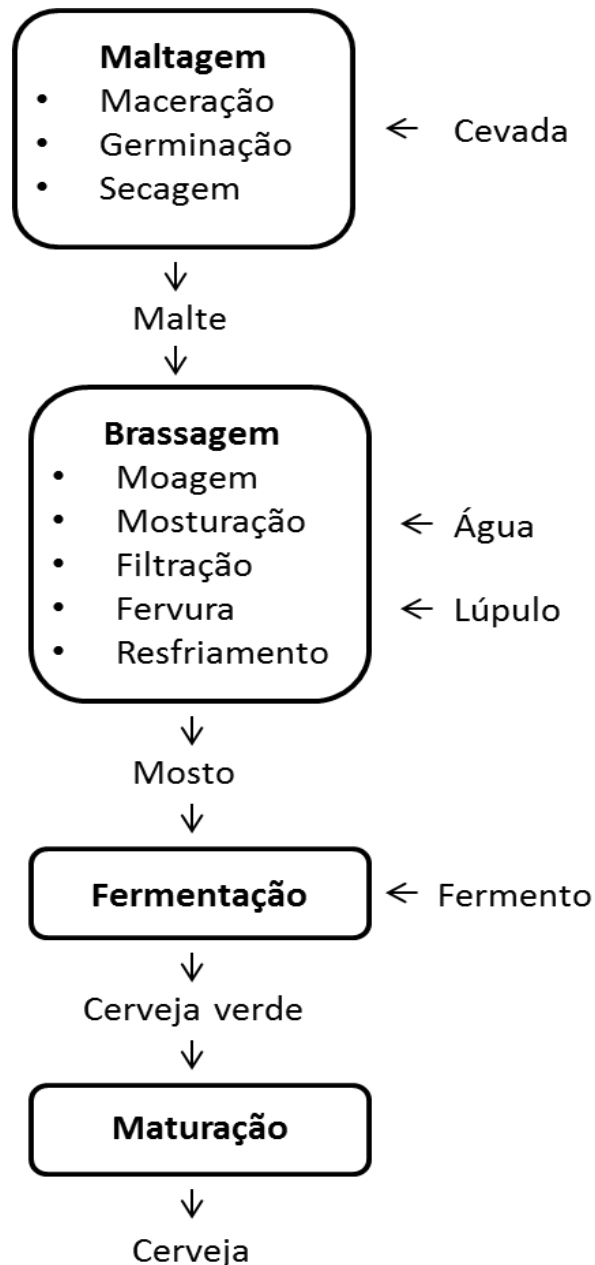


Figura 1. Fluxograma do Processo Produtivo de Cerveja. A produção de cerveja é dividida nas etapas de maltagem, brassagem, fermentação e maturação.

A fervura inativa as enzimas, elimina as células vegetativas e coagula as proteínas do mosto (Filho *et al.*, 2005; Morado *et al.*, 2011). O produto da brassagem é o mosto rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas, íons inorgânicos e lipídeos, que é resfriado, oxigenado e transferido para o tanque de fermentação (Hammond *et al.*, 1993; Bamforth *et al.*, 2003). Fatores como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, disponibilidade de fontes de carboidratos, nitrogênio e outros nutrientes afetam a levedura e, conseqüentemente, a fermentação. Ao fim da brassagem, é adicionado oxigênio atmosférico, importante para a formação de ergosterol, e mesmo em sua presença as leveduras (*Saccharomyces*) realizam fermentação alcoólica, devido ao fenômeno conhecido como repressão catabólica (Sherman *et al.*, 1998; Filho *et al.*, 2005). Durante a fermentação, a levedura passa por três fases: adaptativa (lag), exponencial (log) e estacionária. A quantidade de células inoculadas é muito importante para que o resultado final da fermentação seja o desejado. Altas taxas de inóculo diminuem a fase lag, enquanto baixas taxas de inóculo aumentam a fase lag e resultam em uma cerveja pouco atenuada, ambas podendo causar *off-flavors* (Palmer *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). Os carboidratos fermentáveis são metabolizados em etanol, dióxido de carbono e, em menor quantidade, em compostos secundários da fermentação, como ésteres e álcoois superiores, responsáveis pela formação do *flavor* e conseqüente qualidade sensorial da bebida (Bourdicho *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012). Os açúcares presentes no mosto são glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, sendo maltotriose não fermentável para algumas linhagens cervejeiras (Palmer *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). Após a fermentação, obtém-se a cerveja verde, que ainda precisa passar por um processo de maturação, em que compostos indesejáveis (*off-flavors*) como o diacetil (2,3-butanodiona) e o acetaldeído são reabsorvidos. Por fim ocorre o processo de clarificação e adição de CO₂, a separação do fermento (processo de floculação). Após estas etapas, o produto obtido pode ser filtrado, pasteurizado e envasado.

3.3 Classificação

A definição de cerveja, segundo a legislação brasileira, é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Parte do malte de cevada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não pode ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo (Brasil *et al.*, 2009). Dentro desta definição geral, os diferentes estilos cervejeiros são subdivididos de acordo com alguns fatores, como a densidade

original, a coloração, a porcentagem de teor alcoólico, o amargor, o fermento utilizado, o tipo de fermentação e a proporção de malte de cevada, sendo, de forma geral, classificados de acordo com as principais escolas cervejeiras: inglesa, alemã, belga e americana (BJCP *et al.*, 2015). Quanto ao fermento utilizado, as cervejas são classificadas em quatro grandes famílias conhecidas como *Ales*, *Lagers*, híbridas e de fermentação espontânea.

As cervejas *Ales* costumam ser mais frutadas, pois fermentam a temperaturas mais altas, entre 15 e 25 °C, pela espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e ficam inativas a menos que 12°C na produção de cerveja (Palmer *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2013; Berlowska *et al.*, 2015), enquanto as *Lagers* são fermentadas entre 6 e 14°C por *Saccharomyces pastorianus* e podem ficar ativas até 4°C na produção de cerveja (Palmer *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2008; Libkind *et al.*, 2011; Bing *et al.*, 2014; Vidgren *et al.*, 2010; Berlowska *et al.*, 2015). As cervejas híbridas são produzidas com o processo de uma *Lager* e a utilização de uma levedura *Ale* ou vice-versa. As fermentações espontâneas são realizadas com leveduras selvagens e do gênero *Brettanomyces*, podendo conter bactérias lácticas e acéticas. Atualmente, 90% do mercado mundial é composto por cervejas do tipo *Lager* (Saerens *et al.*, 2010).

3.4 Características Genéticas e Fisiológicas das Leveduras Cervejeiras

3.4.1 Leveduras Cervejeiras

As leveduras são fungos unicelulares, cuja reprodução vegetativa ocorre predominantemente por gemulação ou brotamento, sendo exceção algumas leveduras que se dividem assexuadamente por fissão binária. Além disso, são organismos modelo, devido ao seu fácil cultivo, rápido crescimento e amplo conhecimento genético, genômico, proteômico e biotecnológico (Sherman *et al.*, 1998; White *et al.*, 2010). As leveduras são os microrganismos mais utilizados na indústria de alimentos, sendo o gênero *Saccharomyces* o de maior destaque e, em especial a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, como o principal microrganismo na fabricação de bebidas alcoólicas (Steensels *et al.*, 2014). O emprego e a reutilização de leveduras, ao longo dos séculos, resultaram no surgimento das atuais linhagens industriais, devido à pressão seletiva do processo, apresentando características genéticas e fisiológicas distintas das leveduras selvagens (Sicard *et al.*, 2011; Gallone *et al.*, 2016). Entre essas características estão a utilização dos açúcares do mosto, tolerância ao estresse osmótico do mosto e tolerância

ao estresse por etanol, a produção de compostos aromáticos desejáveis e a baixa produção de compostos indesejáveis, capacidade de floculação e a baixa produção de esporos.

3.4.2 Utilização de Carboidratos

A composição do mosto cervejeiro segue aproximadamente as seguintes porcentagens de carboidratos: 9% de glicose e frutose (hexoses), 6% de sacarose, 41% de maltose, 14% de maltotriose e 22% de dextrinas (não fermentáveis). As leveduras cervejeiras possuem a capacidade de fermentar os seguintes açúcares presentes no mosto: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose. Já as dextrinas são açúcares não fermentáveis para as leveduras comerciais e contribuem com o corpo da cerveja, pois não são metabolizadas (Priest. *et al*, 2003). A capacidade de metabolizar os açúcares do mosto é de grande importância para o processo fermentativo, com destaque para maltose, que é o principal açúcar do mosto. Enquanto muitas leveduras selvagens não apresentam capacidade de fermentar maltose, esta é uma característica essencial para as leveduras cervejeiras, tendo seu metabolismo relacionado à presença mutações e duplicações de genes *MAL* (Gallone *et al.*, 2016).

3.4.3 Tolerância a diferentes tipos de estresse

Durante a fermentação do mosto, as leveduras são submetidas a altas concentrações de açúcares, que variam de 11 a 25%, e a altas concentrações de etanol (geralmente entre 3% a 8%) (Filho *et al.*, 2005; Gallone *et al.*, 2016). Dessa maneira, a tolerância a estresses como o osmótico e o estresse por etanol são características essenciais para a produção de cerveja.

3.4.4 Compostos aromáticos e *off flavors*

O sabor, o aroma e a qualidade da cerveja são dependentes da levedura utilizada e do processo fermentativo, estando ligados às concentrações traço de compostos secundários, como ésteres, álcoois superiores, terpenos, lactonas e C13-norisoprenoides, que contribuem positivamente com o aroma da cerveja, ou como acetaldeído, diacetil, sulfeto de hidrogênio, cetonas e dimetilsulfeto, que contribuem negativamente (Verstrepen *et al.*, 2003; Morado *et al.*, 2011; Saerens *et al.*, 2010).

Os ésteres são formados a partir de um ácido orgânico e um álcool, sendo o principal grupo de compostos aromáticos responsável pelo caráter frutado da cerveja. São

ésteres importantes para a cerveja: acetato de etila (aroma de solvente), acetato de isoamila (aroma de banana), caproato de etila e caprilato de etila (aroma de maçã) e acetato de fenetila (aroma de rosas, mel, floral) (Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1997; Verstrepen *et al.*, 2003; Lehninger *et al.*, 2014). Estudos sugerem que a diferença na produção de ésteres entre linhagens tem relação com a atividade da enzima álcool acetil transferase (AATase) (Ramos-Jeunehomme *et al.*, 1991). Outros fatores que influenciam a produção de ésteres são a temperatura de fermentação, a oxigenação do mosto e o metabolismo de aminoácidos. Enquanto temperaturas mais altas aumentam os níveis de ésteres presentes na cerveja, a aeração diminui sua produção, devido a mudanças na atividade e produção da enzima AATase, que seriam afetados nestas condições (Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1997).

Os álcoois superiores são compostos que contribuem com o aroma da cerveja, sendo precursores dos ésteres de acetatos. São formados pela descarboxilação de α -cetoácidos ao seu respectivo aldeído. Em seguida, uma reação é catalisada pela enzima álcool desidrogenase ou pela enzima formaldeído desidrogenase e os aldeídos são convertidos aos respectivos álcoois (Pires *et al.*, 2014). Estes compostos podem contribuir positivamente ou negativamente com o *flavor* da cerveja, dependendo da sua concentração. Em elevadas concentrações contribuem com odores e sabores fortes, enquanto em níveis ideais contribuem com aromas frutados e florais (Swiegers *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos ou fenóis são formados por um grupo hidroxila ligado a um hidrocarboneto aromático, através da reação de descarboxilação de ácidos fenólicos como o ácido ferúlico. Os fenóis conferem aromas que lembram plástico, *band-aid*, defumado, picante ou notas de especiarias. Na maioria das cervejas, os fenóis são aromas indesejados, porém em alguns estilos belgas são desejados, assim como no estilo *hefeweizen* é formado o 4-vinilguaiacol (4-VG), que remete a cravo. As leveduras com capacidade de produzir fenóis possuem os genes *POF* (*phenol off-flavor*), *PAD1* (*phenylacrylic acid decarboxylase*) e *FDC1* (*ferulic acid decarboxylase*), envolvidos na produção de 4-VG (Meaden *et al.*, 1991; White *et al.*, 2010). Enquanto muitas leveduras selvagens mantêm a produção de 4-VG, leveduras cervejeiras tendem a apresentar mutações *nonsense* nos genes *PAD1* e *FDC* (Gallone *et al.*, 2016).

Compostos orgânicos e inorgânicos como enxofre são produzidos em menores concentrações durante a fermentação (aproximadamente 0,1 mg a 50 mg/L) como sulfito

e sulfeto de hidrogênio (H₂S). O sulfeto de Hidrogênio é um subproduto da fermentação que apresenta um aroma indesejado similar a ovo podre (Ikushima *et al.*, 2012).

As dicetonas vicinais (VDK – *vicinal diketones*) são a soma dos compostos 2,3-butanodiona (diacetil) e 2,3-pentanodiona, componentes cetônicos que conferem aroma de manteiga e sabor rançoso em concentração igual ou superior a 0,10 ppm, sendo considerados defeitos sensoriais. São intimamente ligados ao metabolismo de aminoácidos, sendo formados durante a biossíntese da valina e secretados pela levedura ou por bactérias contaminantes como, *Lactobacillus spp* e *Pediococcus spp* (Almeida *et al.*, 1999; Morado *et al.*, 2011; Dasari *et al.*, 2011). As VDK são produzidas a partir de piruvato a α -acetolactato, que é reduzido à valina. O excesso de α -acetolactato é excretado pela célula e reduzido a diacetil de acordo com as condições do meio externo. Durante a maturação, a levedura reincorpora e metaboliza diacetil a acetoína, que não altera o aroma da cerveja. Entretanto em grandes quantidades, as leveduras não são capazes de metabolizar todo o conteúdo e o mesmo fica presente no mosto afetando o produto final.

O acetaldeído é um dos principais compostos carbonílicos da fermentação, sendo um subproduto natural e de grande impacto no *flavor* da cerveja, atribuindo um aroma pungente e, em menores quantidades, de maçã verde e grama recém-cortada. A álcool desidrogenase (ALDH) é a principal enzima envolvida no metabolismo do acetaldeído. No citoplasma o piruvato é descarboxilado em acetaldeído e CO₂, sendo, em seguida, reduzido a uma molécula de etanol pela ALDH. A falta de zinco, cofator para a ALDH, pode resultar em altas produções de acetaldeído e pouca produção de etanol. Durante a maturação, grande parte do acetaldeído é metabolizado pelas leveduras (Azeredo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2013).

Além dos compostos citados anteriormente, outros compostos como terpenos, lactonas e C13-norisoprenoides podem adicionar complexidade à cerveja com aromas florais, amadeirados, frutados e cítricos, além de alguns ácidos graxos que são responsáveis por aromas indesejados no produto final, lembrando sabão, ranço, queijo, chulé, suor e vinagre. Tais compostos podem ser produzidos pelas leveduras ou por contaminantes e afetam o produto final (Di Maio *et al.*, 2012) (Figura 2).

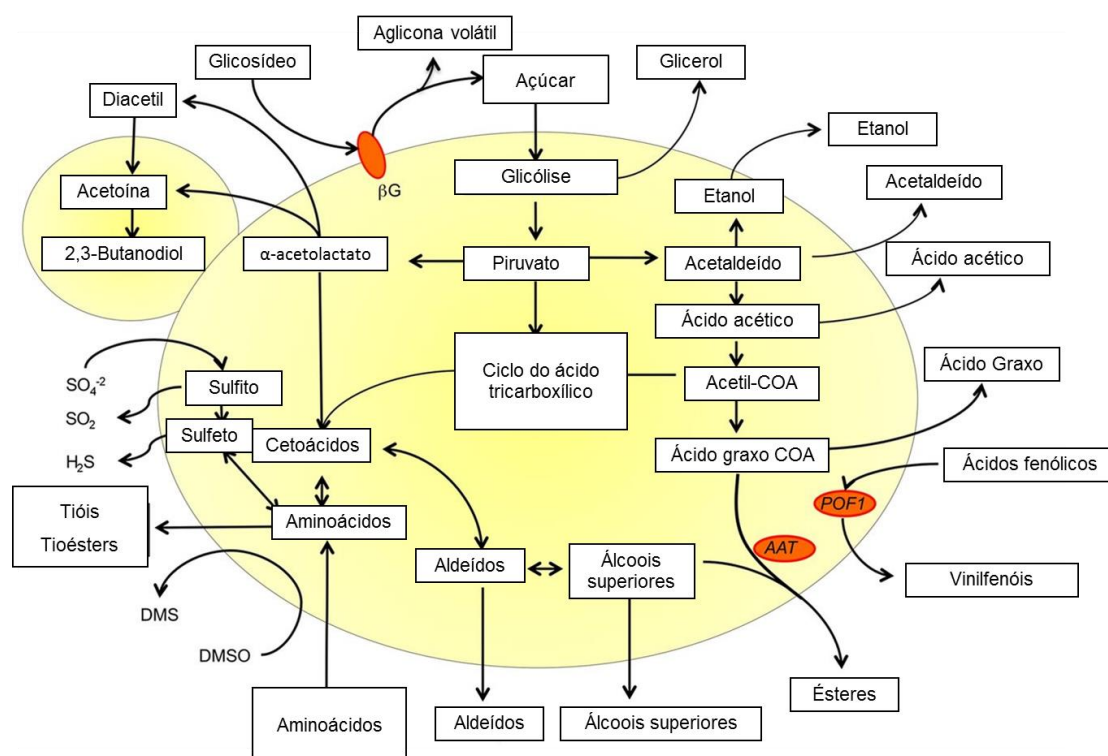


Figura 2. Influência do Metabolismo no *Flavor* da Cerveja. Compostos produzidos durante o metabolismo de *Saccharomyces* em mosto cervejeiro. β G, β -glicosidase; DMS, dimetilsfeto; DMSO, dimetilsulfóxido; AAT, Álcool acetil tranferase; POF, *Phenol off-flavour* (Bokulich. *et al*, 2013).

3.4.5 Floculação

Define-se floculação como a agregação não sexual e reversível das células com formação de flocos multicelulares que sedimentam ou flutam, sendo um processo que facilita a coleta das leveduras (Calleja *et al*, 1984; Verstrepen *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2010). As leveduras *Ales* e *Lagers* foram classificadas originalmente pelo seu tipo de floculação, sendo as *Ales* (alta floculação) assim conhecidas por sua capacidade de flotação, as quais se aderem às bolhas de CO_2 e ficam localizadas no topo do fermentador. Já as leveduras *Lagers* ou (baixa floculação) se aderem e formam flocos que sedimentam, ficando localizadas no fundo do fermentador. No que diz respeito à produção de cerveja, as leveduras cervejeiras tendem a flocular, enquanto as leveduras selvagens apresentam baixa ou nenhuma floculação. Além disso, é importante que a levedura flocule no tempo correto. Se ocorrer cedo demais, a fermentação não estará completa ou se ocorrer tarde demais, poderá haver consequências para a qualidade da cerveja (Priest. *et al*, 2003). A floculação mais comum em leveduras *Saccharomyces* é a dependente de cálcio e pode ser inibida por agentes quelantes como EDTA (ácido

etilenodiaminotetracético) e/ou açúcares específicos, sendo conhecidos três fenótipos: Flo1 (floculação inibida por manose), NewFLO (floculação inibida por manose e glicose) e MI – *Manose Insensitive* (não é inibido por manose ou qualquer outro açúcar) (Dengis *et al.*, 1995; Kihn *et al.*, 1998; Claro *et al.*, 2007). Este processo está relacionado com a expressão de genes específicos *FLO* e é dependente da presença de glicoproteínas chamadas floculinas (Flo1p) nas paredes celulares, as quais se interagem com seus sítios de ligação, as α -mananas, presentes nas paredes das células vizinhas. Acredita-se que o papel do cálcio na floculação ocorre através de sua ligação às floculinas, as quais passam a assumir a conformação estrutural correta para a formação dos flocos (Verstrepen *et al.*, 2003; Claro *et al.*, 2007). Apesar de ser mais comum em *Saccharomyces*, o processo de floculação já foi verificado em outras espécies, como *Wickerhamomyces anomalus*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kloeckera apiculata*, entre outras, exibindo floculação dependente de cálcio ou por diferentes mecanismos ainda pouco estudados (Saito. *et al.*, 1990; Suzzi *et al.*, 1996; Vallejo. *et al.* 2012).

3.4.6 Reprodução e Genoma

As leveduras cervejeiras geralmente apresentam nenhuma ou baixa produção de esporos, sendo em sua maioria, não viáveis. Esta característica resulta na perda da funcionalidade do ciclo sexual e favorecimento da reprodução por brotamento, gerando células clonais e, conseqüentemente, maior repetibilidade do produto final (Gallone *et al.*, 2016). Além disso, as linhagens cervejeiras são poliploides ou aneuploides, apresentando maior número de cópias genéticas para características importantes para a produção de cerveja, como a utilização de carboidratos, fontes de nitrogênio e floculação. Em contrapartida as leveduras cervejeiras apresentam decaimento genético no que se refere a genes relacionados à sobrevivência fora do meio de cultura rico em nutrientes do mosto cervejeiro (Gallone *et al.*, 2016).

3.5 Bioquímica da cerveja

Em 1680, Antonie van Leeuwenhoek descreveu uma levedura pela primeira vez. Anos mais tarde, em 1789, Antoine-Laurent Lavoisier descreveu a natureza química da fermentação, demonstrando a conversão de açúcar em gás carbônico e etanol. E apenas no século XIX, Louis Pasteur demonstrou que as leveduras eram responsáveis pela fermentação do mosto em cerveja através da ação de microrganismos na ausência de oxigênio, baseado nos conhecimentos da estequiometria das fermentações de Gay-

Lussac, e mais tarde descrito em seu livro “Etudes sur la Bière” - 1876 (Schlenk *et al.*, 1985; Saerens *et al.*, 2010). Define-se fermentação alcoólica como a degradação anaeróbia de nutrientes orgânicos para a obtenção de energia, com a formação de etanol e gás carbônico. Neste processo, um mol de glicose é metabolizado em dois moles de ácido pirúvico, via conhecida como glicólise, resultando na produção de quatro moles de ATP, utilização de dois moles de ATP e saldo final de dois moles de ATP. Cada mol de ácido pirúvico produzido pela reação anterior é convertido em um mol de etanol e um mol de gás carbônico, através das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase que realizam a conversão de ácido pirúvico em acetaldeído e de acetaldeído em etanol, respectivamente (Figura 3) (Lehninger *et al.*, 2014). Durante a fermentação na fabricação de cerveja, as leveduras utilizam os carboidratos fermentáveis presentes no mosto, assim como as fontes de nitrogênio, os íons inorgânicos e vitaminas, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono em uma média de 35g a 70g/L e na acidificação do meio (pH de aproximadamente 4), dependendo da densidade do mosto e da atenuação alcançada. Além da produção de etanol e dióxido de carbono, as leveduras produzem pequenas quantidades (traços) de compostos secundários, porém extremamente importantes para o perfil aromático da cerveja (Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1997; Lehninger *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2003).

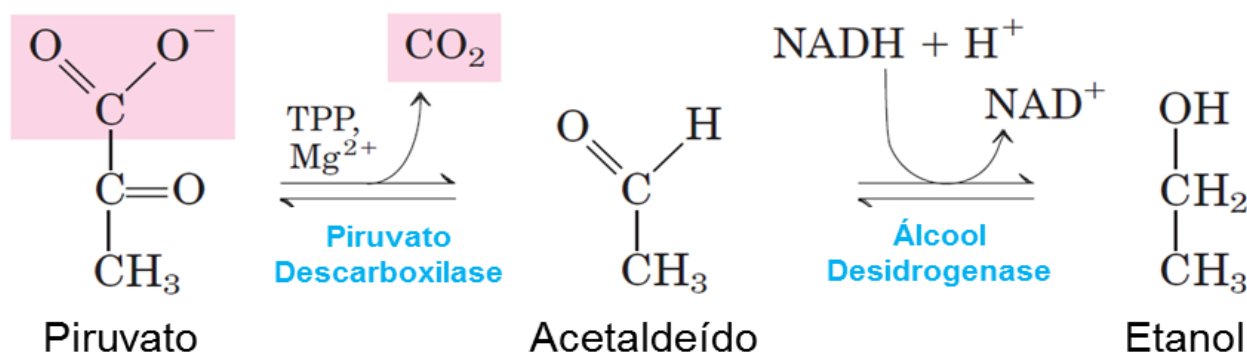


Figura 3. Fermentação Alcoólica. Uma molécula de piruvato é descarboxilada em acetaldeído e gás carbônico pela enzima piruvato descarboxilase. Em seguida uma molécula de acetaldeído é reduzida a etanol pela enzima álcool desidrogenase (Lehninger *et al.*, 2014).

3.6 Isolamento de Leveduras Selvagens para a Produção de Cerveja

A partir da descoberta das leveduras como agentes responsáveis pela fermentação da cerveja, muitos avanços foram obtidos na pesquisa e contribuíram para o melhoramento do processo, controle de contaminantes, bem como para o estabelecimento de culturas puras de leveduras, sendo o primeiro isolado oriundo a partir de uma cervejaria por Emil Hansen em 1881, chamado de “levedura Calsberg número 1” (Huuskonen *et al.*, 2010; Saerens *et al.*, 2010). As leveduras utilizadas atualmente na indústria cervejeira sofreram algumas centenas de anos de seleção se distanciando geneticamente e fisiologicamente das leveduras selvagens. Porém, a partir de 1970, foi estabelecido o armazenamento de linhagens de leveduras como culturas puras, sendo utilizadas como culturas de inóculo em grande escala (Huuskonen *et al.*, 2010; Steensels and Snoek *et al.*, 2014; Gallone *et al.*, 2016). Dessa maneira, tem se tornado interessante o isolamento de novas leveduras. Estudos que tem demonstrado que as linhagens industriais representam apenas uma pequena fração da biodiversidade de leveduras, que inclui atualmente mais de 2000 mil espécies descritas (Liti *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Triagens em bancos de leveduras têm apontado a diversidade genética e o potencial da utilização de leveduras não *Saccharomyces* e de novas linhagens em processos fermentativos (Pellegrine *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2005; Comitini *et al.*, 2011; Fujihara, *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2013; Tapsoba *et al.*, 2015; Figueiredo *et al.*, 2016; Gamero *et al.*, 2016; Šuranská, *et al.*, 2016). Frutos em geral são boas fontes para o isolamento de leveduras, sendo ricos em açúcares e apresentando pH ácido, características que favorecem o crescimento desses microrganismos, tais como as espécies *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*. Estes gêneros já foram isolados a partir de amostras de cerveja, demonstrando sua capacidade de sobrevivência neste meio (Filho *et al.*, 2005; Sheikhha *et al.*, 2018) e potencial para a indústria cervejeira (Lee *et al.*, 2011; Steensels and Verstrepen *et al.*, 2014). Apesar disso, poucos estudos investigam o isolamento de leveduras para a produção de cerveja, as quais podem contribuir com o sabor, o perfil aromático e a complexidade da bebida como com o setor cervejeiro (Steensels *et al.*, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento das Leveduras

As leveduras investigadas neste estudo foram isoladas a partir de cinco frutos diferentes: ameixa (*Prunus domestica*), laranja (*Citrus sinensis*), limão siciliano (*Citrus limon*), limão taiti (*Citrus latifolia*) e tangerina (*Citrus reticulata*). Para o isolamento de leveduras presentes na casca, amostras orgânicas de tangerina foram coletadas de árvores locais durante a época de safra, entre abril e novembro de 2016, nas cidades de Guaíba e Barra do Ribeiro, RS, em embalagem estéril, armazenadas em gelo e transportadas para o laboratório de micologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Para o isolamento de leveduras da polpa, foram utilizadas amostras de ameixa, limão-siciliano, limão taiti, laranja e tangerina de um mercado na região de Porto Alegre. As amostras de casca e polpa dos frutos foram maceradas e adicionadas em tubos contendo 35mL de mosto de cerveja previamente esterilizado em autoclave, suplementado com cloranfenicol 0,1% (34 ug/mL). Os tubos foram incubados a 28°C e pesados diariamente para o monitoramento da fermentação até a sua estabilização. Ao final da fermentação foram preparadas diluições decimais de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , onde 100 uL foram semeados em placas de Petri contendo o meio de cultura YPD 2%, incubando-se a 28°C por três dias. As colônias com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram purificadas duas vezes através de esgotamento em placas YPD 2% e incubadas a 28 °C durante três dias. Todas as linhagens foram conservadas em criovial com 70% de meio YPD 2% e 30% de glicerol estéril, a -80°C.

4.2 Linhagens Controle

As linhagens de leveduras cervejeiras industriais US-05 (*S. cerevisiae/Ale*); WB-06 (*S. cerevisiae/Ale*), T-58 (*S. cerevisiae/Ale*), W34/70 (*S. pastorianus/Lager*) e WLP-013 (*S. cerevisiae/Ale*) foram usadas como controle nos experimentos.

4.3 Preparo do Inóculo

Antes de cada experimento, os isolados foram semeados em YPD 2%, utilizando-se a técnica de esgotamento para verificação da pureza, e incubados a 28°C por 72h.

4.4 Seleção das Leveduras por Testes de Exclusão

Para a seleção dos isolados com fenótipos mais desejáveis para a produção de cerveja, foram realizados os testes de capacidade de fermentação das fontes de carbono do mosto cervejeiro, produção de H₂S, tolerância ao estresse osmótico e tolerância ao estresse por etanol. Somente os isolados que apresentaram capacidade de fermentar maltose, apresentaram produção baixa de H₂S e foram tolerantes ao estresse osmótico e por etanol foram selecionados para as próximas etapas do estudo.

4.4.1 Avaliação da Fermentação de Fontes de Carbono

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade fermentativa dos seguintes açúcares presentes no mosto cervejeiro: glicose, sacarose e maltose. Para isso, foi realizado o preparo do inóculo conforme o item 4.4, em seguida uma pequena alçada foi inoculada em 5mL de meio MBF contendo 2% de cada açúcar separadamente e um tubo de Durham invertido. Para a preparação do teste com sacarose, a mesma foi filtrada. Os tubos foram incubados a 28 °C e lidos nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 após o inóculo. Foi considerada como leitura negativa a ausência de gás carbônico no tubo de Durham, +1 quando 1/3 do tubo de Durham foi preenchido por gás carbônico, +2 quando 2/3 do tubo foi preenchido por gás carbônico e +3 quando o tubo de Durham foi completamente preenchido por gás carbônico (Yarrow *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 2000). Os isolados com capacidade fermentativa de glicose, sacarose e maltose foram selecionados para os testes posteriores.

4.4.2 Análise da Produção de H₂S

A produção de gás sulfídrico (H₂S) foi analisada pela inoculação das linhagens em mosto líquido estéril, sendo uma fita de papel filtro, previamente impregnada com uma solução de 3% de acetato de chumbo, fixada à tampa do tubo. O escurecimento do papel filtro demonstra a produção de sulfeto de hidrogênio, gás indesejado na produção de cerveja, pois confere odor semelhante a ovo (Oliveira *et al.*, 2008; White *et al.*, 2010). Foi utilizada uma escala da produção de H₂S, em que o não aparecimento de coloração enegrecida foi considerado como negativo (coloração branca); +1 para pequenas quantidades (coloração bege), +2 para quantidades médias (coloração marrom) e +3 para quantidades elevadas (coloração preta) (Silva *et al.*, 1984).

4.4.3 Tolerância ao Estresse Osmótico do Mosto

A capacidade de crescimento em mostos com diferentes concentrações de

açúcares foi avaliada através do teste em gotas (*drop test* adaptado de Lauer *et al.*, 2007). Para isso, foram preparados três meios de cultura: 11% de extrato de malte e 2% de ágar (mosto de 11°P); 17% de extrato de malte e 2% de ágar (mosto de 17°P) e 25% de extrato de malte e 2% de ágar (mosto 25°P). O meio YPD 2% sólido foi utilizado como controle. Os isolados foram preparados segundo o item 4.4, em seguida foram preparadas diluições em salina (0,9% de NaCl) de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 células/mL através da contagem em Câmara de Neubauer, aumento de 400x. O volume 10 µL de cada diluição foi inoculado nos meios de cultura a serem testados e incubados a 28°C durante 72 horas. Os isolados com capacidade de crescimento igual ou superior às linhagens controle, medido através do tamanho da colônia, foram selecionados para os testes posteriores.

4.4.4 Tolerância ao Estresse por Etanol

Para análise da tolerância a diferentes concentrações de etanol os isolados foram crescidos conforme o item 4.4 e a concentração de células foi ajustada para 2×10^5 /mL. Foram inoculados 100 µL da suspensão de células em cada tratamento (0%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10% de etanol), ajustando o volume final para 1 mL com solução salina (0,9% de NaCl) e incubados a 28°C por 1h, 3h ou *overnight* em agitação de 300 rpm (IKA KS 400 i control). Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 8500 x g, ressuspendidas em 1 mL de salina, semeadas (5 µL) em meio YPD 2% sólido e incubadas por 72h a 28°C (adaptado de Lewis *et al.*, 2010). As leveduras com capacidade de crescimento depois de submetidas à condição de estresse por etanol foram selecionadas para as próximas etapas do estudo.

4.5 Caracterização Fenotípica e Bioquímica

As leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, na presença de NaCl e ciclohexamida e produção de compostos amiloides (Barnett *et al.*, 2000).

4.5.1 Testes Morfológicos

Os isolados selecionados foram caracterizados de acordo com suas características coloniais e celulares. A caracterização colonial foi realizada pelos seguintes parâmetros: cor, forma, margem, elevação, superfície, brilho, consistência. A caracterização celular foi realizada através da observação em microscópio, utilizando-se

da técnica de lâmina a fresco. Foram consideradas as seguintes características: forma e tipo de reprodução (Kurtzman *et al.*, 2011).

4.5.2 Testes de assimilação de fontes de carbono

As leveduras foram incubadas em água destilada por 24h para o esgotamento das suas reservas de carbono. Em seguida foram semeadas em placas de Petri contendo 0,67% (p/v) de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) acrescentado de 2% (p/v) de Agar Difco e 0,5% (p/v) da fonte de carbono a ser testada (glicose, D-galactose, D-ribose, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, L-ramnose, sacarose, maltose, trealose, inulina, amido solúvel, glicerol, eritritol, ribitol, celobiose, salicina, lactose, M-inositol, DL-lactato, succinato, citrato, metanol, acetona, isopropanol, N-acetil glicosamina, tween 80), exceto a rafinose, preparada com 1% (p/v) do açúcar. As placas foram incubadas em estufa a 28°C e foram realizadas leituras a cada sete dias, durante 21 dias. Glicose foi utilizada como controle positivo, enquanto foi utilizado como controle negativo 0,67% (p/v) *Yeast Nitrogen Base* (YNB) acrescentado 2% (p/v) de Agar Difco sem a adição de fontes de carbono (Barnett *et al.*, 2000).

4.5.3 Testes de assimilação de fontes de nitrogênio

As leveduras foram incubadas em água destilada por 24h de modo que suas reservas de nitrogênio se esgotaram. Em seguida foram semeadas em placas de Petri por *pour-plate* contendo 1,17% (p/v) de meio *Yeast Carbon Base* (YCB) acrescentado 2% (p/v) de Agar Difco. As fontes de nitrogênio foram adicionadas à superfície da placa, sendo observado o crescimento de leveduras ao seu redor a cada sete dias durante 21 dias, temperatura de 28°C. As fontes de nitrogênio testadas foram: nitrato de sódio, L-lisina, etilamina e creatina. Peptona foi utilizada como controle positivo, enquanto 1,17% (p/v) de meio *Yeast Carbon Base* (YCB) acrescentado 2% (p/v) de Agar Difco foi utilizado como controle sem adição de fontes de nitrogênio (Barnett *et al.*, 2000).

4.5.4 Crescimento em NaCl

As leveduras selecionadas foram incubadas em meio líquido NaCl 10% ou NaCl 16% (YNB 0,67%, Glicose 5%, NaCl 10% ou NaCl 16%) por 72h. O crescimento foi verificado através da turvação do meio. Foram atribuídos os valores de 0,5 a 3 de acordo com o nível de turvação, utilizando a escala de Wickerham (Barnett *et al.*, 2000).

4.5.5 Crescimento em Ciclohexamida

Para verificar o crescimento das leveduras na presença do antibiótico ciclohexamida, as mesmas foram incubadas a 28°C por 21 dias em meio YPD 2% acrescido de ciclohexamida em 0,1% ou 0,01%, sendo a leitura realizada nos dias 7, 14, 21 pós-inoculação (Barnett *et al.*, 2000).

4.6 Identificação Molecular

4.6.1 Extração de DNA Genômico

Os isolados foram cultivados de acordo com o item 4.4, sendo uma colônia 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 ajustado para 8,0). A amostra foi incubada em banho-maria a 65 °C por 60 min e após, foram adicionados 200 µL de acetato de potássio a 5M, pH ajustado para 4,8. Os tubos foram homogeneizados durante 30 s e incubados em gelo por mais 30 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8500 x g por 5 min duas vezes, transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Foi adicionado 1,0 mL de isopropanol a -20 °C, agitando-se os tubos por inversão durante 5 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8500 x G por 10 min. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% ao *pellet* a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 8500 x G por 5 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi suspenso em 50µL de TRIS-EDTA, pH ajustado para 7,4, adicionando-se 2,5 µL de RNase e incubando os tubos em banho-maria a 37 °C por 30 min (Ramírez-Castrillón *et al.*, 2014).

4.6.2 Amplificação do DNA Genômico

As reações de amplificação do DNA genômico extraído foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em volume final de 25µL, contendo 13,9µL de água mili-Q, 2,5µL de tampão, 0,3µL de dNTPs, 0,8µL de *primer* senso, 0,8µL de *primer* anti-senso, 1,5µL de MgCl₂, 0,2µL de Taq DNA Polimerase e 5µL do DNA diluído (1 a 5ng/µL). Foi amplificado o domínio D1/D2 da subunidade maior do gene ribossomal 26S (LSU rDNA) ou a região ITS1-5.8s-ITS2. Os *primers* utilizados foram: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') ou ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Sambrook *et al.*, 2001). As rampas de temperatura utilizadas para ambos *primers* foram: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 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 min a 72 °C. A eficácia da amplificação foi

visualizada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT® de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante (Sambrook *et al.*, 2001).

4.6.3 Sequenciamento

Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. As sequências foram editadas manualmente, alinhadas e comparadas com as sequências de linhagens tipo depositadas no GenBank usando o algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)". Identidades iguais ou superiores a 99% permitiram identificar o isolado em nível taxonômico de espécie.

4.7 Análise dos Compostos Voláteis

Para determinação do perfil de aromas produzidos pelas leveduras selecionadas, as mesmas foram cultivadas em placa conforme o item 4.4, inoculadas em YPD 2% por 72h a 28°C. Após o crescimento, a quantidade de células foi ajustada para $2,0 \times 10^7$ células/mL, inoculando-se 100 µL da suspensão em tubos de 10 mL, contendo 5 mL de mosto de cerveja preparado com extrato de malte (10 °P), sem a adição de lúpulo, filtrado com membrana Millipore de 0,22 µm, incubadas a 25 °C por 48h. Os compostos voláteis analisados foram os ésteres (acetato de etila, acetado de hexila, acetato de isoamila, butanoato de etila, cinamoato de etila, hexanoato de etila, heptanoato de etila, isobutanoato de etila, isovalerato de etila, lactato de etila, laurato de etila, 2-metilbutanoato de etila, nonanoato de etila, octanoato de etila, pentanoato de etila, succinato de dietila, tioacetato de S-furfurila, undecanoato de etila, decanoato de etila, antranilato de etila, acetato de isobutila, acetato de feniletila, acetato de furfurila), os terpenos (α -pineno, α -terpineol, β -pineno, β -terpineol, cedreno, citronelal, geraniol, limoneno), a lactona (γ -nonalactona), os C13-norisoprenoides (α -ionona, β -damascenona, β -ionona), os álcoois superiores (metanol, n-butanol, 2-butanol, 3-metil 1-butanol, 1-propanol, 1-hexanol, álcool furfúrico, 2-feniletanol) e os ácidos graxos (ácido butanoico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido heptanoico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido octanoico, ácido propanoico, ácido pelargônico, ácido valérico, ácido n-undecanoico, ácido 10-undecanoico). As leveduras que apresentaram os perfis aromáticos mais interessantes para a produção de cerveja foram selecionadas para a etapa de caracterização e para a produção de cervejas.

4.7.1 Preparo da Amostra

Para o preparo da amostra, uma fibra de SPME composta por divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30 mm (DVB/CAR/PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, USA) foi inicialmente condicionada de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionado 1,5 g de NaCl às amostras previamente incubadas. O procedimento de extração de compostos voláteis foi realizado utilizando o amostrador automático Triplus-RSH (Thermo Fischer Scientific, USA) e o software ChromQuest (Thermo Fischer Scientific, USA). As amostras foram incubadas por 5 min a 56 °C e, posteriormente, a fibra foi exposta no *headspace* (HS) por 55 min. A adsorção no injetor do cromatógrafo a gás foi realizada por 2 min a temperatura de 265 °C no modo *splitless* (Mendes *et al.*, 2015).

4.7.2 Análises quantitativas

As análises quantitativas foram executadas em um cromatógrafo a gás ThermoScientific Trace 1310 (USA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) e o *software ChromQuest*. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna ZB-WAXplus (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Zebron, USA) e gás nitrogênio como carreador a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 5 min, aumentado 2°C por minuto até atingir 220 °C. A identificação dos compostos foi efetuada através do tempo de retenção, comparando-se com os padrões dos compostos voláteis e a quantificação foi realizada por padronização interna, com 4-metil 2-pentanol como padrão interno.

4.7.3 Cálculo da Atividade Olfativa (OAV)

O valor de atividade olfativa (*Odour activity value* - OAV) foi calculado para cada composto dividindo-se a média das concentrações encontradas pelo limiar de percepção olfativa. Os compostos cujos valores de OAV estavam abaixo de “1” foram considerados como sendo irrelevantes na contribuição para o aroma, enquanto que compostos cujos valores de $OAV \geq 1$ foram considerados relevantes (Vilanova *et al.*, 2012).

4.8 Caracterização das Leveduras Para a Produção de Cerveja

4.8.1 Análise do Perfil de Flocculação

O perfil de flocculação foi avaliado pelo ensaio de Helm's modificado (Bendiak *et*

al., 1995). Os isolados foram preparados segundo o item 4.4, sendo cinco colônias de cada levedura inoculadas em 50 mL de meio líquido YPD 2% e incubadas a 28°C por 72h em agitação a 150 rpm (IKA KS 400 i control). Após o período de crescimento, as células foram ajustadas para a concentração de 10^8 células/mL, centrifugadas a 400 x G por 5 min, ressuspensas em água destilada, novamente centrifugadas a 400 x G por 5 min e divididas em cinco grupos: grupo 1 (controle) (as células foram ressuspensas em água destilada); grupo 2 (EDTA): (as células foram ressuspensas em solução 0,5M de EDTA, pH ajustado para 7,0), grupo 3 (cálcio) (as células foram lavadas com 0,5 g/L de sulfato de cálcio centrifugadas a 400 x G por 5 min e ressuspensas em tampão de lavagem 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), grupo 4 (glicose): (as células foram ressuspensas em 0,5 M de glicose pH ajustado para 4,5) e grupo 5 (manose): (as células foram ressuspensas em 0,5 M de manose pH ajustado para 4,5). Após a ressuspensão e homogeneização em vórtex, as células permaneceram sem agitação por 15 min. Em seguida, foram coletados 100 μ L do sobrenadante de cada amostra e diluído em 900 μ L de água destilada. A leitura foi realizada em D.O._{600nm}. A porcentagem de floculação foi calculada de acordo com a fórmula:

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

Para as leveduras que apresentaram floculação independente de cálcio, foi realizado o teste pela taxa de floculação. As leveduras foram cultivadas conforme o item 4.4, sendo cinco colônias de cada levedura inoculadas em 100 mL de meio líquido YPD 2% e incubadas a 28°C por 72h em agitação a 150 rpm (IKA KS 400 i control). Após o período de crescimento, as células foram homogeneizadas, transferidas com o meio de cultura para uma proveta de 100 mL e incubadas por 12h sem agitação. O perfil de floculação foi analisado pela porcentagem de floculação, conforme a equação abaixo, em que o volume de floculação é o volume que apresente turbidez.

$$\% \text{ floculação} = \frac{\text{Volume Total} - \text{Volume de Floculação}}{\text{Volume Total}} \times 100$$

Para ambos os testes, as leveduras foram categorizadas como de baixa floculação (0-50% de sedimentação), média floculação (50-80% de sedimentação) e de alta floculação

(80 a 100% de flocculação).

4.8.2 Crescimento em Diferentes Temperaturas

Para análise do perfil de crescimento em diferentes temperaturas, os isolados foram preparados segundo o item 4.4 e inoculados em meio líquido YPD 2% por 72h a 28°C. Após o crescimento, a absorbância foi ajustada para D.O._{600nm} inicial entre 0,1 e 0,15 em 10 mL de YPD 2% e as leveduras foram incubadas nas temperaturas de 37°C, 25°C e 15°C. As leituras foram realizadas em 12h, 24h, 48h e 72h em absorbância de 600nm.

4.8.3 Teste de Crescimento na Presença de Etanol

Para análise de crescimento na presença de etanol, os isolados foram preparados conforme o item 4.4, sendo em seguida uma colônia de cada isolado inoculada em 10 mL de YPD 2% por 72h a 28°C. Após o crescimento, 10 µL da suspensão foi inoculada nos tratamentos de 0%, 5% e 10% de etanol em meio YPD 2% líquido por 72h a 28°C e realizada a leitura em espectrômetro na absorbância de 600nm, calculando-se as porcentagens de crescimento em 5% e 10% de etanol em relação a 0% e comparando com os resultados das leveduras controles comerciais. (Adaptado de Cavalheiro *et al.*, 2013).

4.8.4 Teste de Fermentação em Mosto Cervejeiro

As leveduras foram inoculadas em mosto cervejeiro para avaliar sua capacidade fermentativa a partir dos testes de atenuação aparente do mosto, velocidade de fermentação e concentração de açúcar residual.

4.8.4.1 Atenuação Aparente e ABV (*Alcohol by volume*) Estimado

As leveduras foram testadas quanto a capacidade de transformação dos carboidratos do mosto cervejeiro em etanol e CO₂, através da medição da concentração inicial e final de sólidos solúveis por refratômetro. Para isso, as leveduras foram preparadas de acordo com o tópico 4.4 e inoculadas em YPD 2% por 72h a 28°C. Após o crescimento, as leveduras foram ajustadas para a concentração final de 6x10⁶ células/mL em tubos contendo 10mL de mosto cervejeiro ajustado para 10°P, sendo incubadas a 25°C por 96h. As medidas em grau °Brix foram convertidas para densidade em g/cm³. Após, foram calculadas as medidas de atenuação aparente e ABV estimado (Palmer *et*

al., 2006) pelas fórmulas:

$$\% \text{ atenuação aparente} = \frac{\text{sólidos solúveis do mosto} - \text{sólidos solúveis final}}{\text{sólidos solúveis do mosto}} \times 100$$

$$\% \text{ ABV estimado} = (\text{sólidos solúveis do mosto} - \text{sólidos solúveis final}) \times 0,134$$

4.8.4.2 Velocidade de Fermentação

A avaliação da velocidade de fermentação foi realizada por gravimetria, através do cálculo do desprendimento de CO₂. As leveduras foram preparadas de acordo com o tópico 4.4 e inoculadas em YPD 2% por 72h a 28°C. Após o crescimento, as leveduras foram ajustadas para a concentração final de 6x10⁶ células/mL em tubos contendo 10 mL de extrato de malte líquido ajustado para 10°P, sendo incubadas a 25°C por 96h. Os tubos foram pesados em 0h, 24h, 48h, 72h e 96h. O cálculo do desprendimento de CO₂ foi realizado de acordo com Ciani *et al.* (1996).

4.8.4.3 Açúcar Redutor

As concentrações de açúcares redutores no início e final da fermentação foram analisadas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller *et al.*, 1959). Para isso, em um tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de amostra mais 1mL do reagente DNS e incubados no banho-maria a 100°C por 5 min. Após, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 5 min, sendo adicionado 16 mL de tartarato de potássio 15,1g/L e realizada a leitura em espectrômetro, absorvância de 540nm. Para a determinação da curva padrão foram preparadas as soluções de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 g/L de maltose.

4.8.5 Produção de Toxina *Killer*

As leveduras da espécie *W. anomalus* foram testadas quanto à produção de toxina *killer* contra a linhagem US-05 de *S. cerevisiae*, com objetivo de avaliar a possibilidade de uma futura cultura mista. Para isso as leveduras foram cultivadas segundo o item 4.4, sendo a levedura US-05 transferida para YPD 2% líquido por 48h. O tapete foi feito com a levedura US-05 com o auxílio de um suabe estéril em meio ágar YM-MB. Em seguida, as leveduras *W. anomalus* foram semeadas em cima do tapete com o auxílio de uma alça bacteriológica e incubadas a 28°C por 3 dias. A formação de um halo de inibição azul ao redor da colônia foi considerada como resultado positivo para a

produção de toxina *killer* (Buzzini *et al.*, 2000; Stopiglia *et al.*, 2014).

4.9 Produção de Cerveja

As leveduras selecionadas e caracterizadas foram testadas quanto à produção de cerveja. Para isso, foi preparado um mosto base pilsen para ressaltar as características das leveduras e, dessa maneira, verificar os melhores estilos de cerveja para empregá-las. Foram preparados mostos com densidades entre 12°P-14°P e 10,9 IBU - *International Bitterness Unit*) com a variedade de lúpulo Magnum. A mosturação foi realizada a 66°C por 30 min e a fervura foi realizada por 60 min com a adição de lúpulo no tempo zero. Foi utilizada água da rede filtrada com carvão ativado. A fermentação foi realizada em escala laboratorial (5L, temperatura de 18°C sem agitação, inóculo de 10⁶/mL/°P células). Diariamente, foram realizadas avaliações do pH através de um pHmetro e da concentração de açúcares do mosto através de um refratômetro. Os valores da concentração de açúcares foram posteriormente ajustados para densidade (Berlowska *et al.*, 2015). Após a fermentação, a cerveja foi transferida para garrafas de 600 mL e adicionado sacarose 5g/L a 18°C para a refermentação e carbonatação até a pressão atingir 2,5 Kg/cm². Após a carbonatação, as garrafas foram colocadas a 0°C para maturação.

4.10 Análise do Teor de Etanol

As amostras de cerveja foram inicialmente submetidas ao sonificador por 1h para a descarbonatação. Em seguida foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm para remoção da biomassa. As amostras seguiram para análise da concentração final de etanol, realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (Shimadzu), utilizando o detector de índice de refração (IR), a coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H a 45°C e a solução de ácido sulfúrico 0,005M (H₂SO₄) como fase móvel na vazão de 0,6mL/min e 20 µL de volume de amostra.

4.11 Análise sensorial da cerveja

A análise sensorial das cervejas foi determinada por um modelo de ficha recomendada pelo BJCP (*Beer Judge Certification Program*), uma das classificações de cerveja mais aceitas do mundo, modificada para este trabalho (Apêndice 2). Foram avaliados os parâmetros de aroma e sabor (ésteres, fenóis, álcool, acidez e dulçor) para a

classificação de nenhum, baixo, médio e alto (escala de 0 a 6) por nove degustadores treinados e familiarizados com a ficha de avaliação. Além disso, os avaliadores marcaram os aromas e sabores identificados e responderam os questionamentos da ficha. Os avaliadores foram informados sobre a forma, os riscos e o objetivo da pesquisa. Após a concordância em participar do estudo, foi realizada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos mesmos (Apêndice 3). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFRGS pelo número do parecer 2.159.349.

4.12 Análise Estatística

O perfil de floculação, o crescimento em diferentes temperaturas e os valores de compostos voláteis foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença estatística, foi aplicado o teste de *Tukey*. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 7.04 com nível de confiança de 95% e todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento de Leveduras de Frutos

As leveduras utilizadas neste estudo foram obtidas de 58 frutos entre polpa (57) e casca (31). Para isso, a casca ou a polpa dos frutos foi adicionada ao mosto cervejeiro estéril suplementado com cloranfenicol, para evitar o crescimento bacteriano, e incubado a 28°C para a fermentação. Ao fim da fermentação, foi obtido o total de 92 isolados com características morfológicas de levedura, 32 a partir da casca e 60 da polpa dos frutos. Após esta etapa, os isolados foram submetidos aos testes de exclusão para a seleção de leveduras com fenótipos interessantes para a produção de cerveja, sendo selecionados 13 isolados (seis da casca e sete da polpa dos frutos) (Tabela 1).

Tabela 1. Isolamento de Leveduras a partir de Diferentes Frutos. As leveduras foram isoladas a partir de cinco frutos diferentes, resultando no total de 92 isolados, 60 da polpa e 32 da casca.

Fonte	Frutas (n)	Casca (n)	Polpa (n)	Isolados		Selecionados	
				casca	polpa	casca	polpa
LIMÃO SICILIANO	1	1	0	2	0	1	0
TANGERINA	38	30	38	30	42	5	5
AMEIXA	5	0	5	0	8	0	1
LIMÃO TAITI	11	0	11	0	10	0	1
LARANJA	3	0	3	0	0	0	0
TOTAL	58	31	57	32	60	6	7

5.2 Seleção das Leveduras por Testes de Exclusão

Os testes de exclusão foram realizados para selecionar os isolados quanto à capacidade de fermentação de três fontes de carboidratos diferentes presentes no mosto cervejeiro: glicose, sacarose e maltose (Figura 4). Também foram avaliados a produção do *off flavor* H₂S (Figura 5); tolerância ao estresse osmótico do mosto (Figura 6) e tolerância ao estresse por diferentes concentrações de etanol. Dos 92 isolados iniciais, 13 (14%) foram selecionados por apresentarem fenótipos interessantes para a produção de cerveja. Os selecionados apresentaram capacidade de fermentação de glicose, sacarose e maltose, apresentando pontuação de +2 ou +3. Quanto à produção de H₂S, foram selecionados isolados com baixa ou nenhuma produção de H₂S e excluídos os isolados com produção média ou alta. Os isolados também apresentaram capacidade de tolerância

ao estresse osmótico (11°P, 17°P e 25°P) e por etanol nas concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10%. Os isolados selecionados para as próximas análises do estudo foram: CL011, PB111, PB113, CB341, PB341, PB381, CB382, PB383, CB392, CB481, CB484, PA511, PL612.

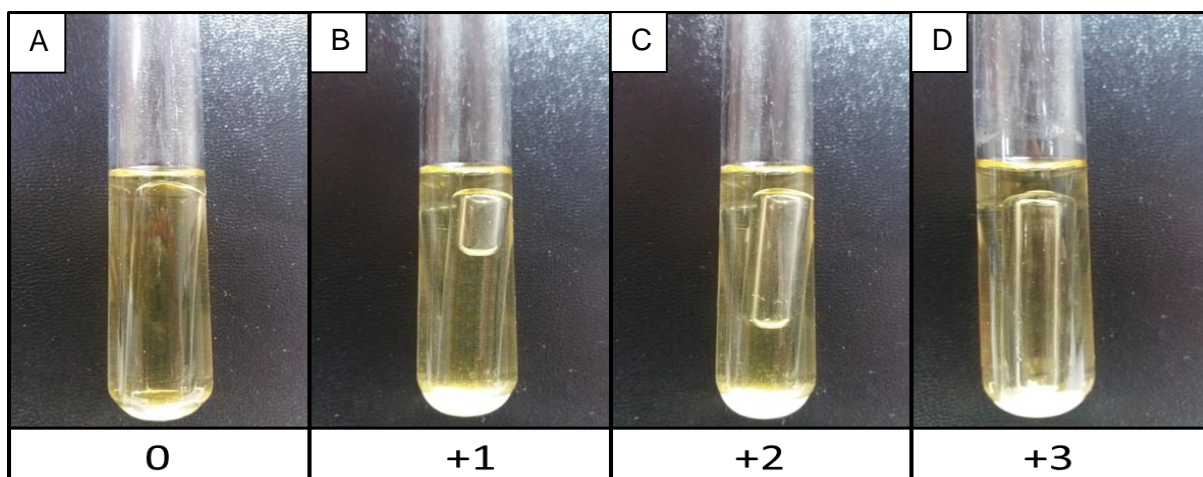


Figura 4. Leitura da Capacidade Fermentativa. (A) Pontuação 0: sem produção de gás (resultado: fermentação negativa). (B) Pontuação +1: 1/3 do tubo de Durham preenchido por gás (resultado: fermentação fraca). (C) Pontuação +2: 2/3 do tubo de Durham preenchido por gás (resultado: fermentação forte). (D) Pontuação +3: tubo de Durham completamente preenchido por gás (resultado: fermentação forte).

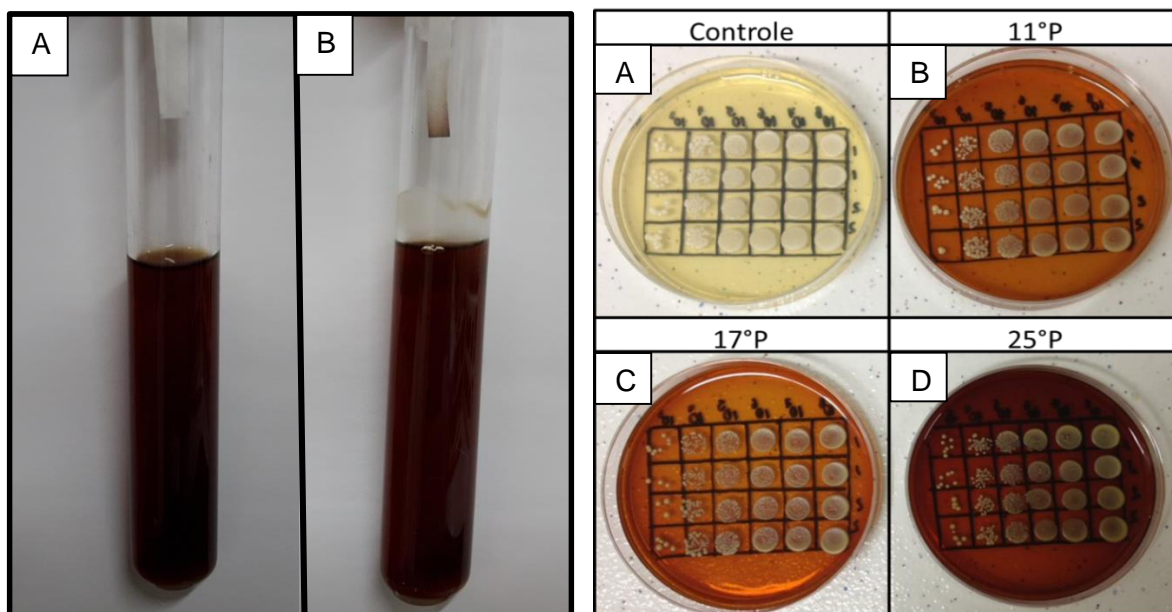


Figura 5. Produção de H_2S . A coloração escura da fita impregnada com acetato de chumbo demonstra a produção de H_2S . (A) sem produção de H_2S (negativo). (B) produção de H_2S (+1).

Figura 6. Tolerância ao Estresse Osmótico. A tolerância dos isolados ao estresse osmótico foi testada pelo *drop test*. (A) Meio YPD 2%. (B) Extrato de malte a 11°P. (C) Extrato de malte a 17°P. (D) Extrato de malte a 25°P.

5.3 Testes Morfológicos e Sequenciamento

As treze leveduras selecionadas foram avaliadas morfológicamente por suas características coloniais e celulares. Também foram avaliadas quanto à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em 10% e 16% de NaCl, crescimento em 0,1% e 0,01% de ciclohexamida e identificação molecular pelo sequenciamento das regiões D1/D2 ou ITS do rDNA (Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5). Das 13 leveduras selecionadas, quatro foram identificadas como do gênero *Saccharomyces* (três da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e uma *Saccharomyces* sp.) e apresentaram as características macroscópicas de coloração creme, forma circular, margem inteira, elevação convexa, superfície rugosa, colônia fosca, consistência cremosa, forma celular arredondada ou ovalada e reprodução por brotamento. Quanto à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram competentes para glicose, sacarose, maltose, galactose, trealose, rafinose, inulina, etilamina e peptona, apresentando variação para glicerol, creatina e lisina.

Oito isolados foram identificados como a espécie *Wickerhamomyces anomalus* e apresentaram as características macroscópicas de coloração branca, forma circular, margem ondulada, elevação papilada, superfície rugosa, colônia fosca, consistência cremosa, forma celular ovalada e reprodução por brotamento. Para a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram competentes para glicose, sacarose, maltose, galactose, trealose, xilose, salicina, lactato, glicerol, eritritol, amido solúvel, nitrato, lisina, etilamina e peptona, apresentando variação quanto à assimilação de succinato, inulina, rafinose, citrato, ribitol, celobiose e creatina. Um isolado (PL612) foi identificado como *Kurtzmaniella* sp., pertencente a uma nova espécie de levedura ainda não descrita, apresentando coloração branca, forma circular, margem filamentosa, elevação convexa, superfície rugosa, colônia fosca, consistência cremosa, forma celular ovalada e reprodução por brotamento. O isolado foi depositado na coleção de leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais, código UFMG-CM-Y6348. Quanto à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foi competente para glicose, sacarose, maltose, galactose, trealose, xilose, salicina, N-acetilglicosamina, lactato, succinato, rafinose, ribitol, citrato, glicerol, eritritol, amido solúvel, lisina, etilamina e peptona, com destaque para as fontes de carbono trealose e N-acetilglicosamina, apresentando, respectivamente, leitura nos valores de quatro e cinco, enquanto glicose apresentou leitura no valor três.

Devido à falta de conhecimento sobre a segurança alimentar da levedura PL612, a mesma foi excluída das demais etapas do estudo.

As leveduras não apresentaram produção de compostos amiloides, crescimento em ciclohexamida 0,1% ou 0,01% ou NaCl 16%. Apenas as leveduras CB341, PB341, PB381, PB383, CB392, CB481 e CB484 da espécie *Wickerhamomyces anomalus* apresentaram crescimento em NaCl 10%.

Tabela 2. Morfologia Colonial das Leveduras Isoladas.

Isolados	Cor	Forma	Margem	Elevação	Superfície	Brilho	Consistência
CLO11	Creme	Circular	Inteira	Convexa	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB111	Creme	Circular	Inteira	Convexa	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB113	Creme	Circular	Inteira	Convexa	Rugosa	Fosca	Cremosa
CB341	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB341	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB381	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
CB382	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB383	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
CB392	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
CB481	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
CB484	Branca	Circular	Ondulada	Papilada	Rugosa	Fosca	Cremosa
PA511	Creme	Circular	Inteira	Convexa	Rugosa	Fosca	Cremosa
PB612	Branca	Circular	Filamentosa	Convexa	Rugosa	Fosca	Cremosa

Tabela 3. Morfologia Celular e Sequenciamento Molecular.

Isolados	Forma da célula	Tipo de Reprodução	Identificação molecular	Código de Acesso Genbank*	Identidade**
CLO11	Arredondado	Brotamento	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CP006458.1	99%
PB111	Ovalado	Brotamento	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG_042623.1	100%
PB113	Ovalado	Brotamento	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG_042623.1	100%
CB341	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	100%
PB341	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	100%
PB381	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	99%
CB382	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	100%
PB383	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	100%
CB392	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY110078.1	99%
CB481	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY105894.1	99%

CB484	Ovalado	Brotamento	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KY105894.1	99%
PA511	Ovalado	Brotamento	<i>Saccharomyces</i> sp.	KU535593.1	87%
PB612	Ovalado	Brotamento	<i>Kurtzmaniella</i> sp. nov.	LN909479.1	100%

*Código de acesso da sequência tipo mais próxima depositada no GenBank, com exceção de PL612.

** Identidade em comparação com a sequência mais próxima depositada no GenBank.

Tabela 4. Assimilação de Fontes de Carbono.

Fontes Carbono	CL011	PB111	PB113	CB341	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484	PA511	PL612
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Acetona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactato	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N-acetil Glicosamina Succinato	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	v	+	+	+	+	-	-	+	+
Ribitol	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Celobiose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrato	-	-	-	+	v	-	-	-	-	-	v	-	+
Glicerol	v	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Eritritol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Inulina	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Amido solúvel	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

V: crescimento variável

+: crescimento positivo

-: crescimento negativo

Tabela 5. Assimilação de Fontes de Nitrogênio.

Fontes Nitrogênio	CL011	PB111	PB113	CB341	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484	PA511	PL612
-------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Nitrato	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-lisina	-	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatina	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-
Peptona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

V: crescimento variável

+: crescimento positivo

-: crescimento negativo

Tabela 6. NaCl, Ciclohexamida e Compostos Amiloides.

Outros	CL011	PB111	PB113	CB341	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484	PA511	PL612
NaCl 10%	-	-	-	+	v	v	-	+	+	+	+	-	-
NaCl 16%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexamida 0,1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexamida 0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Compostos amiloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.4 Análise dos Compostos Voláteis

Para análise dos compostos voláteis, as leveduras selecionadas foram submetidas a microfermentações em 5 mL de mosto cervejeiro por 48h, sendo em seguida avaliadas quanto à produção de ésteres, terpenos, lactonas, C₁₃-norisoprenoides, álcoois superiores e ácidos graxos por cromatografia gasosa - FID. A produção dos compostos voláteis foi quantificada em µg/L para determinar o valor da atividade olfativa (OAV - média das concentrações/pelo limiar de percepção olfativa). Os valores quantificados em µg/L, o OAV e o *Heat map* dos valores de OAV estão descritos, respectivamente no Apêndice 4, Tabela 7 e Figura 7).

Dois critérios foram escolhidos para produção das cervejas: o sequenciamento e os perfis aromáticos. Com base nestes critérios as leveduras escolhidas foram *Saccharomyces cerevisiae* (CL011), *Saccharomyces cerevisiae* (PB111), *Saccharomyces cerevisiae* (PB113), *Saccharomyces* sp (PA511) e *Wickerhamomyces anomala* (CB341).

Destas leveduras, nenhuma apresentou OAV>1 para acetato de etila, acetato de isoamila, isobutanoato de etila, laurato de etila, nonanoato de etila, acetato de isobutila, 3-metil 1-butanol, 1-propanol, ácido cáprico, ácido isobutírico e ácido valérico. A

levedura *Saccharomyces cerevisiae* CL011 demonstrou grande destaque para os ésteres, terpenos, lactona, C₁₃-norisoprenoides e álcoois, apresentando valores de OAV>1 e maiores que as leveduras cervejeiras controle, apresentando os valores de OAV para os ésteres cinamato de etila: 361120,97; heptanoato de etila: 186128,28; lactato de etila: 1913,66; tioacetato de S-furfurila: 438916,21; antranilato de etila: 825470,11; acetato de feniletila: 7706,42. Outros compostos se destacaram obtendo valores OAV para β -damascenona: 42477836,74; β -ionona: 5105798,336 e 336 e γ -nonalactona: 165832,7395; β -pineno: 1140950,438; citronelal: 85728,07082; geraniol e os álcoois superiores álcool furfurílico: 8212,337 e 2-feniletanol: 287,4878. Além disso, foi a única levedura produtora de succinato de dietila acima do limiar de percepção. Quanto à análise dos ácidos graxos, foi demonstrada elevada produção de alguns compostos apresentando valores de OAV para ácido caprótico: 14513,46; ácido octanoico: 495,5687; ácido propanoico: 738,763 e ácido pelargônico: 82,34320. O isolado PA511 apresentou destaque para os ésteres isovalerato de etila: 28708,87; 2-metilbutanoato de etila: 45,93; pentanoato de etila: 82,71, acetato de furfurila: 10,18 e na produção de limoneno: 28708,8669, sendo o único isolado da espécie *Saccharomyces* a produzir tais compostos. As *S. cerevisiae* PB111 e PB113 não apresentaram grande destaque para os valores de OAV para os compostos voláteis em comparação com os controles e com as linhagens selecionadas. As leveduras da espécie *W. anomalus* em comparação com as linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram uma maior variedade de ésteres e destacando os ésteres acetato de hexila, butanoato de etila, hexanoato de etila, decanoato de etila e undecanoato de etila, bem como, entre os grupos químicos de terpenos (α -pineno e α -terpineol) e lactonas (α -ionona). Quanto aos de ácidos graxos as leveduras PB383 e CB484 apresentaram OAV>1 para os compostos ácido heptanóico: 11,27 e ácido isovalérico: 2714,18, respectivamente.

Tabela 7. Valor da Atividade Olfativa (OAV). Valores de OAV das leveduras selecionadas para os compostos voláteis analisados. Valores >1 estão dentro do limiar de percepção.

Ésteres	Aroma	US05	WB06	w34/70	T-58	CL011	PB111	PB113	CB341
Acetato de etila	Frutado	-	-	0,04	-	-	-	-	-
Acetato de hexila	Frutado	-	0,56	0,56	-	-	0,22	-	0,49
Acetato de isoamila	Banana	-	-	-	-	-	-	-	-
Butanoato de etila	Abacaxi	-	-	-	-	-	-	-	850,97
Cinamato de etila	Mel, morango, ameixa	614,85	1911,77	1809,77	936,01	361120,97	1441,94	220,14	1768,83

Hexanoato de etila	Maçã verde	1,73	-	-	-	-	-	-	-
Heptanoato de etila	Uva, Abacaxi	-	153,00	10,52	14,03	186128,28	179,01	54,56	1654,77
Isobutanoato de etila	Frutado	-	-	-	-	-	-	-	-
Isovalerato de etila	Frutado, maçã	99,79	-	-	28708,87	-	-	-	764,52
Lactato de etila	medicamento, morango	0,01	8,91	5,09	5,43	1913,66	9,05	7,39	9,49
Laurato de etila	Frutado	0,32	-	-	-	-	-	-	-
2-metilbutanoato de etila	Morango, frutas doces	26,30	-	52,92	-	-	-	-	41,22
Nonanoato de etila	Frutado	0,22	-	-	-	-	-	-	-
Octanoato de etila	Frutado, abacaxi, pêra	9,11	1,25	1,26	0,72	-	1,03	-	0,77
Pentanoato de etila	Maçã	-	-	-	-	-	-	-	63,34
Succinato de dietila	Frutado	-	0,21	0,24	0,20	48,84	0,19	0,20	0,20
Tioacetato de S-furfurila	Tostado	95877,10	882,15	834,78	-	438916,21	118,05	-	1725,55
Undecanoato de etila	Coco	-	-	-	-	-	-	-	-
Decanoato de etila	Frutado, uva	117,92	-	-	-	-	-	-	-
Antranilato de etila	Frutado, Floral	-	8537,79	11545,04	44,68	825470,11	809,17	421,28	3171,04
Acetato de isobutila	Frutado, Floral	-	-	0,62	-	-	-	-	-
Acetato de feniletila	Floral	-	9,26	43,96	14,23	7706,42	34,37	20,66	13,11
Acetato de furfurila	Floral/Tostado	100,67	-	-	-	-	-	-	5,54
Terpenos	Aroma	US05	WB06	w34/70	T-58	CL011	PB111	PB113	CB341
α-ionona	Frutado, floral, framboesa	366,34	-	-	-	-	-	-	-
α-pineno	Herbal, madeira	-	-	9157,59	-	-	-	-	-
α-terpineol	Floral, doce, anis, menta	200,95	-	-	-	-	-	-	-
β-damascenona	Rosas	-	67535,74	-	-	42477836,74	152845,48	-	220750,09
β-ionona	Violeta, balsâmico, rosas	95950,50	15428,72	14925,04	15429,31	5105798,34	7471,59	15614,22	-
β-pineno	pinho, resina, terebintina	-	6924,03	3846,20	4094,44	1140950,44	4646,43	15251,88	-
β-terpineol	Madeira	-	700482564,10	-	-	-	573372831,80	-	-
Cedreno	Madeira	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronelal	Citronela	-	264,14	349,01	109,26	85728,07	23-33448	118,04	166,03
Geraniol	Rosas, gerânio	7,94	5,95	6,22	4,46	1709,18	6,24	5,66	7,53
Limoneno	cítrico	-	-	-	28708,87	-	-	-	-
γ-nonalactona	Coco, pêssego	26457,50	615,70	806,97	549,89	165832,74	748,06	664,14	795,44
Álcoois superiores	Aroma	US05	WB06	w34/70	T-58	CL011	PB111	PB113	CB341
Metanol	Alcólico	-	-	-	-	-	-	-	-
n-butanol	Alcólico	-	0,03	0,03	0,02	-	0,02	-	0,04
Sec-butanol	Alcólico, frutado	-	-	3846,20	-	-	-	-	-
3-metil 1-butanol	Solvente	0,01	0,06	-	0,02	-	-	-	-
1-propanol	Alcólico	-	-	-	-	-	-	-	-
1-hexanol	Herbáceo, gorduroso	5,85	-	-	-	-	-	-	-
Álcool furfúrico	Tostado	215,50	28,15	0,28	-	8212,34	47,45	30,71	23,15
2-feniletanol	Rosas	-	0,49	0,90	0,94	287,49	1,33	0,99	0,39
Ácidos orgânicos	Aroma	US05	WB06	w34/70	T-58	CL011	PB111	PB113	CB341
Ácido butanoico	vômito, rançoso	0,68	43,03	48,79	34,46	-	-	-	-
Ácido cáprico	animal, rancidez	0,09	0,27	0,15	0,09	23,00	0,09	0,06	0,04

Citronelal	Citronela	253,14	377,21	349,72	-	276,94	12,12	170,41	421,27
Geraniol	Rosas, gerânio	10,60	6,59	7,13	275,20	3,31	32,00	8,76	6,24
Limoneno	cítrico	502,00	-	-	-	-	-	-	28708,87
γ -nonalactona	Coco, pêssego	682,12	734,07	644,96	37983,01	640,95	699,99	682,58	641,53
Álcoois superiores	Aroma	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484	PA511
Metanol	Alcólico	-	-	-	-	-	-	-	-
n-butanol	Alcólico	0,03	-	0,02	-	0,02	0,02	-	0,02
Sec-butanol	Alcólico, frutado	-	-	-	-	-	-	-	-
3-metil 1-butanol	Solvente	-	-	-	0,04	-	-	-	0,03
1-propanol	Alcólico	-	-	-	-	-	-	-	-
1-hexanol	Herbáceo, gorduroso	-	-	-	-	-	-	-	-
Álcool furfúrico	Tostado	30,90	34,23	31,23	144,93	37,01	20,73	20,12	26,27
2-feniletanol	Rosas	0,95	1,09	0,97	-	0,44	0,97	1,12	0,84
Ácidos orgânicos	Aroma	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484	PA511
Ácido butanoico	vômito, rançoso	-	-	-	1,54	-	-	-	37,09
Ácido cáprico	animal, rancidez	0,09	0,10	0,08	0,08	0,27	0,06	0,27	0,09
Ácido caproico	rancidez, gorduroso	53,70	54,16	42,40	1,98	24,68	53,16	52,01	60,03
Ácido heptanoico	Rancidez	2,33	2,30	2,54	11,27	1,05	2,33	2,76	1,50
Ácido isobutírico	queijo	-	-	-	0,17	-	-	-	-
Ácido isovalérico	Doce, queijo, rancidez	-	213,72	-	-	489,96	-	2714,18	-
Ácido octanoico	Rancidez,, queijo, sabão	1,64	2,06	1,78	0,69	1,23	1,77	0,10	0,66
Ácido propanoico	suor	2,68	3,78	3,92	0,59	2,96	1,67	-	2,71
Ácido pelargônico	ranço	0,40	0,40	0,36	0,88	0,35	0,28	-	0,34
Ácido valérico	chulé	-	-	-	0,05	-	-	-	-
Ácido n-undecanoico	sabão	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido 10-undecanoico	sabão	-	-	-	-	-	-	-	-

5.5 Caracterização das Leveduras Seleccionadas

5.5.1 Perfil de Flocculação

As leveduras foram analisadas pelo teste de Helm's, apresentando diferença estatística entre os grupos EDTA e cálcio (flocculação dependente de cálcio $p < 0,05$, Figura 8A), com exceção da levedura CB341, que apresentou fenótipo independente de cálcio (Figura 8A, Tabela 8). Os resultados da porcentagem de flocculação pelo teste de Helm's demonstraram que CL011 é uma levedura de baixa flocculação (29,44%) e as leveduras PB111, PB113 e PA511 apresentaram flocculação média (61,86%, 57,72% e 59,58%, respectivamente (Tabela 8). A levedura CB341 apresentou flocculação baixa (40,00%) pelo teste de sedimentação. Para análise do fenótipo de flocculação, CL011 se mostrou MI,

enquanto as leveduras PB111, PB113 e PA511 se mostraram NewFLO. A levedura CB341, apesar de não dependente de cálcio teve a floculação inibida por manose (Tabela 8).

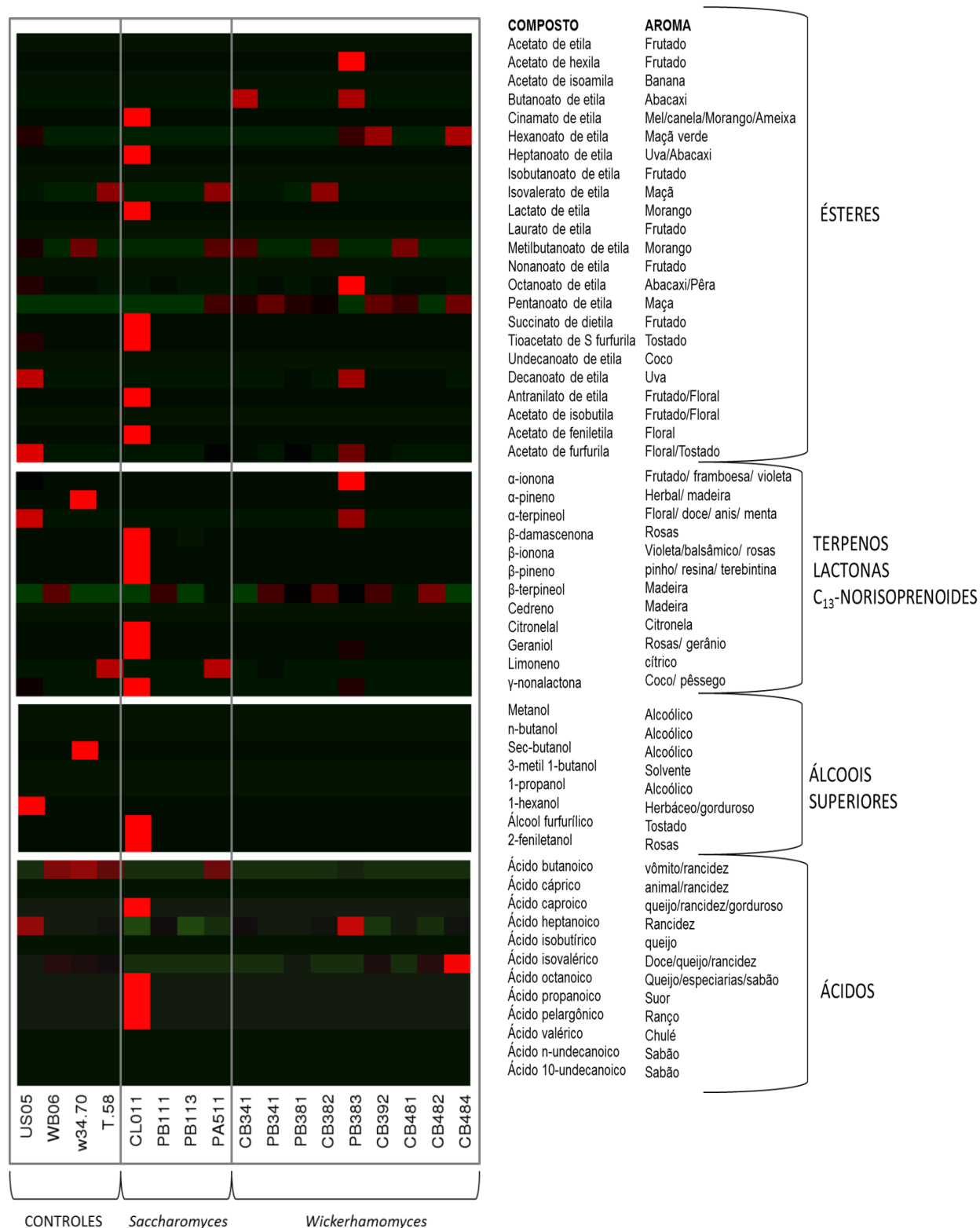


Figura 7. Heat map dos Compostos Voláteis. Heat map com os valores de OAV. Os valores estão representados em vermelho, alta produção e verde, baixa produção. A OAV dos compostos undecanoato de etila, cedreno, ácido n-undecanoico e ácido 10-undecanoico não foram calculados por falta do limiar de percepção. (Babicki *et al.*, 2016).

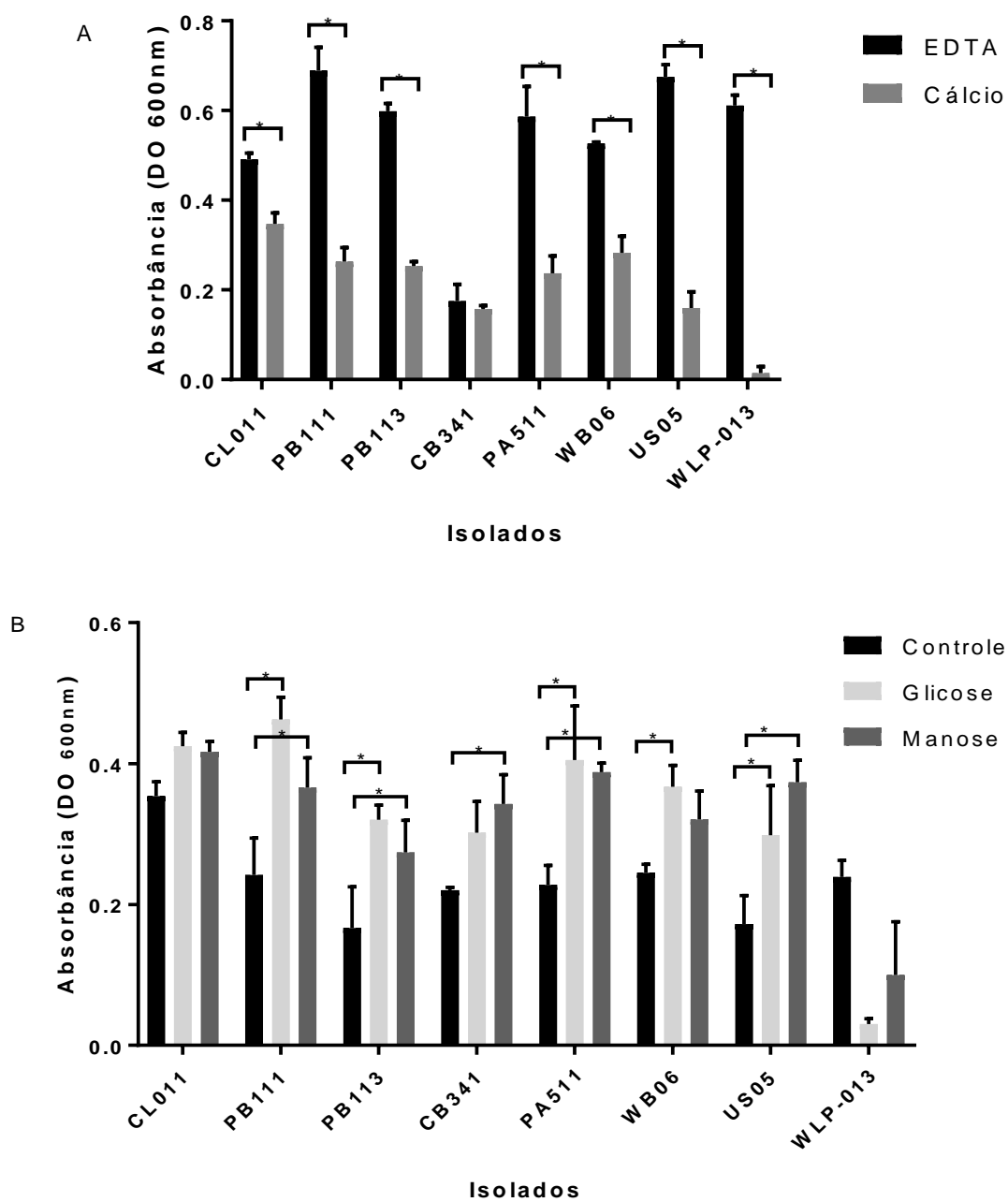


Figura 8. Perfil de Floculação. A) As leveduras foram analisadas quanto à porcentagem de floculação por espectrometria em D.O de 600nm na presença de cálcio ou do inibidor EDTA ($*P < 0.05$ vs grupo EDTA). B) As leveduras foram testadas quanto à inibição da floculação na presença de glicose ou manose. ($*P < 0.05$ vs grupo controle).

Tabela 8. Perfil de Floculação. O perfil de floculação das leveduras foi analisado quanto à porcentagem de floculação, dependência de cálcio e inibição da floculação por glicose ou manose.

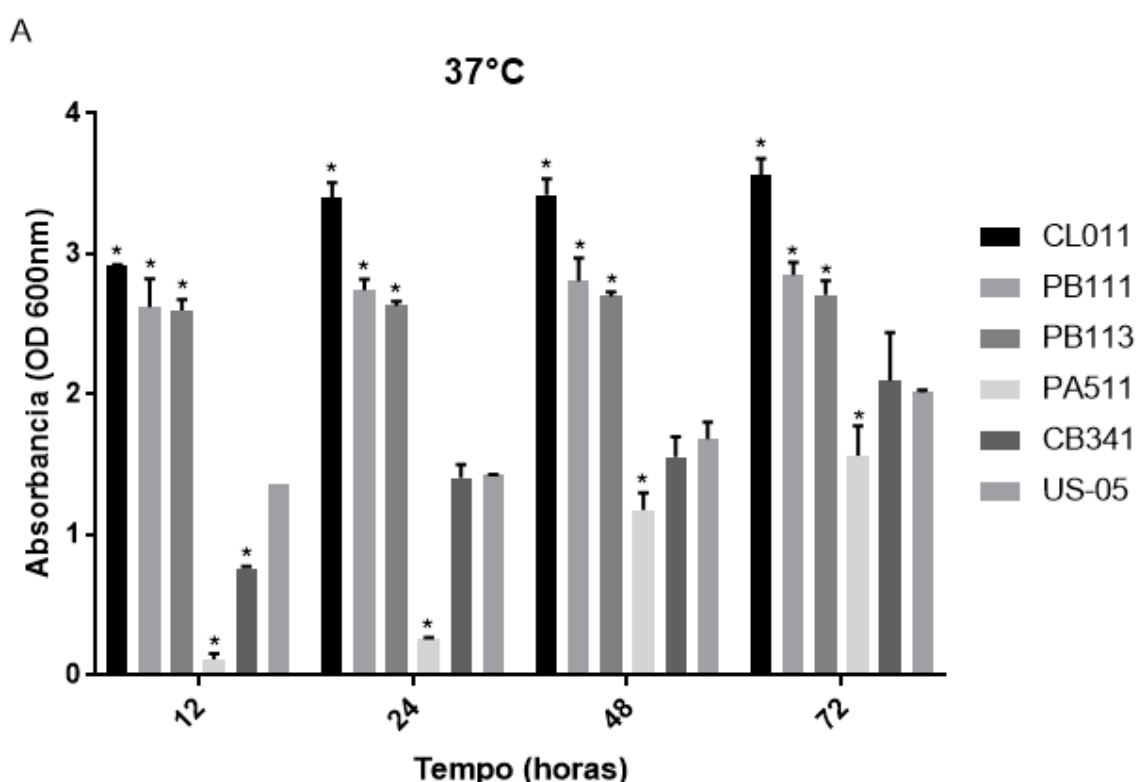
Isolados	Ca ²⁺ -dependente	% Floculação	Perfil	Glicose	Manose	Fenótipo
CL011	sim	29,44%	B	-	-	MI
PB111	sim	61,86%	M	inibidor	inibidor	NewFLO
PB113	sim	57,72%	M	inibidor	inibidor	NewFLO
CB341	não	40,00%	B	-	inibidor	-
PA511	sim	59,58%	M	inibidor	inibidor	NewFLO
WB06	sim	46,36%	B	inibidor	-	NewFLO
US05	sim	76,30%	M	inibidor	inibidor	NewFLO
WLP-013	sim	97,65%	A	-	-	MI

B: floculação baixa
M: floculação média
A: floculação alta

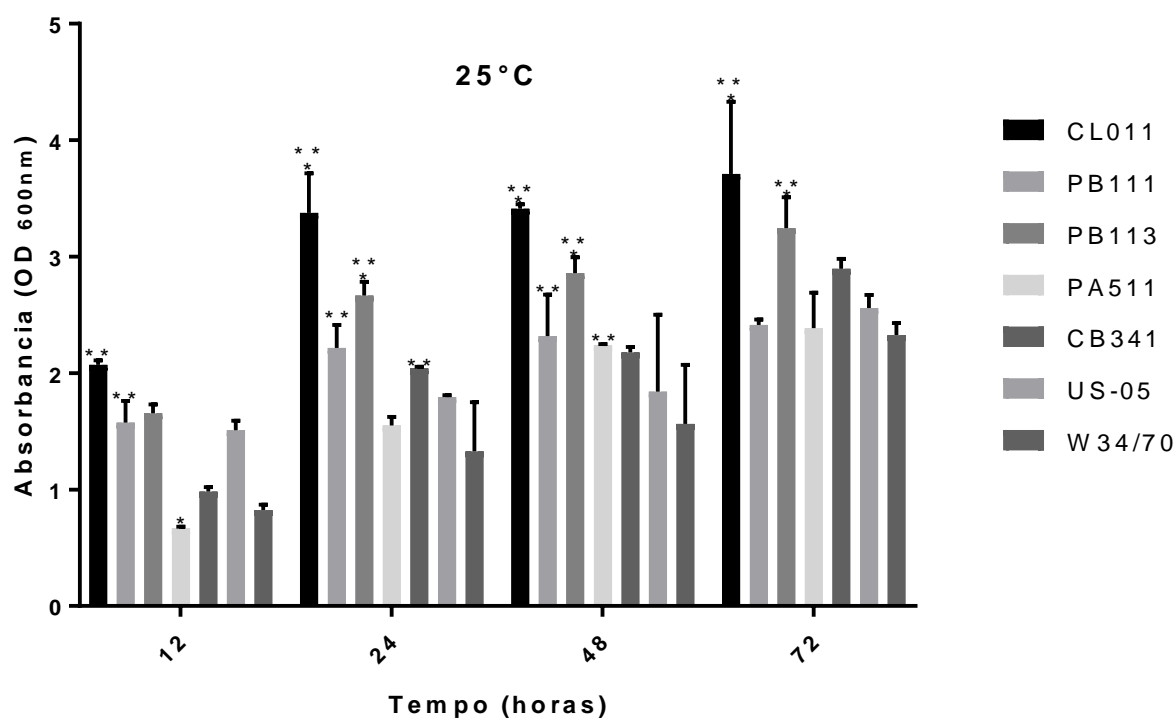
5.5.2 Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas

As leveduras selecionadas foram testadas quanto à capacidade de crescimento nas temperaturas de 15°C, 25°C e 37°C nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, sendo comparadas com US-05 em 37°C, com US-05 e W34/70 a 25°C e 15°C. CL011, PB111, PB113, PA511, CB341 e as leveduras controles US-05 (*Ale*) e W34/70 (*Lager*) apresentaram maior crescimento a 25°C. Para a temperatura de 37°C, CL011, PB11 e PB113 apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de US-05 em todos os tempos, apresentando melhor crescimento que a levedura controle; PA511 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de US-05 em todos os tempos, apresentando menor crescimento em comparação com o controle. Por fim, CB341 apresentou diferença estatisticamente significativa em 12h, demonstrando menor crescimento e não apresentou diferença estatisticamente significativa de US-05 em 24h, 48h e 72h (Figura 9A). Para a temperatura de 25°C em comparação com US-05, CL011 e PB113 apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir de 24h, demonstrando maior crescimento. PA511 apresentou diferença estatisticamente significativa em 12h, demonstrando menor crescimento e não apresentou diferença estatisticamente significativa de US-05 em 24h, 48h e 72h. PB111 e CB341 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos. Para a temperatura de 25°C em comparação com W34/70, CL011 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos testados, demonstrando maior crescimento. PB111 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em 12h, 24h e 48h, enquanto PB113 apresentou a partir de 24h, PA511 em 48h e CB341 em 24h,

todos demonstrando maior crescimento (Figura 9B). Para a temperatura de 15°C em comparação com US-05, todos os isolados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em todos os tempos, apresentando maior crescimento, com exceção de PA511 que demonstrou menor crescimento. CB341 apresentou diferença estatisticamente significativa em 12h, apresentando maior crescimento. Em comparação com W34/70, CL011, PB111 e PB113 apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em todos os tempos, apresentando maior crescimento. CB341 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) a partir de 24h, apresentando maior crescimento e PA511 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em 12 e 24h, apresentando menor crescimento e não apresentou diferença estatisticamente significativa nos demais tempos (Figura 9C).



B



C

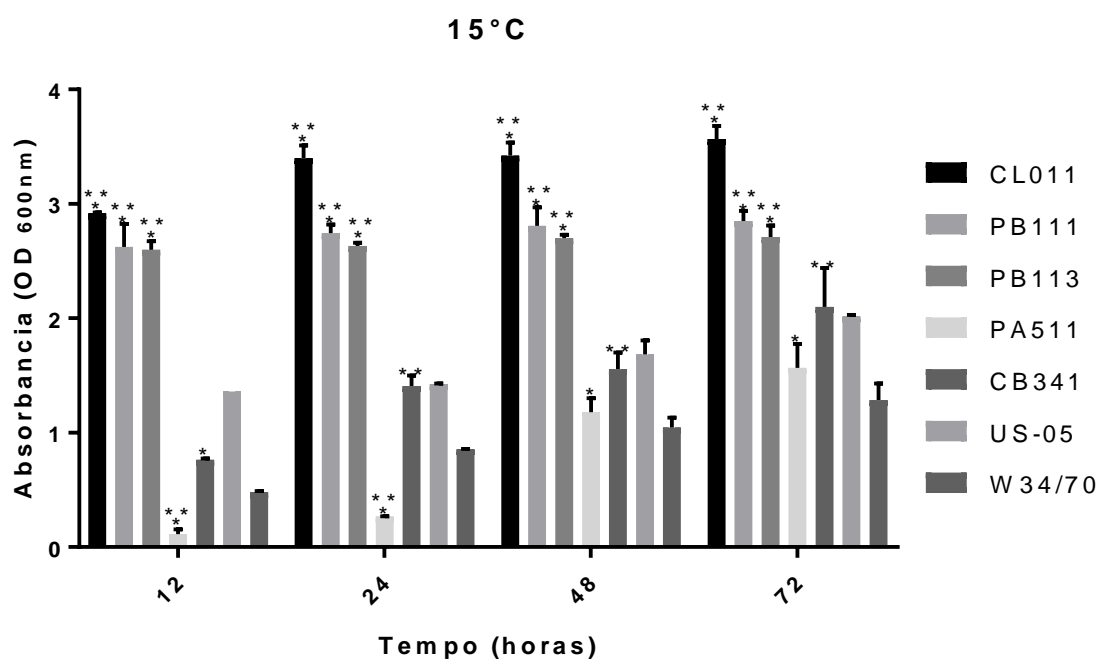


Figura 9. Crescimento dos Isolados em Diferentes Temperaturas. A) 37°C. B) 25°C. C) 15°C. (* $P < 0.05$ vs grupo US-05 e ** $P < 0.05$ vs grupo W34/70).

5.5.3 Teste de Crescimento na Presença de Etanol

As leveduras selecionadas foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento nas concentrações de 0%, 5% e 10% de etanol por 72h a 28°C, sem agitação. Para isso, foram calculadas as porcentagens de crescimento em 5% e 10% em relação a 0% e comparadas com os resultados das leveduras controles comerciais US-05, WB06, T-58 e W34/70. Os resultados de crescimento em absorbância de 600 nm estão demonstrados na figura 10. As médias das absorbâncias e os valores de porcentagens estão descritos na tabela 9. As leveduras controles apresentaram porcentagem de crescimento de 5% em relação a 0% (5/0) de 28%, 44%, 71% e 22% para US-05, WB06, T-58 e W34/70, respectivamente. As leveduras CL011, PB111, PB113 e PA511 foram consideradas com capacidade de crescimento em etanol 5%, apresentando as porcentagens de crescimento (5/0) de 40%, 47%, 53%, 29%, respectivamente, todos dentro da variação apresentada pelas leveduras controles. A levedura CB341 apresentou porcentagem de 9%, sendo considerada incapaz de crescer em 5% de etanol. Em 10% de etanol a única levedura que apresentou destaque foi PB113 com 14% de crescimento em relação a 0% de etanol.

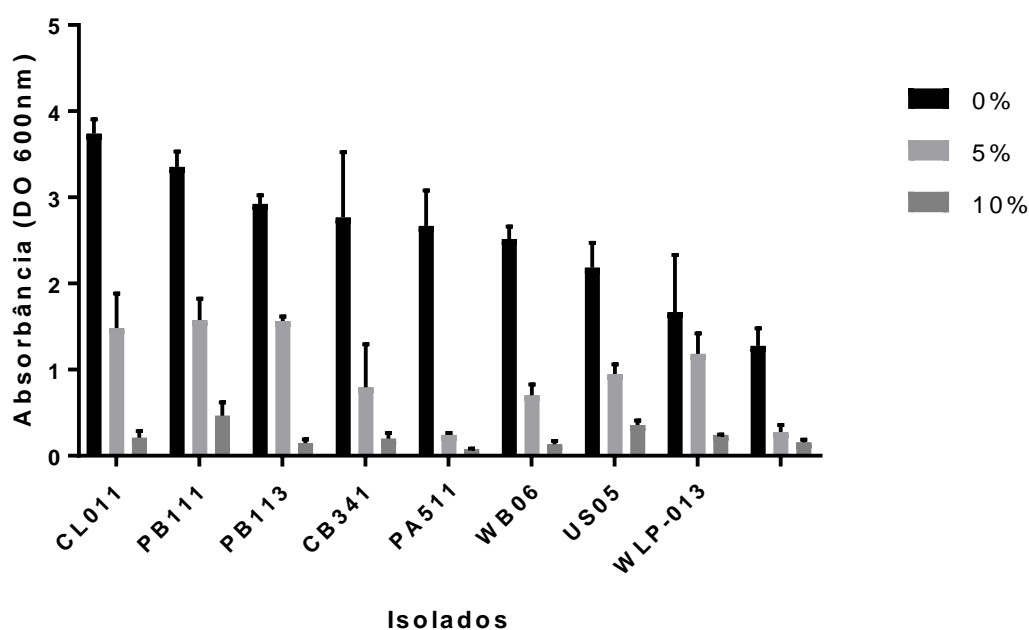


Figura 10. Crescimento na Presença de Etanol. Valores de absorbância em 600nm após 72h de crescimento a 28°C em meio YPD 2% com 0, 5 ou 10% de etanol.

Tabela 9. Porcentagens de Crescimento em Etanol.

Isolados	* \bar{X} (0)	* \bar{X} (5)	* \bar{X} (10)	** \bar{X} (5/0)%	** \bar{X} (10/0)%
CL011	3,74	1,48	0,21	40%	6%
PB111	3,35	1,58	0,47	47%	14%

PB113	2,93	1,56	0,15	53%	5%
PA511	3,31	0,79	0,20	29%	7%
CB341	2,67	0,24	0,08	9%	3%
US-05	2,52	0,70	0,13	28%	5%
WB-06	2,18	0,95	0,36	44%	16%
T-58	1,67	1,18	0,24	71%	15%
W34/70	1,28	0,28	0,15	22%	12%

* \bar{X} (0), \bar{X} (5) e \bar{X} (10): média dos valores de absorvância em YPD 2% com 0, 5 ou 10% de etanol.

** \bar{X} (5/0)% e \bar{X} (10/0)%: porcentagens de crescimento de 5% e 10% em relação ao crescimento em 0% de etanol.

5.5.4 Teste de Fermentação em Mosto Cervejeiro

Com o objetivo de conhecer o potencial de fermentação das leveduras selecionadas, as mesmas foram inoculadas em mosto cervejeiro, ajustado para 10°P, sendo incubadas a 25°C por 10 dias. Nos dias 0 e 10 foram realizadas as leituras em refratômetro de uma amostra do mosto para o cálculo de atenuação aparente e ABV estimado. Os valores foram ajustados para densidade em g/cm³. Os valores de atenuação e ABV estimado das leveduras controles comerciais foram os mesmos valores apresentados pelas leveduras CL011, PB111 e PB113 (80,00% de atenuação e ABV estimado de 4,19%). As leveduras PA511 e CB341 apresentaram atenuação menor e, conseqüentemente, menor ABV estimado (50,00% e 2,61%; 17,50% e 0,92%, respectivamente) (Tabela 10).

A avaliação da velocidade de fermentação foi realizada por gravimetria durante as primeiras 96h, com a leitura realizada diariamente. A partir das pesagens dos tubos, foi realizado o cálculo do desprendimento de CO₂ em gramas. Todas as leveduras analisadas apresentaram bons resultados para a velocidade de fermentação, com destaque para PB111 e PB113 (Figura 11).

No dia 10, foi coletada uma amostra do mosto para a análise do açúcar redutor pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). As leveduras CL011, PB111 e PB113 apresentaram as maiores concentrações de açúcares residuais (63,18 g/L; 64,47 g/L e 58,74 g/L, respectivamente) e consumiram 93,68%, 93,55% e 94,13% dos açúcares presentes no mosto, semelhantes aos valores apresentados pelas leveduras controles comerciais. As leveduras PA511 e CB341 apresentaram menores concentrações de açúcares residuais e maior consumo dos açúcares do mosto (34,16 g/L, 95,58% e 29,72 g/L, 97,03%, respectivamente) (Tabela 10). Os valores da curva padrão de maltose estão demonstrados no Apêndice 5.

Tabela 10. Atenuação, ABV e Açúcar Redutor.

Isolados	*Atenuação	**ABV Estimado	Açúcar residual [] g/L	% Açúcar consumido
CL011	80,00%	4,19%	63,18	93,68%
PB111	80,00%	4,19%	64,47	93,55%
PB113	80,00%	4,19%	58,74	94,13%
PA511	50,00%	2,61%	34,16	96,58%
CB341	17,50%	0,92%	29,72	97,03%
US-05	80,00%	4,19%	56,34	94,37%
WB-06	80,00%	4,19%	53,75	94,62%
w34/70	80,00%	4,19%	52,27	94,77%
T-58	80,00%	4,19%	49,87	95,01%

*Atenuação: porcentagem de açúcar transformado em etanol e CO₂.

**ABV: porcentagem de etanol (v/v).

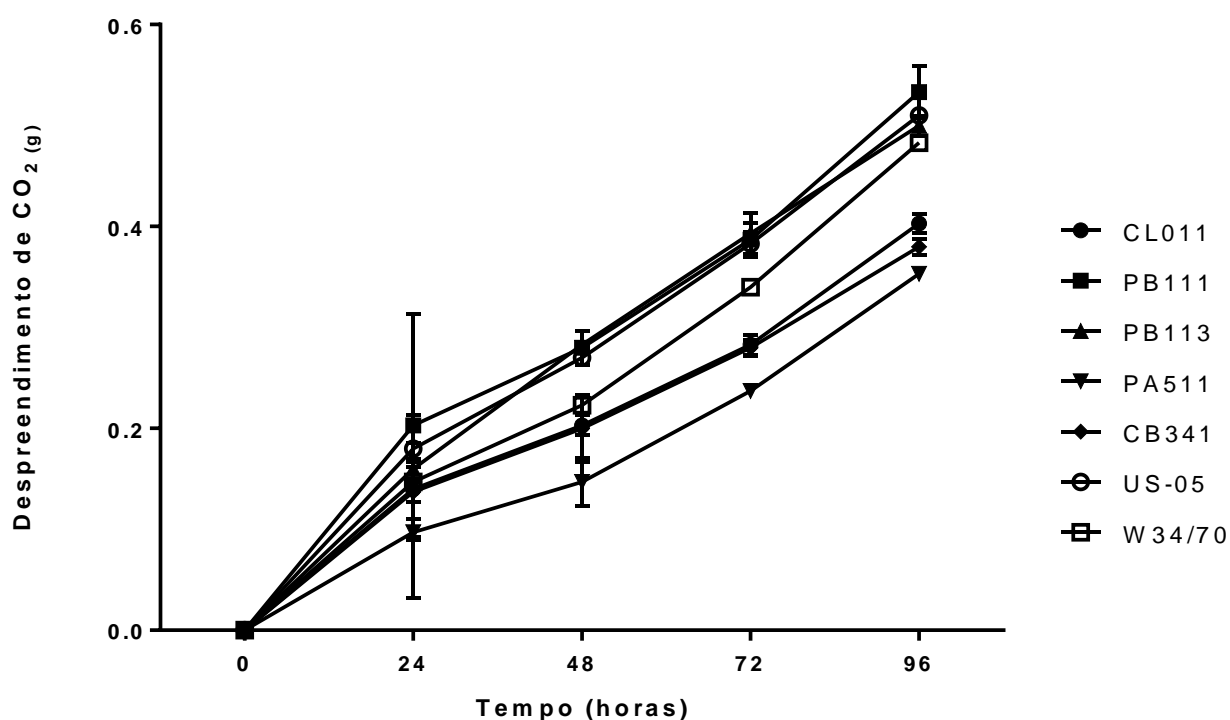


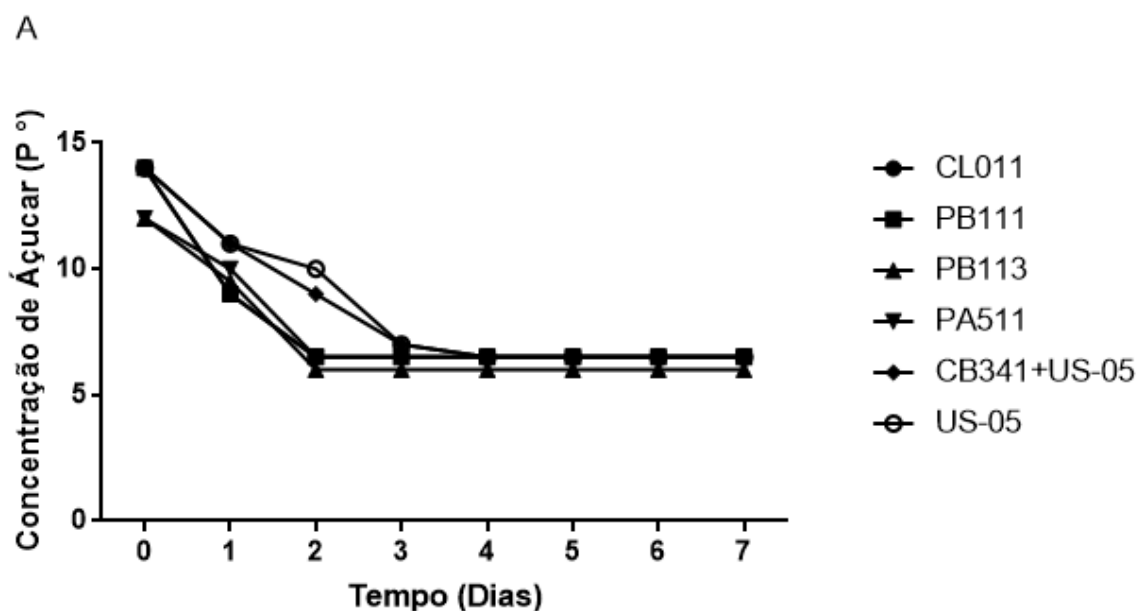
Figura 11. Desprendimento de CO₂ durante a Fermentação do Mosto.

5.5.5 Produção de Toxina Killer

A levedura CB341 foi avaliada quanto à produção de toxina *killer* versus a levedura US05 para a avaliação de uma cultura mista entre as mesmas. Não foi observada nenhuma interferência no crescimento e na viabilidade de ambas as leveduras.

5.6 Produção de Cerveja

Os isolados CL011, PB111, PB113, PA511 e CB341 e a levedura controle comercial US-05 foram testados para a produção de cerveja. CL011, PB111, PB113, PA511 e US-05 foram empregados como culturas puras, enquanto CB341 foi inoculado unicamente em cultura mista com US-05 na proporção de células 1:1 no dia zero. Os valores da concentração de açúcares do mosto e pH foram registrados por 7 dias (Figura 12A e 12B), apresentando valores iniciais de 14°P ou 12°P. O pH final ficou entre 4,38 e 4,65 (CLO11 pH 4,54; PB111 pH 4,56; PB113 pH 4,38; PA511 pH 4,4; CB341 + US-05 pH 4,47; US-05 pH 4,65). Após a maturação e carbonatação da cerveja, a concentração final de etanol foi determinada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência),apresentado os seguintes valores: CL011 (70,00 g/L); PB111 (65,49 g/L); PB113 (41,58 g/L); PA511 (36,30 g/L); CB341+ US-05 (60,28 g/L) e US05 (59,78 g/L) (Figura 13).



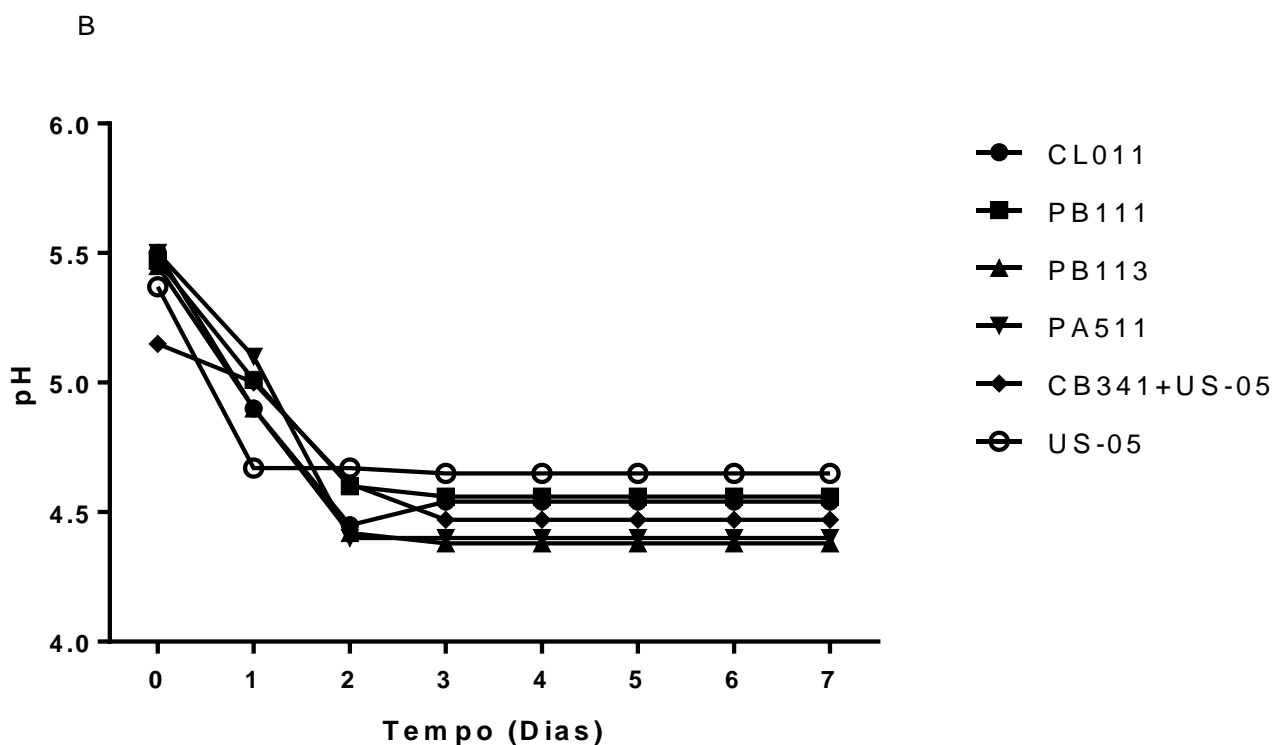


Figura 12. Produção de Cerveja. As leveduras selecionadas foram empregadas para a produção de cerveja em escala laboratorial (5L). A) Concentração de açúcar do mosto durante 7 dias de fermentação. B) pH do mosto após 7 dias de fermentação.

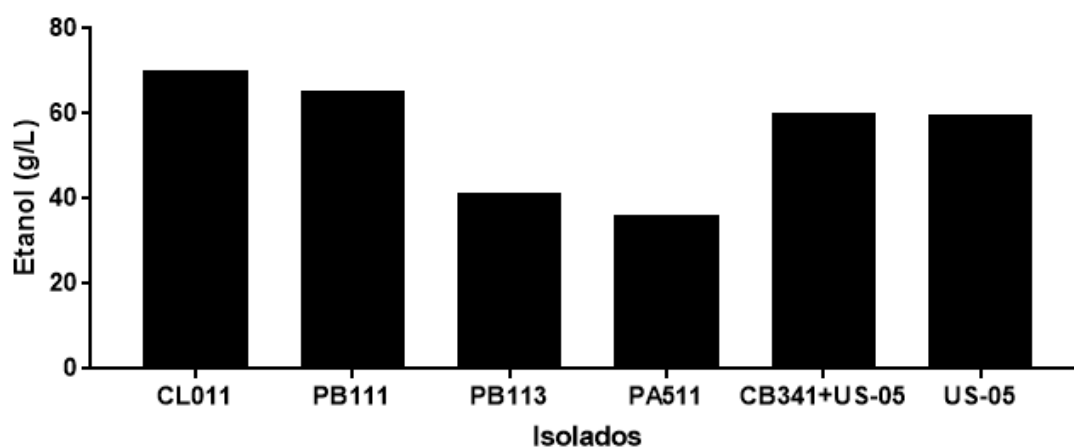


Figura 13. Quantificação do Teor de Etanol. Concentração final de etanol em g/L das cervejas produzidas com as leveduras selecionadas.

5.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por nove avaliadores treinados com a ficha do BJCP, com as cervejas produzidas pelas leveduras CL011, PB111, PB113, PA511 e uma cultura mista entre US-05 e CB341 na proporção de células 1:1. Cada amostra de cerveja foi analisada quanto ao aroma (Figura 14A) e quanto ao sabor (Figura 14B), com pontuação de 0 a 6 para os parâmetros de ésteres, fenóis, álcool, dulçor e acidez. A cultura mista entre US-05 e CB341 foi a cerveja que apresentou maior nota para aroma e sabor de ésteres (3,62; 4,00), seguida pelas cervejas produzidas com CL011 (3,28; 3,50) e PB111 (3,12; 3,37). As demais cervejas apresentaram os valores de PB113 (2,75; 2,57), PA511 (2,62; 2,43) e US-05 (2,50; 2,83). A cultura mista de CB341 com US-05, assim como CL011, apresentaram destaque para o aroma e sabor de fenóis (CB341: 3,25; 3,71, CL011: 3,12; 3,17, PB111: 2,12; 2,50, PB113: 2,62, 2,00 PA511: 1,50; 1,43, US-05 1,62; 1,28). Para o aroma e sabor de álcool as leveduras que apresentaram destaque foram US-05 (2,87; 3,86), CL011 (1,87 ;4,00), PB111 (1,87; 3,12) e a cultura mista CB341 e US-05 (1,86; 2,28). As leveduras PA511 e PB113 apresentaram os valores de 0,62; 0,43 e 1,62; 1,43, respectivamente. As leveduras apresentaram valores baixos para dulçor (CL011: 2,37; 1,83, PB111: 2,37; 2,25, PB113: 1,71; 1,43, PA511: 1,75; 1,57, CB341+US05: 2,87; 2,57, US-05: 3,00; 3,00) e acidez (CL011: 1,37; 1,43, PB111: 1,25; 1,14, PB113: 1,25; 1,28, PA511: 1,25; 0,71, CB341+US05: 1,00; 1,14, US-05: 1,00; 0,60). Os aromas e sabores selecionados pelo menos duas vezes na ficha de avaliação, assim como os estilos sugeridos para cada levedura testada estão listados na Tabela 11. Os avaliadores foram questionados se utilizariam a levedura analisada para produzir cerveja. Os resultados demonstraram que os avaliadores escolheram sim ou talvez para CL011: 75%; PB111 :71%; PB113: 62%; PA511: 100%; CB341+US-05: 100% e US-05: 86%. Quando questionados sobre a preferência pela cerveja produzida com a cultura mista de CB341 com US-05 ou somente US-05, 62,5% demonstraram preferência pela cultura mista.

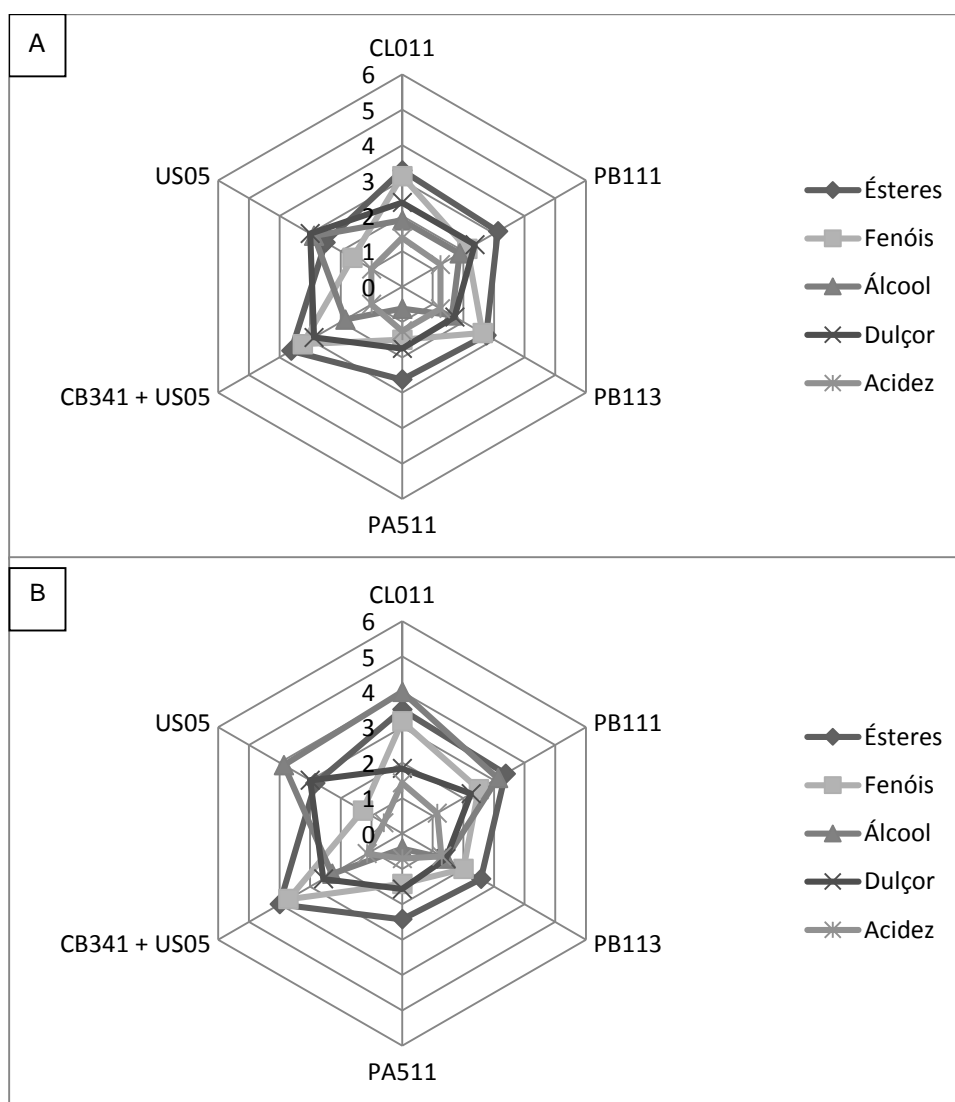


Figura 14. Análise Sensorial. As leveduras selecionadas foram analisadas quanto aos parâmetros ésteres, fenóis, álcool, dulçor e acidez. A) Análise quanto ao aroma. B) Análise quanto ao sabor.

Tabela 11. Análise Sensorial. Os aromas e sabores identificados e marcados pelo menos duas vezes na ficha de avaliação estão listados abaixo.

AROMAS e SABORES					
CL011	PB111	PB113	PA511	CB341 + US05	US05
Frutado	Frutado	Frutado	Frutado	Frutado	Frutado
Maçã/Pera	Maçã/Pera	Maçã/Pera	Maçã/Pera	Maçã/Pera	Maçã/Pera
Banana	Banana	Abacaxi	Abacaxi	Banana	Pêssego
Pêssego	Pêssego	Floral	Pêssego	Ameixa	Mel
Uva	Abacaxi	Especiarias	Uva	Mel	Doce
Ameixa	Ameixa	Mel	Ameixa	Doce	Madeira
Floral	Floral	Ácido	Floral	Canela	Álcool/Quente
Especiarias	Especiarias	Medicinal	Especiarias	Especiarias	Ameixa
Doce	Doce	Solvente/fusel	Doce	Madeira	Acetaldeído

Tostado	Mel	Álcool/Quente	Mel	Acetaldeído	Solvente/Fusel
Mel	Madeira	Autólise	Herbal	Medicinal	
Canela	Ácido	Acetaldeído	Ácido	Álcool/Quente	
Ácido	Álcool/Quente	sabão	Medicinal	Adstringente	
Álcool/Quente	Adstringente		Acetaldeído		
Adstringente			Adstringente		
			Cítrico		
			Álcool/Quente		
			Solvente/Fusel		

CERVEJAS SUGERIDAS E ESTILOS

Saison	Saison	Ales Leves	Pouco Esterificadas	Belgas Claras	Helles
Weiss	Weiss	Cervejas esterificadas	Blonde Ale	Weizenbier	Oktoberfest
Belgian Golden Ale	Belgas em Geral	Lager/ Pilsen	Kolsh	Weizenbock	Amber Lager
IPA	Estilos Lupulados	Bohemian Pilsener		IPA	Saison
Pale Ale	IPA			Bitter	Scottish
	Pale Ale			German Pilsener	Lager
				Blonde Ale	
				Saison	

6. DISCUSSÃO

As microcervejarias vêm apresentando um considerável crescimento nos últimos anos, juntamente com uma maior disponibilidade e variedade de cervejas no mercado (Brewers Association *et al.*, 2013; Abrabe *et al.*, 2015). A levedura desempenha um papel essencial na produção e na qualidade da cerveja, vinho e saquê, o que tem aumentado o número de estudos que visam o isolamento de novas linhagens e espécies com potencial para a produção e o melhoramento de bebidas alcoólicas (Pellegrine *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2005; Comitini *et al.*, 2011; Fujihara, *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2013; Tapsoba *et al.*, 2015; Figueiredo *et al.*, 2016; Gamero *et al.*, 2016; Šuranská, *et al.*, 2016).

O isolamento de leveduras a partir de uvas é comumente utilizado em estudos com o objetivo final da elaboração de vinhos. Essa fonte de isolamento, assim como outras frutas, apresenta concentrações altas de açúcares e baixo pH, fatores que favorecem o crescimento de fungos e leveduras (Guimarães *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2015; Šuranská, *et al.*, 2016). Dessa maneira, no presente estudo foram escolhidas cinco diferentes frutas como fonte de isolamento de leveduras. Para pré-selecionar leveduras competentes para a produção de cerveja e capazes de tolerar os estresses causados pelo mosto cervejeiro e pelo processo fermentativo, a casca e a polpa dos frutos foram adicionados ao mosto estéril (10°P) e incubados a 28°C e pesados até sua estabilização. Ao final da fermentação, foram obtidos 92 isolados, demonstrando que frutas podem ser uma boa fonte de isolamento de leveduras com capacidade de fermentação do mosto cervejeiro.

As características apresentadas pelas leveduras cervejeiras foram selecionadas pelo ser humano por centenas de anos, diferenciando as mesmas das leveduras selvagens. Tais características incluem a fermentação dos açúcares presentes no mosto, baixa produção de H₂S e tolerância ao estresse osmótico e por etanol (Fujihara, *et al.*, 2014; Gallone *et al.*, 2016). Essas características foram utilizadas no presente trabalho para selecionar leveduras com potencial para utilização em produção de cerveja e foram denominadas testes de exclusão. Os açúcares presentes no mosto são fermentados na seguinte ordem: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose; sendo maltose aproximadamente 50% da composição de açúcares e requerendo a presença de genes MAL para sua fermentação (Saerens *et al.*, 2010). Enquanto Marongiu e colaboradores (2015) obtiveram 9 de 12 isolados fermentadores de maltose a partir de *sourdough*, que contém maltose, nossos testes demonstraram que apenas 13 dos 92 isolados foram

capazes de fermentar glicose, sacarose e maltose, podendo estar relacionado às frutas não serem fontes de maltose e muitas selvagens não serem capazes de fermentar esse açúcar. (Gallone *et al.*, 2016). Esses 13 isolados foram selecionados para os demais testes.

A produção de H₂S confere um aroma de ovo podre à cerveja e está relacionada à linhagem da levedura e à composição do mosto, sendo resultado da incorporação de sulfato pela célula e sua redução pela atividade da enzima sulfito redutase (Mendes-Ferreira *et al.*, 2002). Para a análise do H₂S, devido à influência do meio na produção do *off flavor*, as leveduras foram inoculadas em mosto cervejeiro para a identificação das leveduras produtoras. Os 13 isolados apresentaram nenhuma ou baixa produção do composto, sendo observada maior produção de H₂S pelas leveduras não-*Saccharomyces*, resultado já descrito na literatura (Mendes-Ferreira *et al.*, 2002).

A Densidade original (OG – *Original Gravity*) indica a concentração de açúcares do mosto presentes no início da fermentação, representada em graus Plato (°P) (Saerens *et al.*, 2010). É considerado um mosto com gravidade normal entre 11 e 12 °P, enquanto o mosto com gravidade entre 14 e 17° é considerado de alta gravidade e de 18 a 25°P de muita alta densidade (Huuskonen *et al.*, 2010). Para as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, uma das estratégias para a resistência ao estresse por altas concentrações de açúcares é a via ligada à proteína Hog1, resultando no acúmulo de glicerol intracelular como osmólito (González *et al.*, 2016). O estresse por etanol inibe o crescimento celular, a viabilidade e o sistema de transporte de íons (Bai *et al.*, 2004). Dessa maneira, a tolerância ao estresse osmótico e por etanol são características importantes para a produção de cerveja. Os 13 isolados se mostraram tolerantes a ambos os estresses, resultado que pode estar relacionado à pré-seleção realizada em mosto cervejeiro, selecionando leveduras com tolerância ao estresse por etanol e osmótico.

As leveduras selecionadas foram avaliadas por testes morfológicos, incluindo a morfologia colonial e celular, além de bioquímicos e moleculares, como a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, tolerância ao NaCl e à ciclohexamida, produção de compostos amilóides e identificação taxonômica. As leveduras mais comumente isoladas de frutas cítricas são *S. cerevisiae*, seguida por *W. anomalus* e *Rhodotorula mucilaginosa* (Sheikha *et al.*, 2018), o que corrobora os nossos resultados, que apresentaram a identificação molecular das leveduras *S. cerevisiae* e *W. anomalus* com morfologia colonial e celular características dessas espécies, como os resultados para a assimilação,

crescimento em NaCl, ciclohexamida e produção de compostos amiloides, com exceção dos resultados de assimilação de inulina, lisina, creatina e etilamina para *S. cerevisiae* e de inulina para *W. anomalous*, indicando que estes testes devem ser refeitos para confirmação. Um isolado foi identificado como *Kurtzmaniella sp. nov.* necessitando de caracterização e mais estudos para sua utilização na produção de cerveja.

Além das características que são essenciais para que as leveduras sejam boas candidatas para a produção de cerveja, como as selecionadas pelos testes de exclusão, outras características auxiliam a categorizar o(s) melhor(es) estilo(s) de cerveja em que a levedura se encaixa. Atualmente existem quatro escolas cervejeiras (Belga, Inglesa, Alemã e, a mais recente, Americana) e duas famílias de leveduras (*Ale* e *Lager*) (BJCP *et al.*, 2015). Dessa maneira, a produção de alguns compostos voláteis, o perfil de floculação, e temperatura de fermentação são características dependentes do estilo de cerveja, os quais possuem linhagens específicas para a sua produção. Outras características, como capacidade de crescimento em etanol, velocidade de fermentação, capacidade de atenuação, capacidade de utilização de açúcares e produção de etanol em níveis desejados, validam a utilização da levedura como cultura de inóculo ou como cultura mista. Em caso de leveduras utilizadas em cultura mista, as mesmas precisam ser avaliadas quanto à produção toxina *killer*.

As leveduras cervejeiras podem produzir em torno de 500 diferentes aromas e compostos aromáticos (White *et al.*, 2010). Estes metabólitos secundários, incluindo ésteres, terpenos, lactonas, C13-norisoprenoides, álcoois superiores, ácidos graxos, compostos carbonílicos, dicetonas vicinais e compostos fenólicos, apesar de produzidos em baixas concentrações, contribuem com perfil sensorial da cerveja e são de vital importância para a qualidade da bebida (Verstrepen *et al.*, 2003; Morado *et al.*, 2011; Saerens *et al.*, 2010). A análise dos compostos voláteis foi utilizada para seleção das leveduras utilizadas para a produção de cervejas. Desta forma, dos 13 isolados inicialmente selecionados, cinco foram escolhidos para testes adicionais e para a produção de cerveja. As leveduras escolhidas foram CL011 (isolado da casca do limão), PB111 (isolado da polpa da bergamota), PB113 (isolado da polpa da bergamota), PA511 (isolado da polpa da ameixa) e CB341 (isolado da casca da bergamota), devido aos compostos voláteis produzidos pelos isolados, sendo comparadas com as leveduras controle US-05, WB-06, T-58 e W34/70 (leveduras cervejeiras comerciais). A linhagem *S. cerevisiae* CLO11 apresentou a produção de compostos voláteis similares aos controles,

porém em quantidades mais elevadas de ésteres, terpenos, lactonas e C13-norisoprenoides, álcoois e ácidos. A linhagem *W. anomalus* CB341 apresentou a produção de compostos voláteis não apresentados pelas leveduras controle, demonstrando alta produção de ésteres. As linhagens *S. cerevisiae* PB111, PB113 e PA511 se mostraram mais neutras em relação à produção de compostos voláteis, similares às leveduras controles (Apêndice 4, Tabela 7 e Figura 6).

A habilidade de floculação de uma levedura é uma característica desejada na grande maioria das cervejas, conhecida como potencial de floculação e medida pela taxa de sedimentação da levedura em meio estático. A floculação auxilia na clarificação pela separação da biomassa da cerveja, sendo NewFlo o fenótipo da maioria das leveduras cervejeiras (Speers *et al.*, 1992). O teste de Helm's é o teste padrão de floculação, recomendado pelas sociedades cervejeiras e pela ASBC (*American Society of Brewing Chemists*). As leveduras cervejeiras são classificadas como de alta, média e baixa floculação. Linhagens inglesas (*London*) costumam apresentar alta floculação, iniciando o processo de floculação de 3 a 5 dias após a fermentação, podendo, inclusive, deixar a cerveja não totalmente atenuada e com diacetil. Linhagens americanas costumam apresentar floculação média, produzindo cervejas límpidas e com pouco diacetil e ésteres. As leveduras de baixa floculação são mais raras, pois deixam a cerveja turva e com sabor de pão, um exemplo são as linhagens *Heffeweizen* alemã e a *Witbier* belga. No estudo de Saito *et al.* e colaboradores (1990) foi demonstrado que a floculação da linhagem J224 de *W. anomalus* não foi dependente de cálcio, e não foi inibida por açúcares, apenas pelas proteinases K e E, porém não existem muitos estudos sobre floculação nesta espécie. Nossos resultados mostraram que levedura CB341 (*W. anomalus*) apresentou floculação não dependente de cálcio, porém foi inibida por manose e apresentou baixa floculação. Os isolados CL011, PB111, PB113 e PA511, todos pertencentes à espécie *S. cerevisiae*, apresentaram floculação dependente de cálcio, floculação baixa e fenótipo MI (CL011) e média e perfil de floculação NewFLO (PB111, PB113 e PA511) (inibição por glicose e manose). Nenhuma levedura apresentou alta floculação, o que já era esperado, sabendo-se que muitas leveduras selvagens não floculam bem e permanecem em suspensão por longos períodos, sendo mais raro apresentarem alta floculação (White *et al.*, 2010).

As leveduras cervejeiras podem ser classificadas em *Ales* (*S. cerevisiae*) e *Lagers* (*S. pastorianus*). Enquanto as *Ales* fermentam melhor a temperaturas mais elevadas (entre 15 e 25°C) e são capazes de crescer a 37°, as *Lagers* apresentam melhor

desempenho entre 6 e 14°C e não crescem a 37°C (Giudici *et al.*, 1998). Devido à seleção de quatro *S. cerevisiae* e uma *W. anomalus* para a produção de cerveja, foram testadas as temperaturas de crescimento a 15°C, 25°C e 37°C em comparação com as temperaturas de crescimento da levedura controle US-05 (*S. cerevisiae*) e W34/70 (*S. pastorianus*). As leveduras selecionadas CL011, PB111 e PB113 demonstraram destaque na capacidade de crescimento nas temperaturas testadas, apresentando sempre crescimento igual ou superior às leveduras controles. CB341 apresentou bom crescimento em comparação aos controles nas três temperaturas testadas. PA511 apresentou bom crescimento em comparação aos controles a 25°C, porém a 37°C e 15°C demonstrou baixo crescimento. Em geral, os isolados apresentaram boa capacidade de crescer nas três temperaturas testadas, podendo ser utilizadas entre 15 e 25°C ou, até mesmo, em outros tipos de bebida que a fermentação ocorra a temperaturas mais elevadas, como vinhos e cachaças.

A capacidade de crescimento na presença de etanol garante que a fermentação não seja interrompida, a capacidade de atenuação (consumo dos açúcares do mosto e sua transformação em etanol e CO₂) garante que o produto final possua o teor alcoólico desejado, enquanto a concentração final de açúcares, que varia de 2% a 6%, garante que a cerveja tenha o dulçor desejado (Aquarone *et al.*, 1983). Dessa maneira, estas características foram avaliadas nas leveduras selecionadas, visando conhecer o perfil de fermentação das mesmas em mosto cervejeiro. As leveduras CL011, PB111, PB113 e PA511 foram capazes de crescer em 5% de etanol, apresentaram atenuação de 50-80%, velocidade de fermentação similar às leveduras controles e a concentração final de açúcares de 6% (CL011, PB111 e PB113) e 3% (PA511), demonstrando potencial em sua utilização como cultura de inóculo. CB341 não foi capaz de crescer em 5% de etanol, demonstrou atenuação de 17%, velocidade de fermentação similar aos controles e concentração final de açúcares de 3%. A baixa capacidade de atenuação demonstra que CB341 não utilizou os açúcares do mosto para a produção de etanol na mesma proporção que a levedura controle US-05 (80% de atenuação), porém os resultados do teste do açúcar redutor mostram que a concentração de açúcar residual foi pequena, demonstrando sua assimilação e possível uso para a produção de biomassa. A baixa capacidade de crescimento em etanol 5% indica que CB341 seria mais indicada para utilização em cultura mista, contribuindo com a produção de compostos aromáticos para a complexidade da cerveja.

Algumas leveduras apresentam capacidade de produção de exotoxinas, proteínas de baixo peso molecular, que possuem atividade antimicrobiana, conhecidas como toxina *killer* ou micocinas. Estas leveduras se mostram aptas a destruir células da mesma espécie ou espécies distintas de leveduras, característica que tem sido empregada na produção de vinho, na qual a levedura com atividade *killer* é inoculada, eliminando leveduras deteriorantes (Ciani *et al.*, 2011). Dessa maneira, a investigação do fator *killer* é um parâmetro que necessita de avaliação para a utilização de culturas mistas. A levedura CB341 (*W. anomalus*), que apresentou potencial para a utilização em cultura mista, devido à alta produção de ésteres e sua complementaridade com a espécie *S. cerevisiae*, foi avaliada quanto à produção de toxina *killer* contra a linhagem industrial US-05. Os resultados foram negativos para a produção de toxina *killer*, demonstrando que estas duas leveduras podem ser utilizadas como culturas mistas em fermentação.

A produção de cerveja foi realizada a 18°C com as leveduras selecionadas CL011, PB111, PB113, PA511 e CB341. A análise sensorial apontou presença de acetaldeído e da sensação de álcool/quente na boca, indicando produção de álcoois superiores, em todas as cervejas, provavelmente devido a problemas do processo de fabricação e fermentação, que necessitam de melhor padronização, visto que a levedura controle também apresentou tais defeitos.

A análise sensorial da cerveja produzida pela levedura *S. cerevisiae* linhagem CL011 indicou alta produção de ésteres, fenóis e sabor de álcool/quente, o que corrobora com nossos resultados de análise dos compostos voláteis, que apresentaram alta produção de ésteres em comparação com as leveduras controles, sendo destaque os ésteres cinamoato de etila (mel, canela, floral, morango), heptanoato de etila (abacaxi, uva), isovalerato de etila (maçã); entre as lactonas e C13-norisoprenoides γ -nonalactona (coco, pêssego) β -ionona (violeta, balsâmico, rosas) e β -damascenona (rosas); os terpenos β -pineno (pinho, resina, terebintina); citronelal (citronela). Além disso, apresentou teor alcoólico de 70,00g/L e foi identificada alta produção de álcool furfurílico e 2-feniletanol, o que pode estar conferindo tal característica no sabor (Álcool/Quente). Foi indicada para estilos lupulados, belgas e cervejas de trigo, sendo que 75% dos participantes disseram que utilizariam a linhagem para a produção de cerveja. CL011 mostrou um perfil que combina com os estilos indicados, descrito como complexo, frutado, floral, fenólico e de baixa floculação, mostrando-se interessante para a produção de cerveja.

As leveduras PB111, PB113 e PA511, também da espécie *S. cerevisiae*, apresentaram perfis mais neutros ou clássicos na análise dos compostos voláteis por CG, similares às leveduras controles, porém não menos interessantes para a produção de cerveja, visto que a maioria das cervejas se enquadra neste perfil. As cervejas produzidas apresentaram teor alcoólico de 65,49g/L, 41,58g/L, 36,30g/L, demonstrando boa produção de etanol para utilização como cultura pura. Na análise sensorial os três isolados apresentaram notas maiores para o parâmetro éster em comparação com US-05, demonstrando perfil mais frutado. A cerveja produzida por PB111 apresentou também produção de fenóis maior em comparação com US05, enquanto PB113 e PA511 apresentaram menor produção de fenóis, sendo indicados para os estilos lupulados, belgas e cervejas de trigo (PB111) e estilos mais neutros e leves (PB113 e PA511). PA511 apresentou aroma cítrico diferencial, o que corrobora com os resultados da análise dos compostos voláteis, que demonstraram destaque na produção de limoneno (cítrico). Por fim, as porcentagens de avaliadores que utilizariam essas linhagens para a produção de cerveja foi de 71%; 62%; 100%, respectivamente. A baixa porcentagem apresentada por PB113 pode estar relacionada à produção de fenóis desagradáveis, aroma de sabão e autólise descrito pelos participantes. Já PB111 e PA511 foram mais bem avaliadas e apresentam maior potencial para a indústria cervejeira.

A utilização de mais de uma linhagem (cultura mista) é uma prática comumente empregada na fabricação de vinho, principalmente no modelo em que uma levedura não *Saccharomyces* contribui para o *flavour* da bebida, enquanto uma levedura *Saccharomyces* realiza a fermentação do mosto com produção de etanol (Gamero *et al.*, 2016). Já a utilização de cultura mista em cervejas ainda é uma prática pouco empregada, porém vem aumentando e pode trazer benefícios para a qualidade da cerveja. A cultura mista pode ser usada através do emprego de duas leveduras: uma que contribua com o perfil aromático e a segunda que contribua com a boa atenuação do mosto ou que tenha tolerância a altas concentrações de etanol; a utilização de duas leveduras que possuam perfis aromáticos complementares; leveduras que juntas criem um perfil único de difícil reprodução, contribuindo, dessa maneira, com a complexidade da cerveja (White *et al.*, 2010). Dessa maneira, *W. anomalus* CB341 foi selecionada para a produção de uma cerveja em cultura mista com US-05 ao mesmo tempo em que foi produzida uma cerveja somente com US-05. As duas cervejas foram avaliadas por HPLC para o teor de etanol, resultando em uma produção semelhante de etanol 60,28g/L (CB341 + US-05) e 59,78g/L

(US-05), e sensorialmente por nove avaliadores treinados. Os aromas e sabores marcados pelos avaliadores ratificando o achado dos compostos identificados pela análise em CG. A cerveja (CB341 + US05) foi avaliada como a mais esterificada, tanto no aroma quanto no sabor, dentre todas as cervejas, apresentando também alta produção de fenóis, descritos como agradáveis pelos participantes. Foi escolhida como a cerveja preferida por 62,25%, em comparação com US-05 e 100% dos participantes disseram que usariam a levedura para a produção de cerveja. Os estilos indicados pelos participantes para a utilização da cultura mista (CB341+US-05) ou da cultura pura (US-05) foram muito distintos, demonstrando a mudança do perfil aromático pela cultura mista. Enquanto US-05 foi indicada para estilos mais neutros e leves, CB341 + US05 foi indicada para estilos mais lupulados, belgas e cervejas de trigo, permitindo o destaque dos compostos fenólicos e ésteres. A linhagem CB341 pertence à espécie *W. anomalus*, já descrita por sua resistência ao estresse em pHs extremos e em baixa atividade da água, sendo altamente competitiva e inibindo uma variedade de outros microrganismos (Walker *et al.*, 2011). Além disso, costuma estar presente no mosto de vinhos e não produzir problemas sensoriais ou deteriorantes. Já foi relatada por aumentar a complexidade de vinhos, provavelmente pela excreção de algumas enzimas não produzidas pelas leveduras do gênero *Saccharomyces*, porém possui tendência em produzir acetato de etila e ácido acético (Izquierdo Cañas *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que a levedura CB341 apresentou capacidade de assimilação de celobiose semelhante ao gênero *Brettanomyces*, utilizada para a produção de cervejas da família *Lambic*, as quais possuem capacidade de utilizar a celobiose presente em barris de carvalho, quando maturadas no mesmo. Além disso, outros açúcares foram assimilados por CB341, como xilose, salicina, lactato, succinato, ribitol, citrato, eritritol e amido solúvel, indicando produção de diferentes enzimas. Em conjunto, estas características mostram que CB341 apresenta potencial para utilização como cultura mista, contribuindo com a qualidade e a complexidade da cerveja.

As linhagens do gênero *Saccharomyces* são as leveduras mais importantes na indústria atualmente e clássicas para a produção de cerveja. O isolamento de novas linhagens traz maior variabilidade genética e, conseqüentemente, maior variedade de características ao produto final. Assim, o isolamento de novas linhagens de *Saccharomyces* tem se tornado cada vez mais interessante para a indústria cervejeira, podendo contribuir com melhorias do produto final. Em contrapartida, a utilização de

leveduras não *Saccharomyces*, tem timidamente sido empregada na produção de cerveja, trazendo inovação ao setor pela produção de cervejas únicas. O objetivo deste estudo foi o isolamento de novas leveduras para a produção de cerveja de forma geral, visto que a cultura cervejeira vem crescendo no Brasil e no mundo e a linhagem utilizada traz características únicas à cerveja, sendo o insumo cervejeiro mais relevante para o estilo, valorizando o produto regional produzido com os insumos locais. Nossos resultados mostraram que é possível selecionar leveduras com perfis interessantes para produção de cerveja a partir da fermentação do mosto cervejeiro e testes de exclusão. Os perfis apresentados pelas leveduras selecionadas CL011, PB111, PB113, PA511 e CB341 se mostraram interessantes, variados e com potencial para a futura utilização na indústria cervejeira.

7. CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para isolamento de leveduras visando a seleção de linhagens para produção de cerveja foi satisfatória, sendo obtidos 92 isolados tanto da casca quanto da polpa de diferentes frutos, que foram avaliados em relação ao potencial para a produção de cerveja;
- Os testes de exclusão foram adequados para a seleção de leveduras com fenótipos desejados e tolerantes aos estresses do mosto, resultando em 13 (14%) linhagens selecionadas;
- As 13 leveduras selecionadas foram caracterizadas fenotipicamente e identificadas por sequenciamento das regiões D1/D2 e/ou ITS do rDNA, sendo quatro do gênero *Saccharomyces*, oito da espécie *W. anomalus* e uma da espécie ainda não descrita *Kurtzmaniella sp. nov.*, que não foi utilizada para os demais testes deste estudo.
- A análise dos compostos voláteis permitiu a seleção de cinco leveduras para a produção de cerveja, devido aos seus perfis aromáticos;
- A caracterização das leveduras auxiliou no enquadramento dos melhores estilos para a utilização futura das leveduras na indústria;
- Foi possível realizar a produção de cerveja com as leveduras selecionadas, as quais demonstraram capacidade de atenuação do mosto e produção de etanol de 3,6% a 7%, validando sua utilização para a produção de cerveja;
- A análise sensorial auxiliou a descrever o perfil de cada levedura e a validar o potencial das mesmas para a produção de cerveja.

8. PERSPECTIVAS

- Produção de cervejas de estilos específicos de acordo com as características de cada isolado;
- Produção de cerveja com os demais isolados que não foram selecionados para a etapa de produção de cerveja, porém demonstraram características interessantes.
- Estudo das leveduras selecionadas para sua possível aplicação em grande escala.

9. REFERÊNCIAS

- 1 Abrabe. Categorias. Disponível em: < <http://www.abrabe.org.br/categorias>>. Acesso em: 01/08/2016. Euromonitor International, 2009 Euromonitor International Global alcoholic drinks: Beer – Opportunities in niche categories Euromonitor International, London (2009) Retrieved from Euromonitor database.
- 2 Ambev (2016) Companhia de Bebidas das Américas. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2018.
- 3 Aquarone E. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. Edgard Blücher; 1983.
- 4 Araújo, Thalita M. Caracterização Bioquímico-Molecular de Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas de Dornas de Fermentação de Cachaça para Produção de Cerveja. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- 5 Azeredo, DRP. *Síntese e Degradação de Glicogênio e Viabilidade de Levedura Cervejeira*. 1999. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.
- 6 Bai FW, Chen LJ, Zhang Z, Anderson WA, Moo-Young M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J Biotechnol*. 2004; 110(3):287-293.
- 7 Bamforth CW. Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. *The Chemical Educator*. journal article. 2000;5(3):102-112.
- 8 Bamforth CW (2003) Wort composition and beer quality. *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Smart K, ed), pp.
- 9 Barnett JA, Payne RW, Yarrow D, Barnett L. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press; 2000.
- 10 Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 88(1):31-39.
- 11 Bendiak, D.S. (1995) Quantification of the Helm's Flocculation test. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 52, 120:1222.
- 12 Berlowska J, Kregiel D, Rajkowska K. Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast*. 2015; 32(1):289-300.

- 13 Bing J, Han PJ, Liu WQ, Wang QM, Bai FY. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr Biol*. 2014; 24(10):R380-381.
- 14 BJCP style guidelines. 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf> Acesso em: 05 fevereiro 2018.
- 15 Blucher EE. *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. Blucher; 2001.
- 16 Bokulich NA, Bamforth CW. The microbiology of malting and brewing. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77(2):157-172.
- 17 Boulton C, Quain D. *Brewing Yeast and Fermentation*. Wiley; 2008.
- 18 Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*. 2012; 154(3):87-97.
- 19 BRASIL. Decreto n. 6871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas
- 20 BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009. Diário Oficial da União, Brasília 05/06/2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>. Acesso em: 03/01/2018.
- 21 Brewers Association (2013) Industry Diffusion: How the Smallest Craft Breweries are Driving Growth. <http://www.brewersassociation.org/insights/industry-diffusion-how-the-smallest-craftbreweries-are-driving-growth/2011>. Accessed 19 fev 2018.
- 22 Calleja GB, Atkinson B, Reichenbach H, et al. *Aggregation*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984:302-321
- 23 Carvalho, D. S.; Zambiasi, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011.
- 24 Cavalheiro, André de A. Análise dos Mutantes de Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) –

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- 25 Cerveja no Brasil. Cervbrasil. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/a-cerveja/>>. Acesso em: 05 setembro de 2017.
 - 26 Ciani M, Fatichenti F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine Yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):3058-3063.
 - 27 Ciani M, Ferraro L. Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(1):128-132.
 - 28 Claro FB, Rijsbrack K, Soares EV. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J Appl Microbiol.* 2007; 102(3):693-700.
 - 29 Comitini F, Gobbi M, Domizio P, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 2011; 28(5):873-882.
 - 30 Dasari S, Kölling R. Cytosolic localization of acetohydroxyacid synthase Ilv2 and its impact on diacetyl formation during beer fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(3):727-731.
 - 31 de Paula Santos S. Os primórdios da cerveja no Brasil. Ateliê; 2003.
 - 32 Dengis PB, Nélissen LR, Rouxhet PG. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(2):718-728.
 - 33 Di Maio S, Polizzotto G, Di Gangi E, et al. Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of south-eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30428.
 - 34 Figueiredo, Bruna I. C. Cruzamento entre Leveduras da Fermentação da Cachaça para a Obtenção de Novas Estirpes. Potencial par a Produção de Cerveja. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
 - 35 Filho VGV. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. Edgard Blücher; 2005.
 - 36 Fujihara H, Hino M, Takashita H, Kajiwara Y, Okamoto K, Furukawa K. Efficient screening of environmental isolates for *Saccharomyces cerevisiae*

- strains that are suitable for brewing. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(6):1086-1089.
- 37 Fujii T, Kobayashi O, Yoshimoto H, Furukawa S, Tamai Y. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(3):910-915.
- 38 Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(8):2786-2792.
- 39 Gallone B, Steensels J, Pahl T, et al. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell.* 2016;166(6):1397-1410.e1316.
- 40 Gamero A, Quintilla R, Groenewald M, Alkema W, Boekhout T, Hazelwood L. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.* 2016;60:147-159.
- 41 Guimarães, Thaís M. Isolamento, Identificação e Seleção de Cepas de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para Elaboração de Vinho. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 42 Hughes, G. Cerveja Feita em Casa: Tudo sobre os ingredientes, os equipamentos e as técnicas para produzir a bebida em vários estilos. Publifolha. 1 ed. São Paulo, 2014.
- 43 Izquierdo Cañas, P.M., García-Romero, E., Heras Manso, J.M. et al. Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines *Eur Food Res Technol* (2014) 239: 279. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2220-1>
- 44 Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Aquilanti L, Clementi F. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *J Food Sci.* 2015.
- 45 Giudici P, Caggia C, Pulvirenti A, Rainieri S. Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *J Appl Microbiol.* 1998;84(5):811-819.
- 46 Gómez-Corona C, Escalona-Buendía HB, García M, Chollet S, Valentin D. Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer

- consumption in Mexico. *Appetite*. 2015;96:358-367.
- 47 Gonzalez R, Morales P, Tronchoni J, et al. New Genes Involved in Osmotic Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol*. 2016; 7:1545.
- 48 Hammond JRM (1993) *Brewing yeast. The Yeasts*, 2nd edn (Rose AH & Harrison JS, eds), pp. 5–67. Academic Press, London.
- 49 Hazelwood LA, Walsh MC, Pronk JT, Daran JM. Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso-alpha-acids. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(1):318-328.
- 50 Homan, M. Beer and its drinkers: an ancient Near Eastern lover story, *Near Eastern Archaeology* (2004) 84–95
- 51 Hornsey IS, Chemistry RSo. *A History of Beer and Brewing*. Royal Society of Chemistry; 2003.
- 52 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*. 2010;76(5):1563-1573.
- 53 Ikushima S, Tateishi Y, Kanai K, et al. Multi-locus genotyping of bottom fermenting yeasts by single nucleotide polymorphisms indicative of brewing characteristics. *J Biosci Bioeng*. 2012; 113(4):496-501.
- 54 James TC, Usher J, Campbell S, Bond U. Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr Genet*. 2008; 53(3):139-152.
- 55 Kihn JC, Masy CL, Mestdagh MM. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Can J Microbiol*. 1988; 34(6):773-778.
- 56 Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Science; 2011.
- 57 Lauer JR, C. M. 2007. A influência dos íons de cádmio e magnésio na toxicidade do cádmio e o envolvimento da proteína Pmr1 no uso da via secretora para desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertacao de Pos-Graduacao. Porto Alegre, Programa de Pos-Graduacao em Genetica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 99p.

- 58 Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 166(6):1562-1574.
- 59 Lewis JA, Elkon IM, McGee MA, Higbee AJ, Gasch AP. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. *Genetics*. 2010;186(4):1197-1205.
- 60 Libkind D, Hittinger CT, 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*. 2011; 108(35):14539-14544.
- 61 Liti G, Carter DM, Moses AM, *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 2009; 458(7236):337-341.
- 62 Lodolo EJ, Kock JL, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res*. 2008; 8(7):1018-1036.
- 63 Marongiu A, Zara G, Legras JL, *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*. 2015;42(1):85-92.
- 64 Mas A, Guillamón JM, Beltran G. Non-conventional Yeast in the Wine Industry. 2017.
- 65 McGovern PE, Zhang J, Tang J, *et al.* Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(51):17593-17598.
- 66 McGovern, PE *et al.*, Exner, Neolithic resinated wine, *Nature* 381 (1996) 480–481.
- 67 Meaden, P. G. and Taylor, N. R. (1991), Cloning of a yeast gene which causes phenolic off-flavors in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 97: 353–357. doi:10.1002/j.2050-0416.1991.tb01075.
- 68 Mendes, S. D. C. Potencial Biotecnológico de Leveduras Selvagens Provenientes de Regiões Vinícolas de Santa Catarina. 2015. 184f. Revista: Amorim, B. As duas grandes famílias cervejeiras. *Revista da cerveja*, 2013, v. 7, p. 52-54.
- 69 Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, Leão C. Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *J Food Prot*. 2002;65(6):1033-1037.

- 70 Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.
- 71 Morado R. *Larousse da Cerveja*. Lafonte; 2011.
- 72 Moreira, E. T. Análise da Competitividade do Segmento de Cerveja do Brasil, 1997-20121. *Informações Econômicas*, SP, v. 44, n. 3, maio/jun. 2014.
- 73 Palmer JJ. *How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time*. Brewers Publications; 2006.
- 74 Pasteur, L. Me´moire sur la fermentation alcoolique, *Ann. Chim. Phys.* 58 (1860) 323–426.
- 75 Pellegrini L, Cardinali G & Martini A (1999) Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains able to ferment at supraoptimal temperatures. *Annali di microbiologia ed enzimologia* 49: 55–66.
- 76 Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, Vicente AA. Yeast: the soul of beer's aroma- a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(5):1937-1949.
- 77 Priest F, Campbell I. *Brewing Microbiology*. Springer; 2003.
- 78 Ramírez-Castrillón M, Mendes SD, Inostroza-Ponta M, Valente P. (GTG)5 MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of wine associated yeasts? *PLoS One.* 2014; 9(8):e105870.
- 79 Ramos-Jeunehomme, C., Laub, R., and Masschelein, C. A.: Why is ester formation in brewery fermentations yeast strain dependent?, pp. 257e264, in: *Proceedings of the 23rd European Brewery Convention Congress*, Lisbon. Oxford University Press, Oxford, UK (1991).
- 80 Sachs, L.G. *Cerveja*. Paraná, 2001. (Apostila)
- 81 Saerens SM, Duong CT, Nevoigt E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(5):1195-1212.
- 82 Saito K, Sato S-i, Shimoi H, Iefuji H, Tadenuma M. Flocculation Mechanism of *Hansenula anomala* J224. *Agricultural and Biological Chemistry.* 1990; 54:6:1425-1432.
- 83 Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

- 84 Samuel D. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science*. 1996;273(5274):488-490.
- 85 Schlenk, F. Early research on fermentation – a story of missed opportunities. *Trends Biochem Sciences*, 1985, v. 10, p. 252-254
- 86 SEBRAE. Potencial de consumo de cervejas no Brasil. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_07_08_RT_Agroneg%C3%B3cio_Potencial_de_consumo_de_cervejas_no_Brasil.pdf>. Acesso em: 07/08/2017.
- 87 Sheikha AFE, Levin RE, Xu J. *Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity and Traceability*. Wiley; 2018.
- 88 Sherman, F. An introduction of the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, 1998, v.6, pag. 302-325.
- 89 Silva, H A et al., 2016, *Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade* Vol. 4 no 2 – São Paulo: Centro Universitário Senac ISSN 2238-4200.
- 90 Silva, G.A. da; SILVA, M.A.A.A. da. *Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio. Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa, Bento Gonçalves: UEPAE de Bento Gonçalves, 1984.*
- 91 Sicard D, Legras JL. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C R Biol*. 2011;334(3):229-236.
- 92 Speers, R. A., Tung, M. A., Durances, T. D. and Stewart, G. G., *Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurement: A review. J. Inst. Brew.*, 1992, 98, 293-300.
- 93 Stahl U, Donalies UEB, Nevoigt E. *Food Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg; 2008.
- 94 Steensels J, Snoek T, Meersman E, Picca Nicolino M, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(5):947-995.
- 95 Stopiglia CD, Heidrich D, Sorrentino JM, et al. Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. *J Basic Microbiol*. 2014;54(6):578-584.
- 96 Stratford M. Lectin-mediated aggregation of yeasts--yeast flocculation. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1992; 10:283-341.

- 97 Sumbly KM, Grbin PR, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 2010;121.
- 98 Šuranská H, Vránová D, Omelková J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Braz J Microbiol*. 2016;47(1):181-190.
- 99 Suzzi G, Romano P, Westall F, Vannini L. The flocculation of wine yeasts: biochemical and morphological characteristics in *Kloeckera apiculata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;69(3):273-277.
- 100 Swiegers JH, Pretorius IS. Yeast modulation of wine flavor. *Adv Appl Microbiol*. 2005;57:131-175.
- 101 Tapsoba F, Legras JL, Savadogo A, Dequin S, Traore AS. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from *Borassus akeassii* palm wines from Burkina Faso in comparison to other African beverages. *Int J Food Microbiol*. 2015;211:128-133.
- 102 Teunissen AW, Steensma HY. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*. 1995;11(11):1001-1013.
- 103 Vallejo JA, Serrat M, Pérez-Portuondo I, Sánchez-Pérez A, Ageitos JM, Villa TG. A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype. *AMB Express*. 2012;2:38.
- 104 Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng*. 2003;96(2):110-118.
- 105 Vidgren, V.; Multanen, J.; Rouhonen, L.; et al. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast Research*, 2010, v. 10, p. 402–411.
- 106 Vilanova M, Campo E, Escudero A, Graña M, Masa A, Cacho J. Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from north west Spain: correlation between sensory and instrumental analysis. *Anal Chim Acta*. 2012;720:104-111.
- 107 Walker GM. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;99(1):25-34.
- 108 Wang J, Shen N, Yin H, Liu C, Li Y, Li Q. Development of industrial brewing yeast with low acetaldehyde production and improved flavor stability. *Appl*

- Biochem Biotechnol. 2013;169(3):1016-1025.
- 109 Wang QM, Liu WQ, Liti G, Wang SA, Bai FY. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. Mol Ecol. 2012;21(22):5404-5417.
- 110 White C, Zainasheff J. Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Publications; 2010.
- 111 Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP & Fell JW (eds) The Yeasts. A Taxonomic Study, 4th edn. Elsevier, 418 Amsterdam, pp 77-100.

10. APÊNDICES

Apêndice 1. Meios de Cultura utilizados para as análises deste estudo.

Meio MBF (Meio básico para fermentação de açúcares)

Composição do meio MBF: 0,75% de peptona (p/v); 0,45% de extrato de levedura (p/v) e 2% da fonte de carbono a ser avaliada.

Meio YPD 2% (*Yeast extract, peptone, dextrose*)

Composição do meio YPD: 2% de dextrose (p/v); 1% de extrato de levedura (p/v) e 1% de peptona (p/v). Para o preparo de YPD sólido foi adicionado 2% de ágar (p/v).

Meio YM-MB (*Yeast extract – Malt extract – methylene blue*)

Composição do meio YM-MB: 0,3% de extrato de levedura (p/v); 0,3% de extrato de malte (p/v); 0,5% de peptona (p/v); 1% de glicose (p/v); 2% de ágar (p/v); 0,003% de azul de metileno hidratado em tampão citrato 0,05M, pH 4,2.

Meio mínimo YNB (*Yeast nitrogen base*)

Composição do meio YNB: 0,67% de meio YNB (p/v); 2% de Agar Difco (p/v) e 0,5% da fonte de carbono a ser testada. (p/v)

Meio mínimo YCB (*Yeast carbon base*)

Composição do meio YCB: 1,17% de meio (YCB) (p/v); 2% de Agar Difco (p/v).

Apêndice 2. Ficha de Avaliação Sensorial. As cervejas foram avaliadas quanto ao aroma e ao sabor por avaliadores treinados.

Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

Julgador:

Data:

Amostra:

AROMA:

Ésteres

Fenóis

Álcool

Dulçor

Acidez

	0	B	M	A
Ésteres				
Fenóis				
Álcool				
Dulçor				
Acidez				

OBS:

Frutado		Pinho	
Maçã/Pera		Acetaldeído	
Banana		Álcool/Quente	
Abacaxi		Diacetil	
Morango		Medicinal	
Ameixa		Mofo	
Mel		Plástico	
Uva		Solvente/Fusel	
Doce		Azedo	
Tostado		Enxofre	
Pêssego		Vinagre	
Framboesa		Ácido	
Coco		Chulé	
Herbal		Rancidez	
Menta		Vômito	
Canela		Suor	
Floral		Queijo	
Cítrico		Sabão	
Especiarias		Autólise	
Madeira		Outro	

SABOR:

Ésteres

Fenóis

Álcool

Dulçor

Acidez

	0	B	M	A
Ésteres				
Fenóis				
Álcool				
Dulçor				
Acidez				

OBS:

Frutado		Pinho	
Maçã/Pera		Acetaldeído	
Banana		Álcool/Quente	
Abacaxi		Diacetil	
Morango		Adstringente	
Ameixa		Medicinal	
Mel		Mofo	
Uva		Plástico	
Doce		Solvente/Fusel	
Tostado		Azedo	
Pêssego		Enxofre	
Framboesa		Vinagre	
Coco		Ácido	
Herbal		Chulé	
Menta		Rancidez	
Canela		Vômito	
Floral		Suor	
Cítrico		Queijo	
Especiarias		Sabão	
Madeira		Outro	

Você usaria esta levedura para a produção de cerveja?

Você usaria esta levedura para qual estilo de cerveja?

Apêndice 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os avaliadores selecionados para a análise sensorial consentiram com a participação no estudo através da assinatura do TCLE.



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Comitê de Ética e Pesquisa – CEP/UFRGS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Senhor(a) está sendo convidado a participar do estudo “ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA” que contribuirá com o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro e no setor cervejeiro. Este estudo seguirá os preceitos éticos da resolução 466/12 do Ministério da Saúde, que contém diretrizes e normas para a pesquisa com seres humanos. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a Instituição.

Este estudo tem como objetivo o isolamento de leveduras a partir de frutos, sua seleção por critério de tolerância e fenótipos desejáveis para a produção de cerveja e sua caracterização visando os estilos mais indicados para cada levedura, buscando novas linhagens e espécies tanto para a utilização como cultura de starter como em cultura mista.

Sua participação nesta pesquisa consistirá na realização de uma análise sensorial das cervejas produzidas pelas leveduras isoladas, caracterizadas e selecionadas. A análise será realizada na folha do julgador construída com base na ficha de avaliação recomendada pelo BJCP (*Beer Judge Certification Program*) e nos parâmetros da avaliação dos compostos voláteis, abrangendo análise olfativa e degustação. As informações constantes na ficha de avaliação serão utilizadas para auxiliar na escolha das leveduras com melhor potencial para a produção de cerveja.

Não haverá custos nem recompensa financeira para o participante. É importante salientar que riscos ou desconfortos causados pela pesquisa serão mínimos e podem incluir efeitos da intolerância/alergia ao glúten e ao trigo. Caso ocorram efeitos indesejáveis, encaminharemos para a unidade de saúde mais próxima, sendo os custos de responsabilidade da pesquisadora.

Os registros de sua participação neste estudo serão conservados como confidenciais, de acordo com o permitido por lei. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade permanecerá confidencial. Você receberá uma cópia deste termo, onde constam endereço e telefone do pesquisador responsável, podendo tirar suas dúvidas

sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Serão aplicados os seguintes critérios de inclusão de participantes: experiência prévia na análise de cerveja (participantes altamente treinados e familiarizados com a ficha de avaliação), disponibilidade em participação da pesquisa, boa saúde bucal, participação voluntária,).

Serão adotados como critérios de exclusão de participantes: falta de disponibilidade em participação da pesquisa, mulheres grávidas, participantes menores de 18 anos, intolerância/alergia ao glúten e/ou trigo, julgadores que estejam com baixa aptidão sensorial ou ausente na data de aplicação do teste.

Declaro que li e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Prof. Dr^a. Patricia Valente da Silva

Fernanda Otesbelgue Pinto

Pesquisadores responsáveis: Dra. Patrícia Valente (51-993669646)

Fernanda Otesbelgue Pinto (51-983231949)

Laboratório de Micologia (Lab. 325). Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite 500. Centro. Porto Alegre – RS. Tel: 51-33084196

Comissão de Ética em Pesquisa da UFRGS, Tel: 51-33083738

Apêndice 4. Produção de Compostos voláteis ($\mu\text{g/L}$). A produção de compostos voláteis foi detectada por GC/MS e quantificada por GC-FID. Coluna 1: compostos voláteis; coluna 2: limiar de percepção; coluna 3-10: leveduras analisadas.

Composto ($\mu\text{g/L}$)	Limiar	US05	WB06	w34/70	T-58	CL011	PB111	PB113	PA511
Ésteres									
Acetato de etila	30000,00	nd	nd	1150,36	nd	nd	nd	nd	nd
Acetato de hexila	670,00	nd	377,19	376,04	nd	nd	148,85	nd	424,66
Acetato de isoamila	1100,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butanoato de etila	1,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cinamato de etila	1,10	676,33	2102,94	1990,74	1029,61	397233,07	1586,14	242,16	1707,00
Hexanoato de etila	210,00	364,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Heptanoato de etila	2,20	nd	336,59	23,15	30,87	409482,21	393,83	120,03	557,43
Isobutanoato de etila	15,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isovalerato de etila	3,00	299,38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lactato de etila	150000,00	1902,42	1336743,42	762786,87	814157,21	287049370,41	1356964,11	1108235,22	615890,63
Laurato de etila	1500,00	474,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-metilbutanoato de etila	18,00	473,42	nd	952,49	nd	nd	nd	nd	826,79
Nonanoato de etila	1300,00	288,69	nd	608,70	nd	nd	nd	nd	777,50
Octanoato de etila	1000,00	9107,41	1251,18	1264,57	718,05	nd	1029,14	nd	839,33
Pentanoato de etila	15,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1240,64
Succinato de dietila	200000,00	nd	42277,36	48219,79	39531,19	9768248,85	38522,55	40730,55	38801,52
Tioacetato de S-furfurila	1,50	143815,65	1323,23	1252,17	nd	658374,32	177,08	nd	nd
Undecanoato de etila	ne	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Decanoato de etila	200,00	23583,45	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antranilato de etila	16,00	nd	136604,69	184720,63	714,84	13207521,74	12946,67	6740,51	52547,23
Acetato de isobutila	1600,00	nd	nd	993,98	nd	d	nd	nd	nd
Acetato de feniletila	160,00	nd	1481,46	7033,24	2276,20	1233027,56	5499,20	3306,07	2896,42
Acetato de furfurila	540,00	54360,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5495,07
Terpenos, lactonas e C13-norisoprenoides									
α -ionona	2,60	952,49	nd	nd	nd	nd	nd	361,07	nd
α -pineno	0,06	nd	nd	567,77	nd	nd	nd	nd	nd
α -terpineol	250,00	50236,74	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β -damascenona	0,05	nd	3376,79	nd	nd	2123891,84	7642,27	nd	4099,91
β -ionona	0,09	8635,55	1388,58	1343,25	1388,64	459521,85	672,44	1405,28	1350,57
β -pineno	0,08	nd	567,77	315,39	335,74	93557,94	381,01	1250,65	657,97
β -terpineol	0,00	nd	7004,83	nd	nd	nd	5733,73	3003,08	2194,84
Cedreno	ne	nd	nd	138,60	nd	62330,47	282,51	nd	224,59
Citronelal	100,00	nd	26414,04	34901,47	10925,70	8572807,08	23000,33	11803,52	42126,90
Geraniol	952,49	714,38	746,51	535,45	205101,73	748,86	679,55	748,56	903,22
Limoneno	10,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
γ -nonalactona	30,00	793724,91	18471,05	24209,02	16496,70	4974982,18	22441,86	19924,21	19245,94
Álcoois Superiores									
Metanol	ne	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n-butanol	150000,00	nd	4608,15	4701,63	2720,44	nd	2937,06	nd	2665,26
Sec-butanol	43000,00	nd	nd	66013,73	nd	nd	nd	nd	nd

3-metil 1-butanol	30000,00	284,89	1822,83	nd	714,84	nd	nd	753,52	821,62
1-propanol	600000,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-hexanol	110,00	643,20	nd	3430,39	nd	nd	nd	nd	nd
Álcool furfurílico	2000,00	430997,54	56307,26	567,77	nd	16424674,94	94899,07	61411,25	52547,23
2-feniletanol	40000,00	nd	19546,11	35984,42	37743,84	11499511,54	53089,50	39689,75	33741,40
Ácidos Graxos									
Ácido butanoico	3000,00	2034,70	129075,43	146383,81	103380,13	nd	nd	102418,03	111255,88
Ácido cáprico	10000,00	2825,65	2669,61	1452,70	2727,37	690102,27	2607,59	1929,97	2629,25
Ácido caproico	420,00	952,49	21950,42	23546,05	20960,09	6095652,80	26645,77	18335,58	25213,63
Ácido heptanoico	3000,00	27177,89	6982,40	6734,28	8147,70	nd	9866,84	nd	4512,59
Ácido isobutírico	8100,00	952,49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido isovalérico	1000,00	138631,58	614140,13	530189,68	416457,27	nd	nd	226409,63	nd
Ácido octanoico	30000,00	16847,58	46882,00	26198,08	20322,37	14867062,20	71538,19	57228,64	19675,13
Ácido propanoico	8100,00	nd	10713,23	567,77	714,84	5983980,58	26845,08	8913,97	21967,71
Ácido pelargônico	2609,78	1153,68	1080,00	nd	247029,59	1127,55	1222,87	1026,76	672,52
Ácido valérico	3000,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido n-undecanoico	ne	4847,02	2579,84	2489,87	2461,62	650036,55	2567,24	2733,69	2126,05
Ácido 10-undecanoico	ne	nd	10188,63	10805,32	8956,73	2633103,33	10096,25	4730,44	10284,93
Composto (µg/L)	Limiar	CB341	PB341	PB381	CB382	PB383	CB392	CB481	CB484
Ésteres									
Acetato de etila	30000,00	nd	nd	3043,80	nd	nd	1294,00	1374,13	nd
Acetato de hexila	670,00	330,53	400,96	277,39	403,04	1060,70	238,50	457,18	396,97
Acetato de isoamila	1100,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	164,74	nd
Butanoato de etila	1,00	850,97	nd	nd	nd	810,75	nd	nd	nd
Cinamato de etila	1,10	1945,71	1659,01	2044,25	1649,28	1145,14	1958,45	1989,17	1829,65
Hexanoato de etila	210,00	nd	nd	nd	nd	462,30	991,53	nd	1087,77
Heptanoato de etila	2,20	3640,50	562,32	202,19	524,54	nd	nd	2428,38	<0,50
Isobutanoato de etila	15,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isovalerato de etila	3,00	2293,56	1311,68	nd	9424,69	237,76	2288,06	913,38	2268,75
Lactato de etila	150000,00	1423901,16	669834,33	2444879,42	913485,06	1842,76	1040673,77	2016143,52	1222039,67
Laurato de etila	1500,00	nd	nd	nd	nd	360,34	nd	nd	nd
2-metilbutanoato de etila	18,00	741,96	nd	nd	852,56	bd	nd	986,52	nd
Nonanoato de etila	1300,00	nd	nd	nd	nd	222,28	nd	nd	nd
Octanoato de etila	1000,00	770,40	1283,68	824,62	1281,60	40546,26	713,23	1483,71	253,61
Pentanoato de etila	15,00	950,05	1598,75	958,66	794,71	nd	1625,80	1211,79	1673,18
Succinato de dietila	200000,00	40440,62	36771,11	22253,70	50218,17	nd	15048,11	43810,91	31055,25
Tioacetato de S-furfurila	1,50	2588,32	2802,68	3230,25	2800,54	nd	2661,39	2131,67	nd
Undecanoato de etila	ne	nd	nd	nd	nd	2384,89	nd	nd	238,41
Decanoato de etila	200,00	nd	nd	532,85	nd	20450,76	567,35	688,02	nd
Antranilato de etila	16,00	50736,64	136338,17	144452,78	171397,96	nd	20153,23	78582,86	<9,52
Acetato de isobutila	1600,00	nd	nd	1349,78	nd	nd	nd	899,85	nd
Acetato de feniletila	160,00	2096,94	5843,66	2727,21	5915,71	nd	3173,10	3511,22	569,75
Acetato de furfurila	540,00	2990,47	nd	3703,67	nd	28529,25	2884,47	nd	nd
Terpenos, lactonas e C13-norisoprenoides									

α -ionona	2,60	nd	nd	340,23	nd	23951,74	nd	nd	386,56
α -pineno	0,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α -terpineol	250,00	nd	<10,76	nd	nd	37874,60	nd	nd	nd
β -damascenona	0,05	11037,50	11239,70	5542,69	9808,11	nd	nd	10705,18	nd
β -ionona	0,09	nd	1193,56	1466,11	730,23	7778,26	1300,29	899,32	nd
β -pineno	0,08	nd	315,67	486,30	258,71	2354,13	nd	429,42	nd
β -terpineol	0,00	nd	5980,33	3354,44	6846,97	2912,91	5989,68	1693,27	nd
Cedreno	ne	nd	125,43	111,60	251,27	6993,67	nd	67,57	nd
Citronelal	100,00	16602,94	25313,66	37721,36	34971,66	nd	27693,64	1211,79	17041,42
Geraniol	952,49	1272,30	791,06	855,60	33023,90	397,56	3840,10	1051,19	
Limoneno	10,00	nd	5019,95	nd	nd	nd	135,87	nd	nd
γ -nonalactona	30,00	23863,10	20463,69	22022,17	19348,76	1139490,15	19228,56	20999,74	20477,40
Álcoois Superiores									
Metanol	ne	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n-butanol	150000,00	6447,71	4797,04	nd	2700,00	nd	2810,27	3345,10	nd
Sec-butanol	43000,00	nd	nd	nd	826,79	nd	nd	nd	nd
3-metil 1-butanol	30000,00	nd	nd	nd	nd	1217,76	nd	nd	nd
1-propanol	600000,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-hexanol	110,00	nd	d	nd	nd	1428,06	nd	nd	nd
Álcool furfurílico	2000,00	46305,04	61800,14	68469,89	62464,69	289850,13	74016,32	41461,61	40241,39
2-feniletanol	40000,00	15401,07	37873,36	43735,92	38763,19	nd	17793,75	38802,28	44653,29
Ácidos Graxos									
Ácido butanoico	3000,00	nd	nd	nd	nd	4612,63	nd	nd	nd
Ácido cáprico	10000,00	1316,39	2588,51	2962,00	2523,22	2437,90	2662,86	1733,88	2650,81
Ácido caproico	420,00	22843,84	22555,21	22747,63	17800,19	832,48	10363,82	22325,73	21844,07
Ácido heptanoico	3000,00	9623,85	6988,96	6890,31	7617,69	33804,08	3136,07	6987,79	8281,50
Ácido isobutírico	8100,00	nd	nd	nd	nd	1349,92	nd	nd	nd
Ácido isovalérico	1000,00	nd	nd	213717,72	nd	nd	489960,02	nd	2714182,76
Ácido octanoico	30000,00	57902,31	49179,28	61896,06	53442,28	20754,25	36837,70	53143,89	2897,84
Ácido propanoico	8100,00	19230,72	21701,57	30619,95	31718,56	4741,86	23972,03	13510,14	nd
Ácido pelargônico	2609,78	1193,57	1196,40	1066,42	2631,61	1050,74	845,78	nd	
Ácido valérico	3000,00	nd	nd	nd	nd	141,00	nd	nd	nd
Ácido n-undecanoico	ne	1503,44	2030,61	2582,78	2376,06	7523,53	2422,72	2655,26	2864,21
Ácido 10-undecanoico	ne	27063,39	7469,15	10353,19	6180,98	nd	7741,17	20824,78	15889,16

APÊNDICE 5. Curva Padrão de Maltose. Valores de absorbância em espectrômetro a 540nm *versus* a concentração de maltose em g/L.

