Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Leveduras de processos de bioetanol: potencial para a produção de cerveja especial com mosto de alta densidade

Renata Maria Christofoleti Furlan

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

Renata Maria Christofoleti Furlan
Bacharel em Biotecnologia

Leveduras de processos de bioetanol: potencial para a produção de cerveja especial com mosto de alta densidade

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Co-orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Furlan, Renata Maria Christofoleti
Leveduras de processos de bioetanol: potencial para a produção de cerveja especial com mosto de alta densidade / Renata Maria Christofoleti Furlan. - - Piracicaba, 2016.
128 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Cerveja 3. Etanol 4. Alta densidade 5. Análise sensorial 6. Estresses I. Título

CDD 663.42
F985L

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico este trabalho ao
meu esposo Luís.
Obrigada por sempre me apoiar e
incentivar incondicionalmente.

E aos meus familiares,
por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela superação nos momentos difíceis e por me dar forças para seguir com meus objetivos e me fazer acreditar no meu potencial.

Ao meu esposo e aos meus familiares, simplesmente por estarem presentes na minha vida, confortando e alegrando cada momento.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Basso, por todos os anos de aprendizado, apoio e confiança, e pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa por tantos anos.

Ao prof. Dr. André Ricardo Alcarde, pela co-orientação, parceria e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Dr. Cauré B. Portugal, pela parceria, paciência, ensinamentos e valiosa colaboração junto ao meu desenvolvimento científico.

Ao Dr. Luis H. P. Angeloni, pelo aprendizado no universo cervejeiro, pela paciência e inestimável auxílio no preparo dos mostos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, Camila, Cristiane, Elisângela, Osni, Cometa, Eliane, Ricardo, Otávio e Reinaldo. Obrigada pela convivência diária tão alegre e pelo auxílio durante os experimentos. Em especial à Camila e ao Osni, pela contribuição durante as análises. E ao colega Lucas, pelo auxílio em parte das análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas, especialmente ao Giovane e Cintra, pela pronta disponibilidade em ajudar.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o curso.

A ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

A todos, que direta e indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Poderei fazer tudo com a ajuda de Cristo. Ele me dará forças (Filipenses, 4:13)”

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Setor cervejeiro 17
2.2 Processo de produção de cerveja 18
2.3 Leveduras cervejeiras 21
2.4 Fermentação de alta densidade (*high-gravity brewing*) 24
2.5 Características de tolerância em leveduras 28
2.5.1 Trealose 28
2.5.2 Glicogênio 31
2.6 Compostos aromáticos em cerveja 32
2.6.1 Ésteres 33
2.6.2 Alcoóis superiores 34
2.6.3 Dicetonas vicinais 35
2.6.4 Compostos sulfurosos 36
2.6.5 Aldeídos 37
3 OBJETIVO 39
3.1 Objetivo geral 39
3.2 Objetivos específicos 39
4 MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1 Linhagens de leveduras 41
4.2 Reativação e preservação das linhagens 42
4.3 Avaliação do crescimento em meio sintético de maltose 42
4.4 Preparo do mosto cervejeiro de alta densidade 43
4.5 Avaliação do crescimento em mosto cervejeiro de alta densidade 44
4.6 Fermentação em mosto cervejeiro de alta densidade 44
4.7 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio 45
4.8 Avaliação da produção de espuma durante a fermentação 45
4.9 Avaliação quantitativa da capacidade de floculação 45
4.10 Avaliação da tolerância ao etanol 46
4.11 Fermentação com reciclo celular em mosto cervejeiro de alta densidade 46

4.12 Elaboração das cervejas especiais com mosto de alta densidade 46
4.12.1 Propagação das linhagens 47
4.12.2 Fermentação do mosto de alta densidade.....47
4.12.3 Maturação da cerveja 47
4.12.4 Envase da cerveja.....48
4.13 Análises.....48
4.13.1 Viabilidade celular.....48
4.13.2 Teor de etanol 48
4.13.3 Determinação da densidade relativa 49
4.13.4 Determinação do pH 49
4.13.5 Extração e quantificação de trealose.....50
4.13.6 Extração e quantificação de glicogênio 50
4.13.7 Estimativa de células *petite*.....50
4.13.8 Análise de nitrogênio amínico livre (FAN) no mosto 51
4.13.9 Análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa.....51
4.13.10 Análise de turbidez 51
4.13.11 Análise de cor 51
4.13.12 Análise de acidez total 52
4.13.13 Análise sensorial 52
4.13.14 Análises estatísticas 53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....55
5.1 Mosto cervejeiro de alta densidade: elaboração e composição 55
5.2 Crescimento em meio com maltose como fonte de carbono e em mosto cervejeiro HG ...56
5.3 Fermentação em mosto HG 63
5.4 Outros parâmetros relevantes ao processo cervejeiro.....67
5.4.1 Produção de sulfeto de hidrogênio.....67
5.4.2 Produção de espuma durante a fermentação e capacidade de floculação.....69
5.4.3 Tolerância ao etanol.....72
5.5 Fermentação em mosto HG com reciclo celular.....74
5.6 Análises físico-químicas e sensorial 84
6 CONCLUSÕES 97
7 POSSIBILIDADES DE ESTUDOS FUTUROS 99
REFERÊNCIAS.....101
ANEXOS 117

RESUMO

Leveduras de processos de bioetanol: potencial para a produção de cerveja especial com mosto de alta densidade

A crescente demanda por cervejas especiais tem levado o setor a buscar inovações. No âmbito da fermentação, as leveduras constituem o ponto crucial, tanto no que se refere à tolerância aos estresses do processo quanto no que tange à produção dos compostos aromáticos da bebida. Processos cervejeiros com mosto de alta densidade (*high-gravity* (HG)) impõem condições mais estressantes às leveduras devido à maior pressão osmótica no início da fermentação e maior teor alcoólico ao final da mesma. Leveduras isoladas de processos de bioetanol representam um potencial a ser explorado, pois além de poder contribuir com atributos sensoriais desejáveis à bebida, sua maior tolerância aos estresses poderiam ser de grande valia em processos cervejeiros HG, especialmente quando a biomassa é reutilizada em fermentações subsequentes. Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial fisiológico e tecnológico dessas leveduras quanto à fermentação cervejeira com mosto HG visando à produção de cerveja especial do estilo *ale*. Para isso, buscou-se selecionar linhagens com atributos fisiológicos relevantes ao processo cervejeiro e em particular com características de tolerância à fermentação HG, bem como em condições de reciclo celular como praticado nas cervejarias. E posteriormente, com as cepas selecionadas, realizou-se a produção das cervejas, as quais foram analisadas físico-química e sensorialmente. Para tanto, inicialmente 24 linhagens de bioetanol e três cepas cervejeiras (controles) foram avaliadas quanto ao crescimento em meio contendo maltose (YPM) e em mosto cervejeiro HG. A maltose é o açúcar majoritário do mosto cervejeiro, portanto as linhagens devem ser capazes de utilizar esse açúcar como fonte de carbono. Sete cepas foram incapazes de se desenvolver satisfatoriamente, sendo inapropriadas para o processo cervejeiro e, por isso, excluídas da seleção. As linhagens foram analisadas quanto à fermentação em mosto HG, verificando-se três perfis de fermentabilidade, que se assemelharam ao das cepas controles; a produção de etanol foi coerente com estas observações, assim como o total de CO_2 liberado durante a fermentação. Somente três linhagens apresentaram-se com baixa velocidade fermentativa e/ou com redução na viabilidade celular, portanto com desempenho fermentativo insatisfatório e vulneráveis aos estresses do processo, sendo, por isto, excluídas. Em seguida, as cepas foram avaliadas quanto à produção de H_2S, espuma, floculação e tolerância ao etanol, aspectos relevantes ao processo cervejeiro. Pelo comportamento das linhagens em todas as etapas avaliadas, nove cepas foram selecionadas para a fermentação com reciclo celular. Nessa avaliação, parâmetros de viabilidade celular, produção de etanol e fermentabilidade foram analisados. No último ciclo, foram estimados os teores celulares de trealose e glicogênio, e também a formação de mutantes *petite*. Cinco cepas foram selecionadas para a produção das cervejas. As análises físico-químicas e sensorial mostraram que as cepas de bioetanol agregaram características organolépticas desejáveis à bebida, produzindo ésteres e alcoóis superiores, atribuindo notas a especiarias e a frutas, promovendo complexidade sensorial às cervejas. O ambiente de processos produtivos de bioetanol se mostrou como uma fonte preciosa de biodiversidade, até então não explorada, para os processos cervejeiros, destacando linhagens com potencial fisiológico e tecnológico para a elaboração de cervejas especiais diferenciadas, com peculiaridades de sabor e aroma.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Cerveja; Etanol; Alta densidade; Análise sensorial; Estresses

ABSTRACT

Yeasts from bioethanol process: potential for specialty beer production with high-gravity wort

The increasingly demand for specialty beers has led production sector to search for innovations. In the fermentation scope, yeasts are a crucial point, both because of process stress tolerance as well as beer aromatic compounds production. Brewing process which use high-gravity (HG) worts impose higher stressful conditions to the yeast due to increased osmotic pressure in the beginning, and higher ethanol concentration at the end of fermentation. Yeasts isolated from bioethanol process have a potential to be exploited because they could contribute to a beer with desirable sensorial traits, and their higher tolerance to stress conditions could be suitable for high-gravity brewing, especially when yeast biomass is cropped for recycling into subsequent fermentations. In this work, the physiological and technological potential of bioethanol yeast strains have been evaluated for HG brewery wort fermentation for production of ale specialty beer. For that, we search for selecting strains with relevant physiological traits to the brewing process, mainly with tolerance features to HG fermentation as well as to cell recycling, a common brewery practice. After, the selected yeast strains were used to produce the beers, which were submitted to physicochemical and sensorial analysis. Initially, 24 bioethanol yeast strains and 3 commercial brewing yeasts (controls) were evaluated for growth in maltose medium (YPM) and in HG brewery wort. Maltose is the major sugar of brewing wort, thus yeast strains should be able to consume this carbohydrate as carbon source. Seven bioethanol yeast strains were not able to grow efficiently on YPM and HG wort, and were therefore unsuitable for brewing, being excluded from selection. Selected strains were evaluated in fermentation assessment of HG wort and showed three fermentability profiles similar to those of the brewer's strains; the ethanol production was consistent with these results as well as total CO_2 liberated along fermentation. Only three bioethanol yeast strains exhibited slow fermentation velocity and/or reduced cell viability, showing unsuitable fermentation performance and vulnerable to stressful conditions, being therefore discarded. Next, the strains were evaluated for other relevant brewing traits: H_2S production, foam, flocculation and ethanol tolerance. Considering the bioethanol yeast strains performance in the previous experiments, nine strains were chosen to cell recycling fermentation assessment. The following parameters were analyzed in all cycles: cell viability, ethanol production and fermentability, with the exception of trehalose and glycogen cellular content and petite mutants, estimated in the last cycle. Five strains were selected for beer production. The physicochemical and sensorial analyses demonstrated that the bioethanol strains contributed to desirable organoleptic traits to the beers, producing esters and higher alcohols aromatic compounds, and imprinting spicy and fruity notes, which all attributed sensorial complexity to the beer. The bioethanol process environment presented a valuable source of biodiversity, so far unexploited, to brewing process, highlighting strains with physiological and technological potential to produce differentiated specialty beers, with flavor and aroma particularities.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Beer; Ethanol; High-gravity; Sensorial analysis; Stress

1 INTRODUÇÃO

Dentro do segmento de bebidas alcoólicas no Brasil, as cervejas representam o maior mercado, correspondendo, em 2015, a um volume de produção que ultrapassou 13,8 bilhões de litros (SISTEMA DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS – SICOBE, 2016), sustentando o país na terceira posição no ranking mundial dos maiores produtores da bebida (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2015).

Neste segmento, as cervejas especiais conquistam cada vez mais espaço, principalmente pela qualidade superior, atrelada a características sensoriais diferenciadas, e também pelo aumento contínuo da demanda de brasileiros, que passam a consumir produtos com maior valor agregado (BRASIL, 2013; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS - ABRABE, 2014).

As cervejas especiais podem ser produzidas a partir de mostos com diferentes densidades originais, ou seja, mostos com diferentes concentrações de açúcares. Nas fermentações tradicionais são utilizados mostos em torno de 12ºP, enquanto que nas fermentações de alta densidade (*high-gravity brewing*), se utilizam mostos entre 16 a 18ºP (BLIECK et al., 2007). Concentrações mais elevadas de açúcares acentuam algumas condições de estresse para a levedura, como a pressão osmótica no início da fermentação, e o maior teor alcoólico ao final da mesma (GIBSON et al., 2007; LODOLO et al., 2008).

Tais condições influenciam a atividade fisiológica da levedura, bem como seu desempenho fermentativo, refletindo na qualidade da cerveja (PIDDOCKE et al., 2009; LEI et al., 2012; YU et al., 2012), sendo muito importante, então, que a levedura se mantenha metabolicamente ativa, ou seja, com elevada viabilidade. O adequado estado fisiológico da linhagem é determinante para manter as características sensoriais da bebida, e além disso, é de particular interesse que a levedura consiga tolerar fermentações subsequentes (reciclo celular), como é usualmente praticado na indústria cervejeira (PRATT et al., 2003; BLIECK et al., 2007; STEWART; RUSSELL, 2009). Alguns atributos fisiológicos são fundamentais quando se trata de manutenção da viabilidade celular (FRANÇOIS; PARROU, 2001). Um deles é a trealose, componente que protege a célula contra estresses hídricos, térmico e etanólico (MANSURE et al., 1997; ATTFIELD, 1997; BENAROUDJ et al., 2001). O outro é o glicogênio, componente de reserva energética e esqueleto carbônico que auxilia a levedura em momentos de privação nutricional (HOHMANN, 2002).

A crescente demanda por cervejas especiais vem impulsionando o setor a buscar inovações para o seu processo. No âmbito da fermentação, as leveduras constituem um ponto chave, tanto no que tange à tolerância aos estresses do processo garantindo sua eficiência

quanto no que se refere à produção dos compostos aromáticos da bebida (BOKULICK; BAMFORTH, 2013).

Leveduras provenientes de diferentes fontes se mostram com grande versatilidade fisiológica, podendo ser utilizadas para a elaboração de produtos diversificados (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). A variabilidade existente entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fontes alternativas pode ser explorada para utilização em outros processos (ALBERTIN et al., 2011). Nessa perspectiva, trabalhos têm destacado linhagens isoladas de frutas (LENTZ et al., 2014), massa base de pão (MARONGIU et al., 2015), ambiente produtivo de cachaça (ARAÚJO, 2013) e processo vinícola (CANONICO et al., 2014), com potencial para o processo cervejeiro, tanto no que se refere a eficiência fermentativa quanto na qualidade sensorial da bebida.

Dentro desse contexto, uma fonte potencial de leveduras ainda não explorada para o processo cervejeiro são as destilarias brasileiras de produção de bioetanol. As linhagens provenientes desse ambiente se mostram mais tolerantes aos estresses do processo fermentativo que linhagens de vinho, panificação e cervejaria, acumulando maiores conteúdos de trealose e glicogênio e sustentando alta viabilidade celular (BASSO et al., 2008). Estudos prévios (FURLAN, 2012) para a produção de etanol têm apontado que linhagens encontradas no ambiente das destilarias brasileiras apresentam fenótipos com perfil de tolerância para conduzir fermentações com alto teor alcoólico.

Estes atributos são extremamente interessantes frente a fermentações cujos estresses são acentuados, podendo ser oportuno a um processo de produção de cerveja especial que emprega mosto com alta concentração de açúcares, haja vista que a levedura é primordial para a produção e qualidade da cerveja (BRIGGS et al., 2004; BLIECK et al., 2007). Tais linhagens também poderiam contribuir para um produto diferenciado, com peculiaridades de sabor e aroma, além de ampliar a gama de leveduras disponíveis para a fermentação cervejeira no Brasil, visto que aqui as leveduras comerciais amplamente utilizadas são importadas. Portanto, linhagens tipicamente nacionais favoreceriam a diminuição da dependência externa e a regionalização do produto, característica que se aliaria ao conceito de personalização das cervejas especiais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Setor cervejeiro

O setor cervejeiro está em expansão no Brasil, e atualmente representa um dos segmentos que mais geram empregos no país, 2,7 milhões entre empregos diretos, indiretos e induzidos, superando, entre 2010 e 2014, o índice geral de crescimento da indústria (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA – CERVBRASIL, 2014).

Em 2015, a produção de cerveja no Brasil totalizou mais de 13,8 bilhões de litros (SICOBE, 2016), o que sustenta o país na terceira posição no ranking mundial dos maiores produtores de cerveja, ficando atrás apenas da China (44,9 bilhões) e Estados Unidos (22,5 bilhões) (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2015). Contudo, o Brasil apresenta um enorme potencial de crescimento, levando-se em conta que é um dos países com maior número de habitantes, onde o consumo per capita de cervejas (64 litros) ainda fica bem abaixo do maior consumidor, a República Tcheca (144 litros) (BARTH-HASS, 2012; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2014). Assim, há grandes oportunidades para investimentos e inovações no setor.

Com relação ao mercado cervejeiro, 98,6% equivalem às grandes companhias cervejeiras, enquanto que 1,4% correspondem à fatia das cervejarias regionais e microcervejarias (ASSOCIAÇÃO DOS FABRICANTES DE REFRIGERANTES DO BRASIL – AFREBRAS, 2013).

As microcervejarias, de acordo com a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), são microindústrias, em grande parte de origem familiar, que produzem cerveja especial a partir de ingredientes selecionados, buscando um produto de qualidade superior, com melhores atributos sensoriais (ABRABE, 2014). Assim, ofertam ao mercado uma bebida elaborada e de características particulares de aroma e sabor, sem visar à concorrência em preço com as marcas das grandes companhias cervejeiras (CERVIERI JÚNIOR et al., 2014).

No Brasil, estima-se que existam pouco mais de 200 microcervejarias, localizadas, principalmente, nas regiões sul e sudeste (ABRABE, 2014). Nos Estados Unidos, esse número já alcançou a margem de 1.871 no ano de 2014, exibindo um crescimento de 27,8% em relação ao ano anterior (BREWERS ASSOCIATION, 2015). Na Europa, em 2014, o montante chegou a 5.964 unidades, considerando os 28 países membros da União Europeia, além de Noruega, Suíça e Turquia (THE BREWERS OF EUROPE, 2015).

Nesses países, a cultura cervejeira é bastante consolidada e difundida. No Brasil, vem se fortalecendo a cada ano, tanto que o consumo de cervejas especiais aumentou em 36%

entre os anos de 2011 e 2013 (ARANHA, 2014). Estima-se que no país, esses produtos representem 5 a 6% das vendas totais de cervejas (FLARYS, 2014) e a tendência é de que o setor continue se fortalecendo.

Diversos motivos têm levado ao crescente interesse dos consumidores por cervejas especiais, como a insatisfação com a cerveja popular massificada, a difusão do conhecimento e da cultura cervejeira no país, a qualificação da produção e a melhoria da renda da população brasileira, que passa a consumir produtos com maior valor agregado, buscando satisfação sensorial, além de novas e boas experiências de consumo (BRASIL, 2013; ABRABE, 2014).

Assim, não é a competitividade de preço que estimula as vendas desses produtos, mas sim sua qualidade superior e diversidade de ingredientes, sabores e aromas, sendo absorvidos principalmente pelas classes de maior poder aquisitivo (CERVIERI JÚNIOR et al., 2014). As cervejas especiais podem apresentar preços que variam de R$ 5,00 a R$ 300,00 (GONÇALVES, 2008 apud MACHADO; TAKITANE, 2011), sendo sua demanda também influenciada pelo *status* social proporcionado pelo consumo de rótulos especiais (CERVIERI JÚNIOR et al., 2014).

2.2 Processo de produção de cerveja

Para a produção de qualquer cerveja, destacam-se quatro ingredientes básicos: a água, o malte de cevada, o lúpulo e a levedura (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010), sendo a cerveja produzida a partir da fermentação alcoólica do mosto de malte de cevada com lúpulo pela ação da levedura (WALKER, 2000). O processo de produção da cerveja engloba várias etapas: moagem do malte, infusão do malte moído em água, mosturação ou tratamento enzimático para hidrólise do amido e proteínas, filtração e fervura do mosto, tratamento do mosto (remoção do precipitado, resfriamento e aeração), fermentação, maturação, clarificação, carbonatação e envase (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010).

Cada etapa do processo tem importância fundamental para a produção da cerveja. A moagem do malte de cevada é o primeiro passo para a produção do mosto, e é fundamental que seja realizada de forma a desintegrar adequadamente o endosperma do grão, para obter um bom rendimento em açúcares. No entanto, deve-se ter o cuidado de não triturar a casca, pois isso compromete a filtração, além de agregar compostos amargos, como taninos, ao mosto (GOLDAMMER, 2008).

Após moagem, o malte é adicionado à água, e procede-se a etapa de mosturação, na qual emprega-se um perfil de tempo e temperatura, cujas variações dependem das características que se deseja ao mosto e do estilo de cerveja a ser produzido (MONTANARI

et al., 2005). Na mosturação, a temperatura vai sendo elevada lentamente, em função do tempo, com períodos de repouso para atuação enzimática sobre os componentes do malte, como o amido e as proteínas (LINKO et al., 1998). Um dos objetivos principais dessa etapa é produzir um mosto com níveis apropriados de açúcares fermentescíveis, nutrientes para a levedura como aminoácidos, vitaminas, íons inorgânicos e lipídios, e compostos de sabor (KOLJONEN et al., 1995; LODOLO et al., 2008).

Na hidrólise do amido, ocorre a atuação das enzimas α- e β-amilases, convertendo-o em açúcares mais simples. A enzima β-amilase atua sobre o amido clivando-o em unidades de maltose, enquanto a α-amilase produz unidades de glicose, maltotriose e outros oligossacarídeos (moléculas com 4 ou mais unidades de glicose) (STEWART; RUSSELL, 2009).

Basicamente, a composição do mosto cervejeiro caracteriza-se pela presença de diferentes açúcares fermentescíveis: maltose, maltotriose, glicose, frutose e sacarose. A maltose corresponde ao açúcar fermentescível mais abundante do mosto (45-65%), seguida da maltotriose (15-20%). Em menores concentrações são encontrados glicose (10-15%), frutose (5%) e sacarose (5%). O mosto também contém açúcares infermentescíveis, em sua maior parte composto por dextrinas (oligossacarídeos), que representam cerca de 25% dos carboidratos totais (BOULTON; QUAIN, 2001; SAERENS et al., 2010).

Após a mosturação, o líquido açucarado (mosto) é separado dos componentes insolúveis mediante filtração. Esse processo é realizado usando o próprio bagaço do malte que atua como uma camada filtrante, ou pode ser realizada através de filtros apropriados. A camada de bagaço formada também pode ser lavada com água aquecida para extrair mais açúcares, aumentando o rendimento em extrato (LINKO et al., 1998; BAMFORTH, 2000).

Após a filtração, o mosto é submetido à fervura, geralmente por uma hora. Nessa etapa, adiciona-se o lúpulo, que irá incorporar amargor e aroma ao produto final. A fervura também contribui para a esterilização do mosto, inativação enzimática, precipitação de complexos de proteínas e polifenóis, evaporação de compostos indesejáveis da cevada e isomerização dos alfa-ácidos do lúpulo em iso-alfa-ácidos, promovendo amargor à bebida (BAMFORTH, 2000).

Durante o processo de fervura, ocorre coagulação proteica e interações de componentes nitrogenados com carboidratos e polifenóis, levando à formação de um precipitado insolúvel conhecido como “trub quente”. Este precipitado precisa ser removido do mosto, pois pode aderir à parede celular das leveduras, prejudicando o transporte de substâncias para dentro e fora das células, além de comprometer a estabilidade do sabor,

causar amargor severo na cerveja e instabilidade coloidal (BARCHET, 1993). A remoção é geralmente realizada por rotação vigorosa do mosto formando um redemoinho, num processo conhecido como "*whirlpool*" ou turbilhonamento, seguido de repouso de 20-30 minutos até que o "trub" se compacte no fundo da tina de fervura e possa ser separado do mosto (KÜHBECK et al., 2007).

Em seguida, o mosto é resfriado e inoculado com levedura para que se inicie a fermentação. Na fermentação alcoólica, a levedura metaboliza os açúcares do mosto, convertendo-os em etanol e dióxido de carbono, além de inúmeros compostos secundários relacionados às características sensoriais da bebida (BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

O processo pode ser denominado de baixa fermentação (*bottom fermentation*) ou de alta fermentação (*top fermentation*), dependendo do comportamento de floculação/sedimentação da levedura, bem como da temperatura de fermentação da mesma (YOUNG, 1996; VENTURINI FILHO, 2000). Também, ao final do processo fermentativo, é muito comum reutilizar a levedura, assim, as células são coletadas e reinoculadas num novo mosto, sendo recicladas entre uma fermentação e outra (POWELL et al., 2003).

Após a fermentação, o mosto fermentado, denominado de cerveja "verde" ou "imatura", é submetido ao processo de maturação ou fermentação secundária, na qual ocorre uma redução da temperatura de armazenamento da cerveja por um período de tempo estabelecido (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010). Nesse processo, ocorre um aprimoramento de sabor e aroma, devido à redução das dicetonas vicinais e compostos sulfurosos pela levedura ainda em suspensão (STEWART; RUSSELL, 2009), clarificação da cerveja, pela sedimentação da levedura e precipitação de complexos proteicos-polifenólicos promovendo estabilidade coloidal, e carbonatação da bebida (LODOLO et al., 2008).

Terminado o período de maturação, a cerveja pode ser filtrada para promover uma maior clarificação, e depois carbonatada e envasada. Muitas cervejas especiais, incluindo as artesanais, geralmente não passam pela etapa de filtração, e sua carbonatação ocorre de forma natural (CANONICO et al., 2014), ao contrário de outras nas quais é feita artificialmente, por injeção de CO_2 comprimido (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010). A carbonatação natural ou refermentação da cerveja em garrafa ocorre mediante adição de açúcar e levedura à bebida seguida do envase em garrafa. As leveduras fermentam esse açúcar liberando CO_2, promovendo a carbonatação natural da bebida (VANDERHAEGEN et al., 2003).

Na Figura 1 encontra-se um esquema simplificado referente às principais etapas do processo de produção de cerveja.

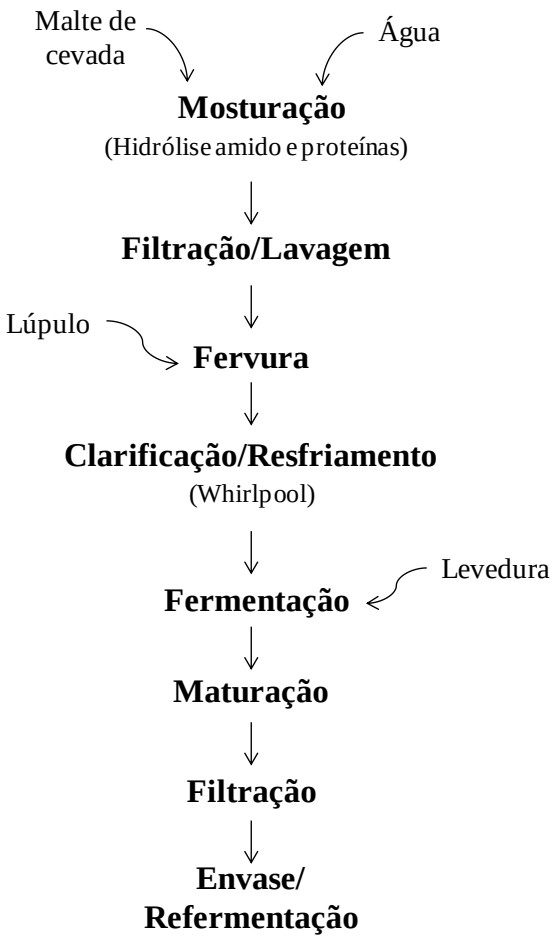


Figura 1 – Esquema simplificado do processo de produção de cerveja

2.3 Leveduras cervejeiras

As leveduras têm trazido benefícios para a humanidade desde as civilizações antigas, devido a sua utilização no preparo de alimentos e bebidas fermentadas. Dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, há espécies que vem sendo amplamente utilizadas para a elaboração de importantes produtos como pão, vinho e cerveja (RAINIERI et al., 2003; SICARD; LEGRAS, 2011).

As leveduras pertencentes ao complexo *Saccharomyces sensu stricto*, em sua maioria, podem sobreviver sem a presença de oxigênio através do processo fermentativo (SICARD; LEGRAS, 2011). Elas possuem a habilidade de crescer utilizando-se de carboidratos que são convertidos em etanol e dióxido de carbono através da fermentação, inclusive na presença de oxigênio (WALKER, 2000). Quando em concentrações elevadas de carboidratos (glicose), independente ou não da presença de oxigênio, a levedura realiza a fermentação. Nessa condição, ocorre a inibição da atividade respiratória pelo mecanismo de repressão pela glicose (BARNETT; ENTIAN, 2005). Esse processo também é referido como efeito Crabtree e as

linhagens com essa capacidade são denominadas de Crabtree positivas (LODOLO et al., 2008).

A diferenciação de espécies dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto* é uma tarefa difícil e com muitas controvérsias. A classificação mediante taxonomia convencional, baseada em testes morfológicos e fisiológicos, embora ainda utilizada, apresenta limitações, principalmente quando aplicada às leveduras, e por isso os métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados, trazendo novas informações, possibilitando a reclassificações de linhagens (RAINIERI et al., 2003; BRIGGS et al., 2004).

As leveduras cervejeiras se incluem dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto*. Pertencem ao gênero *Saccharomyces*, e são classificadas em duas categorias: *ale* e *lager* (RUSSELL, 2006; STEWART; RUSSELL, 2009). As leveduras *ale* pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae* e compreendem linhagens com maior diversidade genética, tendo sido isoladas de diversos ambientes. Já a taxonomia da levedura *lager* tem sofrido evoluções ao longo do tempo, principalmente com a utilização dos métodos moleculares, passando por reclassificações, transitando entre *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. uvarum* e *S. cerevisiae* tipo *lager* para o nome aceito atualmente *S. pastorianus* (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). A levedura *S. pastorianus* é uma espécie domesticada, selecionada para fermentação a baixas temperaturas, sendo proposto que ela originou-se como resultado de múltiplas hibridações interespecíficas entre leveduras *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* no próprio ambiente produtivo cervejeiro, por isso sua menor diversidade genética em comparação às leveduras *ale* (TAMAI et al., 1998; GIBSON; LITI, 2015).

A classificação das leveduras cervejeiras em *ale* e *lager*, a princípio, originou-se com base no comportamento das mesmas em relação à floculação/sedimentação (LODOLO et al., 2008; VIDGREN; LONDESBOROUGH, 2011). As leveduras *lager*, ao final da fermentação, floculam e sedimentam-se no fundo do fermentador, por isso são também referidas como "*bottom fermenting yeast*", enquanto que as leveduras *ale* formam agregados que se adsorvem às bolhas de CO_2, sendo levadas para a superfície do fermentador em tanques abertos, sendo referidas como "*top fermenting yeast*" (RUSSELL, 2006; STEWART; RUSSELL, 2009). No entanto, a utilização dos fermentadores modernos cilindrocônicos, pela pressão hidrostática e também pela própria seleção do processo, tem levado à espécies de leveduras *ale* que se sedimentam também no fundo do tanque (BAMFORTH, 2000; DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010).

A temperatura de fermentação também é outro parâmetro que difere as leveduras *ale* das *lagers*. As fermentações *ale* (alta fermentação) ocorrem sob temperaturas entre 15 a 25ºC

e levam cerca de 3 a 5 dias, ao passo que as fermentações *lager* (baixa fermentação) são realizadas a temperaturas mais baixas, 6 a 14ºC, perdurando por volta de 7 a 10 dias ou até várias semanas (LODOLO et al., 2008; SAERENS et al., 2010). Ademais, a temperatura de crescimento também se distingue entre estas leveduras, sendo as cepas *lager* incapazes de crescer a 37ºC (LODOLO et al., 2008; STEWART; RUSSELL, 2009).

Outro critério tradicionalmente utilizado para a diferenciação de tais leveduras baseia-se na capacidade de utilização dos açúcares. A diferença mais acentuada é em relação à assimilação do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). As leveduras *lager* sintetizam a enzima melibiase (α-galactosidase), conseguindo realizar a hidrólise da melibiose, entretanto as leveduras *ale* não, sendo, portanto, incapazes de assimilar esse açúcar (WALKER, 2000; RUSSELL, 2006; DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010). Também foram observadas diferenças em relação à assimilação da maltotriose. As cepas *lager* apresentam maior eficiência em assimilar esse açúcar que as cepas *ale* e menor maltotriose residual é encontrada nas fermentações *lager* (ZHENG et al., 1994; BOULTON; QUAIN, 2001). Além disso, dentre as cepas *ale* há linhagens incapazes de utilizar esse açúcar (BRIGGS et al., 2004).

Por esses motivos, existem diferenças quanto à fermentabilidade ou atenuação aparente do mosto por parte das leveduras cervejeiras. Esses termos se referem à proporção de carboidratos que foram consumidos pela levedura durante a fermentação do mosto (HUUSKONEN et al., 2010). Grande parte das leveduras é capaz de atenuar o mosto em uma faixa que varia de 65 a 80% (PALMER, 2006), sendo a utilização dos açúcares do mosto influenciada pela linhagem empregada, concentração do mosto e espectro de açúcares do mesmo, além de, ainda, por fatores ambientais (temperatura, oxigênio, nitrogênio) (RUSSELL, 2006).

Na produção da cerveja, as leveduras são os agentes responsáveis pela atividade microbiológica mais importante do processo, a fermentação do mosto (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). Nesse processo, os açúcares fermentescíveis são convertidos, a partir do metabolismo da levedura, em etanol, dióxido de carbono e uma série de compostos intermediários relacionados ao sabor e aroma da cerveja. Dentre estes, incluem-se os ésteres, os alcoóis superiores, os aldeídos, as dicetonas vicinais, os compostos sulfurosos, entre outros (WALKER, 2000; RUSSELL, 2006).

As cepas empregadas na fermentação determinam, em grande parte, as características sensoriais da cerveja a partir dos compostos que elas produzem, bem como suas respectivas concentrações (STEWART; RUSSELL, 2009). As linhagens *ale* geralmente produzem mais ésteres e alcoóis superiores que as linhagens *lager* (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977; YU et

al., 2012), e estas últimas, no geral, produzem maiores quantidades de H_2S que as primeiras (WALKER; SIMPSON, 1993). As cepas *ale* e *lager* são responsáveis pela fermentação dos dois principais estilos de cerveja existentes no mercado: as *ales* (cerveja de alta fermentação) e as *lagers* (cerveja de baixa fermentação), respectivamente (BAMFORTH, 2000; LODOLO et al., 2008). As cervejas *ale* caracterizam-se por notas frutadas e florais bastante pronunciadas, enquanto que nas *lagers* as notas são mais neutras (GIBSON; LITI, 2015).

Além da especificidade de cada linhagem, as características do processo fermentativo como temperatura, taxa de inoculação, concentração do mosto, bem como seu espectro de açúcares, também podem influenciar os níveis de compostos secundários formados na cerveja. Portanto, além de se utilizar uma cepa adequada ao estilo de cerveja que se deseja, é necessário também um controle apropriado das condições da fermentação para se obter um produto de qualidade com as características esperadas (BAMFORTH, 2003).

Outros critérios também são utilizados na escolha e seleção das cepas a serem utilizadas na produção das cervejas, como habilidade de resistir aos estresses impostos pela concentração de etanol e pressão osmótica encontrada em cervejarias; produção reproduzível dos níveis de compostos de sabor e aroma; características de floculação ideais para o processo empregado; boas características de manipulação (manutenção de viabilidade durante armazenamento, estabilidade genética) (HAMMOND, 1996).

Também, como não são todas as linhagens de *S. cerevisiae* que conseguem usar a maltose, açúcar mais abundante do mosto cervejeiro (PALMER, 2006; LODOLO et al., 2008), como fonte de carbono, a habilidade de utilização principalmente desse açúcar é um critério utilizado para a seleção de novas cepas para a produção de cerveja (BRIGGS et al., 2004; STEWART; RUSSELL, 2009; MARONGIU et al., 2015).

2.4 Fermentação de alta densidade (*high-gravity brewing*)

Os processos cervejeiros podem ser caracterizados quanto à densidade ou extrato original do mosto, ou seja, quanto à concentração de sólidos dissolvidos. Nos processos tradicionais, o mosto apresenta extrato original entre 10 e 12ºP (*normal-gravity (NG)*), enquanto que nos processos de alta densidade (*high-gravity (HG) brewing*) utilizam-se mostos com concentração entre 16 a 18ºP. Ainda há o processo de fermentação de densidade muito alta (*very-high-gravity (VHG) brewing*), que faz uso de mostos com concentração acima de 18ºP (BRIGGS et al., 2004; STEWART; RUSSELL, 2009).

A fermentação de alta densidade surgiu como forma de aumentar o volume de produção e reduzir os custos, utilizando-se das mesmas facilidades fabris do processo

tradicional (HAMMOND, 1996). Fazendo-se uso de mostos mais concentrados em açúcares obtêm-se cervejas com teores alcoólicos mais elevados, que posteriormente são diluídas com água para cervejas com teor alcoólico em torno de 5% (BLIECK et al., 2007). Além disso, para reduzir os custos de produção, empregam-se adjuntos como fonte de açúcares para aumentar a concentração do mosto em substituição à parte do malte de cevada (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010).

No entanto, o uso de mostos concentrados pode não ter a finalidade de aumentar o volume e baratear o processo produtivo. Dentro da gama de cervejas especiais existentes no mercado, há diversos estilos que se caracterizam por cervejas mais alcoólicas, ricas em aromas e sabores diferenciados (PAPAZIAN, 2006). Esses processos utilizam mostos com maiores concentrações de açúcares visando à produção de cervejas com maior teor alcoólico.

No processo fermentativo, a levedura está exposta a um ambiente altamente sujeito a variações como redução das fontes de carbono e de nitrogênio, diminuição da disponibilidade de nutrientes e oxigênio, além de fatores estressantes como pressão osmótica, etanol, pH e temperatura (GIBSON et al., 2007). No processo de alta densidade, algumas condições são mais pronunciadas às leveduras que no processo tradicional. O mosto mais concentrado em açúcares exerce maior pressão osmótica sobre a levedura e a toxidez do etanol é acentuada ao final da fermentação (REES; STEWART, 1997; PIDDOCKE et al., 2009).

Essas condições podem não somente comprometer o estado fisiológico da levedura, mas também podem afetar seu desempenho em fermentações subsequentes (KOBAYASHI et al., 2007; SIGLER et al., 2009). No processo cervejeiro é comum coletar a levedura ao final da fermentação e reinoculá-las em um novo mosto, assim as células são recicladas de uma fermentação para outra (POWELL et al., 2003). Esse processo é conduzido até certo número de vezes antes que a vitalidade da levedura se deteriore (POWELL et al., 2003; BRIGGS et al., 2004; GIBSON et al., 2007). Dessa forma, é importante que a levedura coletada esteja com alta viabilidade (acima de 90%) (HUUSKONEN et al., 2010), pois dela irá depender o desempenho fermentativo e a manutenção da qualidade sensorial da bebida (BRIGGS et al., 2004; BLIECK et al., 2007).

Os processos fermentativos de alta densidade podem afetar consideravelmente a atividade fisiológica da levedura e a produção dos compostos aromáticos da cerveja. No trabalho de Piddocke et al. (2009), a alteração da concentração do mosto de 14 para 21ºP levou à redução do crescimento celular da levedura, com maior duração da fase lag antes de iniciar a produção de etanol e maior quantidade de açúcares remanescentes ao final da fermentação. Também, o aumento da densidade favoreceu a produção de ésteres,

principalmente acetato de etila e acetato de isoamila, além de aumentar a produção de acetaldeído e diminuir a síntese de alcoóis superiores como o propanol e o isobutanol.

Yu et al. (2012), comparando fermentações com mostos de densidade tradicional (10,93ºP), alta densidade (16,53ºP) e densidade muito alta (23,66ºP), observaram reduções nas taxas de crescimento específico, consumo específico de açúcares e produção específica de etanol a medida que aumentou-se a densidade inicial do mosto. Da mesma forma, houve decréscimo no transporte de açúcares e na atividade de enzimas glicolíticas como a fosfofrutoquinase e a piruvatoquinase, além de redução da viabilidade celular. As mesmas tendências descritas em Piddocke et al. (2009) foram observadas em relação à formação dos compostos aromáticos.

Lei et al. (2012) também relataram queda no crescimento e na viabilidade celular da levedura, maior teor de açúcares residuais ao final da fermentação, além de alterações no perfil aromático, conforme elevou-se a densidade inicial do mosto em seus processos. E em Sigler et al. (2009), tais processos tiveram seus efeitos mais pronunciados sobre a levedura a medida em que se perfazia o reciclo das células em suas fermentações.

Nessas condições, é necessário que as leveduras empregadas sejam mais tolerantes para que a fermentação e a qualidade da cerveja não fiquem comprometidas. Para tanto, estudos têm sido conduzidos para a obtenção de linhagens cervejeiras com melhores desempenhos fermentativos em processos HG e VHG, e para isso, variadas estratégias vem sendo empregadas com o intuído de geração de biodiversidade induzida por mutações como: exposição das células à luz ultravioleta (BLIECK et al., 2007), à compostos químicos mutagênicos (HUUSKONEN et al., 2010; YU et al., 2012), bem como genética clássica para obtenção de híbridos de linhagens *lager* e *ale* (SANCHEZ et al., 2012) e evolução adaptativa (EKBERG et al., 2013). Também linhagens cervejeiras têm sido aperfeiçoadas por meio de técnicas de engenharia genética (VAN MULDERS et al., 2009; VIDGREN et al., 2009; ZHANG et al., 2011; LU et al., 2012), que no entanto ainda esbarram na questão da aceitabilidade de produtos alimentícios derivados de microrganismos geneticamente modificados (BRIGGS et al., 2004; SAERENS et al., 2010).

Dentre as variadas estratégias empregadas na busca de linhagens tolerantes para o processo cervejeiro de alta densidade, uma alternativa que poderia destacar linhagens promissoras seria o ambiente fermentativo de produção de bioetanol. Nesse ambiente, as leveduras são expostas a muitos dos estresses encontrados também nas cervejarias (pressão osmótica, etanol, temperatura, acidez, disponibilidade nutricional e oxigenação) (GIBSON et al., 2007; BRIGGS et al., 2004), além dos quais o reciclo de células, que no processo

alcooleiro é realizado no decorrer da safra que dura de 200-250 dias (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008). Nesses ambientes, o próprio processo seleciona as linhagens mais adaptadas ao meio, ao passo que as cepas introduzidas no início da safra vão sendo substituídas por cepas mais resistentes, que acabam dominando o processo (BASSO et al., 2008).

Estudos prévios (FURLAN, 2012) tem revelado que linhagens isoladas de destilarias de bioetanol apresentam atributos de tolerância a fermentações com alto teor alcoólico para a produção de etanol, exibindo maior acúmulo de trealose e glicogênio e sustentando maior viabilidade celular que a cepa PE-2, que é a mais amplamente utilizada nas destilarias de todo o Brasil. Esse potencial fisiológico é interessante para fermentações cervejeiras com mostos de alta densidade, na qual vários estresses predominam, e que necessitam da manutenção do adequado estado fisiológico da levedura para que as mesmas possam ser reutilizadas no reciclo e para que as características sensoriais da bebida sejam mantidas (BRIGGS et al., 2004; BLIECK et al., 2007).

Trabalhos recentes têm buscado novas linhagens de leveduras para o processo cervejeiro a partir de diferentes fontes de isolados que não o de cervejas. Araújo (2013) avaliou leveduras provenientes do processo fermentativo de cachaça. Lentz et al. (2014) avaliaram linhagens de leveduras isoladas de diferentes frutas em estágio maduro. Canonico et al. (2014) analisaram linhagens isoladas de ambiente vínicola e Marongiu et al. (2015) investigaram a utilização de leveduras isoladas de massa base de pão (massa fermentada ao natural que serve com inóculo para a produção de pães). As diferentes fontes de isolados destacaram linhagens com potencial para o processo cervejeiro, tanto no âmbito fermentativo quanto no sensorial.

Leveduras provenientes de diferentes fontes se mostram com grande versatilidade fisiológica, podendo ser utilizadas para a elaboração de produtos diversificados (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). A variabilidade existente entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de variadas fontes pode ser explorada para utilização em outros processos, uma vez que o meio é o principal fator que modela a fermentação alcoólica, seguido pelo fator genético e por último pela interação entre ambiente e genótipo (ALBERTIN et al., 2011).

Assim, linhagens provenientes de destilarias de bioetanol poderiam não somente representar uma nova fonte de linhagens para o processo cervejeiro, mas também poderiam contribuir para um bom desempenho fermentativo nos processos de alta densidade, associado à prática do reciclo celular, além de igualmente agregar atributos sensoriais diferenciados para

a bebida, uma vez que os sabores e aromas essenciais, em sua maioria, são produzidos a partir da levedura empregada na fermentação (VANDERHAEGEN et al., 2003).

2.5 Características de tolerância em leveduras

O comportamento, o desempenho e a qualidade de uma linhagem de levedura são influenciados por fatores, que conjuntamente, compreendem os efeitos ocasionados pelos aspectos ambientais ao qual a levedura está exposta desde sua inoculação no mosto em diante, e pelo seu aparato genético, que é particular de cada linhagem (STEWART; RUSSELL, 2009).

Durante a fermentação, a levedura é submetida a vários fatores estressantes. Alguns são decorrentes do meio em que ela se encontra como pressão osmótica ocasionada pelos açúcares, deficiência nutricional, temperatura, oxigenação, enquanto outros são oriundos do próprio metabolismo celular como o etanol, atuando de forma inibitória, principalmente em fermentações de alta densidade (BAI et al., 2008). Diante dessas condições, as leveduras necessitam desenvolver respostas rápidas para se adaptar e sobreviver às condições adversas, e uma dessas adaptações consiste em acumular carboidratos de reserva como a trealose e o glicogênio (ESTRUCH, 2000).

Essas respostas envolvem alterações no metabolismo de carbono, aumentando a capacidade celular em produzir trealose, para fins de proteção, e glicogênio como fonte de reserva, além de outros metabólitos (HOHMANN, 2002). As rotas envolvidas na produção desses componentes iniciam-se a partir de intermediários formados na glicólise. A expressão dos genes que codificam as enzimas que produzem e degradam esses componentes é regulada e maximizada sob condições estressantes, e não somente no nível de expressão gênica, mas também através do controle da atividade enzimática e disponibilidade de substrato, buscando um controle e balanço do metabolismo celular para se adaptar ao meio (HOHMANN, 2002).

2.5.1 Trealose

A trealose é um dissacarídeo não-redutor composto por duas moléculas de glicose, unidas por ligação α (1-1). Em *Saccharomyces cerevisiae*, sua produção inicia-se com a conversão da glicose-6-fosfato juntamente com a UDP-glicose em trealose-6-fosfato pela enzima trealose-6-fosfato sintase, e posteriormente em trealose pela ação da trealose-6-fosfatase (LONDESBOROUGH; VUORIO, 1991).

Anteriormente, considerava-se que a trealose, assim como o glicogênio, eram somente componentes de reserva energética para a célula. No entanto, trabalhos tem demonstrado que

ela desempenha função protetora em condições de estresse, tendo sido encontrada em organismos capazes de sobreviver sob condições de congelamento, alta temperatura, desidratação, pressão osmótica e concentrações tóxicas de etanol (THEVELIAN, 1984; MANSURE et al., 1997; ATTFIELD, 1997; BENAROUDJ et al., 2001).

Sua função protetora está relacionada com a manutenção da integridade da membrana plasmática. Segundo o modelo proposto por Crowe et al. (1984), o efeito protetor da trealose em condições de desidratação-hidratação baseia-se na alocação da trealose entre as moléculas de fosfolipídios da membrana, interagindo com seus grupos polares em substituição às moléculas de água, evitando, dessa forma, separações laterais dos componentes da membrana, mantendo sua fluidez.

A trealose também está relacionada com a manutenção da estabilidade das proteínas. Ela atua prevenindo a desnaturação proteica sob altas temperaturas ou agentes desnaturantes. Também evita que proteínas desnaturadas se agreguem mantendo seu estado parcialmente enovelado, a partir do qual podem ser reativadas por chaperonas ou proteínas de choque-térmico (HSPs) (SINGER; LINDQUIST, 1998).

Em condições de limitação nutricional, ou seja, quando ocorre privação de carbono, nitrogênio, fósforo ou enxofre no meio, as leveduras acumulam trealose. Essa resposta ocorre como forma de adaptar seu metabolismo às variações das condições externas do ambiente (LILLIE; PRINGLE, 1980; ARANDA et al., 2004). A trealose começa a se acumular na célula durante a fase lag da diauxia, quando o meio está exaurido em glicose e a taxa de crescimento decai (LILLIE; PRINGLE, 1980).

O acúmulo de trealose nas células também é induzido em várias condições de estresse (WIEMKEN, 1990; BANDARA et al., 2009), e relaciona-se com a manutenção da viabilidade celular durante a fermentação (SLAUGHTER; NOMURA, 1992; FRANÇOIS; PARROU, 2001). Células de *S. cerevisiae* submetidas a choque térmico aumentam seu conteúdo de trealose, possibilitando-as a tolerar condições mais adversas (BENAROUDJ et al., 2001; AN et al., 2011). Células expostas a condições osmóticas crescentes de sais (NaCl) apresentaram aumento no conteúdo de trealose, assim como maior viabilidade e tolerância ao etanol (SHARMA, 1997). Da mesma forma, em fermentações com alta concentração de açúcares, nas quais prevalece maior pressão osmótica no início e alta concentração de etanol ao final, leveduras cervejeiras acumulam mais trealose que em condições tradicionais (PIDDOCKE et al., 2009; YU et al., 2012). A tolerância ao etanol correlaciona-se, muitas vezes, com a concentração de trealose, de forma que cepas com maior viabilidade acumulam mais trealose (MANSURE et al., 1997).

Trevisol et al. (2011) avaliaram o efeito da trealose no desempenho fermentativo de *S. cerevisiae*. As cepas mutantes incapazes de produzir trealose exibiram o menor rendimento fermentativo, indicando que esse componente é importante na melhoria da produção de etanol. As cepas mutantes deficientes em transportar e hidrolisar a trealose apresentaram maior taxa de sobrevivência, conseguindo manter um nível significativo de trealose inicial. Isso também proporcionou maior produtividade em etanol em fermentações subsequentes (reciclo) e menor proporção de células *petite* na população, sugerindo, então, que esse dissacarídeo é necessário para a melhoria da capacidade fermentativa e da longevidade das células, assim como para resistir às condições estressantes.

Diante de todas essas considerações, fica evidente a importância da trealose nos processos cervejeiros. Nestes, especialmente em condições de fermentação de alta densidade (LODOLO et al., 2008), a importância de linhagens com capacidade de acumular trealose é essencial para um bom desempenho fermentativo.

No processo cervejeiro, as leveduras são reutilizadas e submetidas a fermentações sequenciais (PRATT et al., 2003). Tal prática pode levar a queda na viabilidade celular e também ao envelhecimento celular e ocorrência de mutações mitocondriais, aumentando a proporção de mutantes *petite* na população. O acúmulo de células *petite* pode resultar em efeitos prejudiciais à fermentação, como lentidão, açúcares residuais, comprometimento da floculação e alterações danosas aos compostos aromáticos da cerveja (GIBSON et al., 2008). Embora cada cepa possa apresentar uma tendência característica de mutações mitocondriais, foi verificado que a trealose é importante na manutenção da longevidade celular e na prevenção de tais mutações (TREVISOL et al., 2011).

Além disso, na produção de cervejas especiais, é muito comum realizar a refermentação da cerveja em garrafa para promover a carbonatação natural da bebida (VANDERHAEGEN et al., 2003). Nesse processo, a levedura é inoculada na própria cerveja, e embora esta seja suplementada com açúcar, ela está longe de ser um meio fermentativo favorável à levedura, principalmente pelo seu conteúdo alcoólico e de gás carbônico e baixa disponibilidade nutricional (DEKONINCK et al., 2012). Nesse sentido, a trealose seria de grande valia para a levedura.

Em linhagens cervejeiras de *S. cerevisiae*, a concentração de trealose é geralmente pequena ao final da fermentação, representando 2-3% do peso seco. Já em leveduras recuperadas de mostos com alta densidade, onde o estresse é maior, os níveis são maiores (BRIGGS et al., 2004).

2.5.2 Glicogênio

O glicogênio é um polissacarídeo ramificado composto por moléculas de glicose unidas por ligações α (1-4) e α (1-6). Esse componente é a principal fonte de reserva energética utilizada pela levedura (HOHMANN, 2002).

O glicogênio começa a se acumular na célula quando cerca de metade da glicose fornecida já tiver sido consumida, e seu acúmulo ocorre durante o período de transição da fase exponencial para a fase estacionária, quando o crescimento é limitado pela fonte nutricional (LILLIE; PRINGLE, 1980; PARROU et al., 1999). A exaustão de nitrogênio também promove acúmulo de glicogênio na célula (PARROU et al., 1999), assim como o fósforo e o enxofre (LILLIE; PRINGLE, 1980).

Tanto o glicogênio quanto a trealose podem ser usados para a manutenção celular em situações de exaustão de carbono e condições adversas. Essas reservas também são importantes para iniciar um novo ciclo de divisão celular, fornecendo rapidamente um fluxo maior de carbono e ATP quando as condições se tornam favoráveis (SILLJÉ et al., 1999).

Em situações em que toda a fonte de carbono do meio é exaurida, e as células de *S. cerevisiae* permanecem em condições desfavoráveis por um tempo prolongado (estado quiescente), as reservas de glicogênio são metabolizadas primeiro, em favor da trealose, daí sua típica função de reserva, possivelmente para que àquela possa desempenhar suas funções protetoras contra os estresses, prolongando a sobrevivência celular (FRANÇOIS; PARROU, 2001; SHI et al., 2010). Quando as células são transferidas para um meio rico novamente, ambas as reservas são degradadas no início da propagação celular (FRANÇOIS; PARROU, 2001; SHI et al., 2010). No entanto, a trealose é metabolizada preferencialmente quando as células saem do estado quiescente, atuando nesse caso como uma reserva favorecendo a pronta saída desse estado, para, então, as células rapidamente se proliferarem (SHI et al., 2010).

Silljé et al. (1999) relataram que o acúmulo de glicogênio e trealose em *S. cerevisiae* contribuem para a manutenção da viabilidade celular. Nesse estudo, as cepas selvagens que haviam acumulado esses carboidratos, conseguiram sobreviver (aproximadamente 100% de viabilidade) em meio sem fonte de carbono por pelo menos dez dias. Já as cepas mutantes, deficientes em acumular essas reservas, começaram a perder viabilidade logo depois de 24 horas, apresentando menos de 1% de células viáveis em 192 horas.

Nos processos fermentativos, a habilidade em acumular carboidratos de reserva é um importante critério para a seleção de linhagens de leveduras, principalmente por sua relação com a robustez e qualidade celular (FRANÇOIS; PARROU, 2001). E em se tratando de

processos cervejeiros, é muito importante para a manutenção da qualidade e estabilidade da cerveja, assim como para a performance fermentativa, que a levedura esteja metabolicamente ativa, ou seja, com elevada viabilidade (GIBSON et al., 2007). O adequado estado fisiológico da linhagem é determinante para manter as características sensoriais da bebida, e é particularmente importante quando a biomassa é utilizada em fermentações subsequentes (PRATT et al., 2003; BLIECK et al., 2007; STEWART; RUSSEL, 2009).

Durante a prática do reciclo celular, muitas vezes é necessário armazenar as células durante o intervalo entre uma fermentação e outra. O glicogênio é, então, uma importante fonte de energia para a manutenção da levedura nesse período (BRIGGS et al., 2004).

Esse polissacarídeo também é muito importante durante a fase lag da fermentação cervejeira. A degradação do glicogênio nessa fase fornece esqueleto carbônico e energia, com as quais, juntamente com o oxigênio, as células sintetizam componentes como esteróis e ácidos graxos, importantes na composição da membrana plasmática (BRIGGS et al., 2004; RUSSELL, 2006; GIBSON et al., 2007).

A redução da taxa de glicogênio de uma linhagem depende de vários fatores incluindo a especificidade de cada cepa e as condições do processo. Baixos níveis de glicogênio na célula durante a inoculação correlacionam-se com baixa viabilidade celular, maiores tempos de fermentação e aumento nos níveis de diacetil, acetaldeído e dióxido de enxofre produzidos (RUSSELL, 2006).

Em linhagens cervejeiras de *S. cerevisiae*, até 4% dos açúcares do mosto são convertidos em glicogênio durante a fermentação, podendo representar até 20-30% do peso seco da célula (QUAIN; TUBB, 1982 apud BRIGGS et al., 2004).

2.6 Compostos aromáticos em cerveja

A maioria dos compostos aromáticos da cerveja são provenientes do metabolismo da levedura e alguns compostos voláteis originam-se do malte e do lúpulo empregados no processo (BAMFORTH, 2000). Existem mais de 800 compostos que contribuem com o sabor e aroma da cerveja. Muitos deles, embora não sejam componentes chave, se relacionam com a percepção global de ambos (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2015), ao passo que muitas moléculas interagem para o efeito daquilo que é percebido sensorialmente (BAMFORTH, 2000).

Dentre os principais compostos aromáticos que influenciam o sabor e aroma das cervejas destacam-se: os ésteres, os alcoóis superiores, as dicetonas vicinais, os compostos sulfurosos, os fenóis e os aldeídos (STEWART; RUSSELL, 2009).

2.6.1 Ésteres

Os ésteres são compostos muito importantes para a formação de sabor nas cervejas, conferindo um caráter frutado à bebida (PEDDIE, 1990). Os principais ésteres em cervejas e seus respectivos aromas são acetato de etila (solvente), acetato de isoamila (frutado/banana), hexanoato e octanoato de etila (maçã ácida) e acetato de feniletila (floral/rosa/mel) (VERSTREPEN et al., 2003a).

Os ésteres, em geral, apresentam um baixo valor limiar (*threshold level*) de percepção em cervejas, podendo influenciar consideravelmente a qualidade sensorial da bebida, por isso sua concentração deve ser mantida dentro de certos limites (SAERENS et al., 2010). Para cada estilo de cerveja há componentes presentes em maior concentração em relação a outros, de modo que deve haver um balanço entre os compostos aromáticos. Para cervejas *ales* um caráter frutado é desejável, enquanto que para *lagers* normalmente não (PIRES et al., 2014).

Os ésteres são produtos resultantes do metabolismo da levedura *S. cerevisiae* a partir da atuação de enzimas ésteres-sintases (PEDDIE, 1990). As principais delas são as enzimas álcool-acetiltransferases envolvidas em reações de condensação entre um acetil-CoA e um álcool (YOSHIOKA; HASHIMOTO, 1981; SAERENS et al., 2010), afetando a produção dos ésteres de acetato, principalmente acetato de etila e acetato de isoamila (VERSTREPEN et al., 2003b).

Vários fatores podem influenciar a formação dos ésteres durante a fermentação (STEWART; RUSSELL, 2009). A linhagem de levedura empregada tem grande importância, pois cada cepa apresenta uma característica própria de produção de ésteres e determinadas linhagens podem produzir muito mais que outras (PEDDIE et al., 1990; PIRES et al., 2014). Cepas de leveduras *S. cerevisiae* (linhagens *ale*) produzem mais ésteres que cepas de *S. pastorianus* (linhagens *lager*), principalmente acetato de isoamila (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977; YU et al., 2012).

O aumento da temperatura de fermentação favorece a formação de ésteres (LANDAUD et al., 2001), assim como a elevação da densidade do mosto (SAERENS et al., 2008; YU et al., 2012). Uma maior pressão durante a fermentação, exercida pelo dióxido de carbono, reduz a formação de ésteres (RENGER et al., 1992; LANDAUD et al., 2001; SHEN et al., 2004), bem como uma melhor oxigenação do mosto durante a inoculação e a adição de ácidos graxos insaturados minimizam principalmente a produção de ésteres de acetato (FUJII et al., 1997; PIRES et al., 2014).

Todos esses fatores atuam diretamente sobre o metabolismo da levedura, influenciando a atividade das enzimas álcool-acetiltransferases e também a expressão dos

genes que codificam tais enzimas, portanto afetam diretamente a síntese dos ésteres (FUJII et al., 1997; VERSTREPEN et al., 2003b; SAERENS et al., 2008).

2.6.2 Alcoóis superiores

Os alcoóis superiores, também chamados de óleos fuseis, são os compostos organolépticos mais abundantes presentes em cervejas (STEWART; RUSSELL, 2009). Os principais alcoóis superiores responsáveis pelo aroma são: propanol (solvente/doce), isobutanol (solvente), álcool isoamílico (alcoólico/banana), 2-metil-butanol (alcoólico/solvente) e fenil-etanol (floral/rosas) (PIRES et al., 2014).

São formados tanto por anabolismo quanto por catabolismo de aminoácidos (STEWART; RUSSELL, 2009). Na via catabólica, a levedura assimila os aminoácidos presentes no mosto pela rota metabólica de Ehrlich. Nesta rota, ocorre uma transaminação por enzimas aminotransferases na qual ocorre a remoção do grupo amino do aminoácido formando um alfa-cetoácido. Este sofre uma descarboxilação resultando num aldeído, que é posteriormente reduzido a um álcool superior correspondente (DICKINSON et al., 2003; HAZELWOOD et al., 2008; PIRES et al., 2014).

Na via anabólica, os alfa-cetoácidos são formados durante a biossíntese dos aminoácidos na rota de Ehrlich através do metabolismo de carboidratos (EDEN et al., 2001; STEWART; RUSSELL, 2009; PIRES et al., 2014).

Fatores que possam interferir no metabolismo da levedura, especialmente no crescimento, podem afetar diretamente a produção dos alcoóis superiores (STEWART; RUSSELL, 2009). A suplementação com aminoácidos estimula a formação desses componentes, sendo que a adição de valina e leucina aumentam a síntese de isobutanol e álcool isoamílico, respectivamente (PROCOPIO et al., 2015).

A formação dos alcoóis superiores também é influenciada positivamente por uma maior taxa de inoculação (EDELEN et al., 2006; ERTEN et al., 2006), aumentando principalmente a concentração de isobutanol e álcool isoamílico (VERBELEN et al., 2009). O aumento da temperatura de fermentação (LANDAUD et al., 2001; GIBSON et al., 2013), bem como uma maior oxigenação do mosto (VALERO et al., 2002) também favorece a formação de alcoóis superiores. Já a elevação da densidade do mosto reduz a produção desses metabólitos (YU et al., 2012; LEI et al., 2013), assim como o aumento da pressão de CO_2, que interfere no crescimento da levedura (RENGER et al., 1992).

2.6.3 Dicetonas vicinais

As dicetonas vicinais são sub-produtos resultantes do metabolismo da levedura durante a fermentação. Dentre elas, os dois principais compostos que possuem influência no sabor e aroma da cerveja são: o diacetil (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona (WAINWRIGHT, 1973; LODOLO et al., 2008; KROGERUS; GIBSON, 2013a).

Ambos os compostos conferem um sabor e aroma amanteigado à bebida quando em concentrações acima do limiar de percepção, sendo indesejável especialmente em cervejas *lager*, geralmente considerados como defeito sensorial (LINKO et al., 1998; KROGERUS; GIBSON, 2013a). O diacetil é o mais importante, pois seu limiar de percepção é muito baixo (0,1-0,2 mg/L em cervejas *lager*; 0,1-0,4 mg/L em cervejas *ale*) ao passo que o da 2,3-pentanodiona é maior, correspondendo a 0,9-1,0 mg/L (WAINWRIGHT, 1973; KROGERUS; GIBSON, 2013a).

Em leveduras, o diacetil e a 2,3-pentanodiona são formados indiretamente durante a síntese dos aminoácidos valina e isoleucina, respectivamente. Durante a produção desses aminoácidos são formados compostos intermediários como α-acetolactato e α-acetohidroxibutirato, que são, em parte, excretados para o meio e sofrem espontaneamente uma descarboxilação originando o diacetil e a 2,3 pentanodiona, respectivamente (SUOMALAINEN; RONKAINEN, 1968; STEWART; RUSSELL, 2009). O diacetil também pode ser sintetizado por contaminantes do processo como *Lactobacillus* e *Pediococcus* (LODOLO et al., 2008).

Para que a concentração das dicetonas vicinais seja reduzida a níveis adequados, especialmente em cervejas *lager*, o período de maturação da cerveja é muito importante (LU et al., 2012). Ao final da fase fermentativa e durante o processo de maturação, a levedura assimila tanto o diacetil quanto a 2,3-pentanodiona e os reduzem enzimaticamente a 2,3-butanodiol e 2,3-pentanodiol respectivamente, os quais possuem valores de percepção mais elevados, portanto não mais comprometem o sabor e aroma da bebida (BAMFORTH; KANAUCHI, 2004).

Para reduzir a produção do diacetil durante o processo, algumas estratégias têm sido estudadas. Aumentar a concentração de valina na fermentação, bem como modificar o perfil de aminoácidos do mosto (especialmente valina, leucina e isoleucina) tem mostrado correspondência com redução dos níveis de diacetil produzidos pela levedura (PETERSEN et al., 2004; KROGERUS; GIBSON, 2013b). Modificações genéticas nas leveduras cervejeiras também têm sido aplicadas no que tange a rota metabólica de síntese da valina, à qual está atrelada a produção do diacetil, visando reduzir a formação desse composto (YAMANO et al.,

1995; WANG et al., 2008; STEWART; RUSSELL, 2009; KROGERUS; GIBSON, 2013a). Também a tecnologia de células imobilizadas tem mostrado capacidade de reduzir os níveis de diacetil produzido pela levedura (STEWART; RUSSELL, 2009; KROGERUS; GIBSON, 2013a).

2.6.4 Compostos sulfurosos

Os compostos sulfurosos podem ser resultantes do malte, do lúpulo, da levedura e do processo em si (mosturação, fervura, armazenamento e envelhecimento) (LANDAUD et al., 2008). Dentro de certos limites de concentração podem ser desejáveis em alguns estilos de cervejas, no entanto em excesso podem ocasionar odores desagradáveis (STEWART; RUSSELL, 2009).

Dentre eles, o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o dióxido de enxofre (SO_2) resultam da atividade da levedura durante a fermentação, originando-se como subprodutos da síntese dos aminoácidos sulfurosos cisteína e metionina a partir da redução do sulfato e sulfito (STEWART; RUSSELL, 2009).

O H_2S é o mais preocupante, pois possui um baixo limiar de percepção ficando em torno de 5-10 µg/L. Pode ocorrer em cervejas *lager* em concentrações de até 20 µg/L, no entanto valores acima disso podem levar a odores de ovo podre na bebida (MOLL, 1991 apud LANDAUD et al., 2008).

O SO_2, em contrapartida, possui maior limiar de percepção (25 mg/L) (MOLL, 1991 apud LANDAUD et al., 2008) e atua como agente antioxidante na cerveja, retardando o processo de turbidez oxidativa e a formação de odores rançosos na bebida, promovendo maior estabilidade de sabor (YOSHIDA et al., 2008; STEWART; RUSSELL, 2009). Por isso há trabalhos direcionados à obtenção de leveduras com maior produção de SO_2 e menor síntese de H_2S, já que a produção de ambos está interligada na mesma rota metabólica (YOSHIDA et al., 2008; CHEN et al., 2012). Contudo, o SO2 em concentrações elevadas na cerveja pode ocasionar odores semelhantes a fósforo queimado (MOLL, 1991 apud LANDAUD et al., 2008).

Tanto a produção do H_2S quanto do SO_2 varia fortemente conforme a linhagem de levedura empregada na fermentação. O aparato metabólico de cada linhagem influencia altamente a quantidade produzida em resposta ao meio em que se encontram (UGLIANO et al., 2011). No entanto, em geral, cepas *lager* produzem maiores quantidades de H_2S que cepas *ale* (WALKER; SIMPSON, 1993).

Outras variáveis do processo podem influenciar a síntese desses metabólitos como a composição do mosto (aminoácidos) e as condições da fermentação (aeração), ou seja, condições que limitam o crescimento da levedura (STEWART; RUSSELL, 2009). Geralmente quando a levedura se encontra em condições pobres, comprometendo uma fermentação vigorosa que expurgaria o H_2S, maiores concentrações desse composto são encontradas na cerveja. O H_2S também pode ser produto de autólise das leveduras (BAMFORTH, 2000).

Também com importância no sabor da cerveja encontra-se o dimetil-sulfeto (DMS). Tal composto confere sabor de vegetal cozido (particularmente milho cozido) na bebida e é oriundo de compostos intermediários presentes no malte empregado no processo. A fervura vigorosa do mosto reduz a quantidade de DMS presente devido sua alta volatilidade, também durante a fermentação boa parte desse composto é expulsa do meio juntamente com o CO_2 produzido (BAMFORTH, 2000).

2.6.5 Aldeídos

Dentre os aldeídos, o de maior importância em cervejas é o acetaldeído. Ele possui limiar de percepção em torno de 5 a 50 mg/L (BAMFORTH, 2000), e sua presença acima disso confere aromas semelhantes à maçã verde ou grama recém cortada à cerveja.

O acetaldeído é um composto intermediário na formação do etanol, sendo produzido a partir da decarboxilação do piruvato pela levedura (STEWART; RUSSELL, 2009). Sua produção aumenta principalmente nos estágios iniciais e intermediários da fermentação, reduzindo-se no final da mesma e durante a maturação pela ação das leveduras (WILLAERT, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Assim como os ésteres e alcoóis superiores, a produção e acúmulo de acetaldeído na cerveja são influenciados pela cepa de levedura e condições da fermentação (STEWART; RUSSELL, 2009). Algumas leveduras mutantes com menor produção de acetaldeído têm sido obtidas por técnicas de melhoramento genético tradicional (WANG et al., 2013; SHEN et al., 2014).

A alta oxigenação do mosto, maiores temperaturas e inóculos favorecem a produção de acetaldeído (BRIGGS et al., 2004; RUSSELL, 2006). Quando altas concentrações desse composto são persistentes na cerveja, mesmo durante a maturação, isso pode ser resultante de baixa viabilidade celular, separação precoce da levedura em contato com a cerveja ou infecção por bactérias *Zymomonas* (BAMFORTH, 2000; RUSSELL, 2006).

Os aldeídos também estão relacionados com o envelhecimento da cerveja, sendo sintetizados a partir de reações químicas que resultam em características indesejáveis à bebida, como sabor oxidado e de papelão (WILLAERT, 2006; VANDERHAEGEN et al., 2006).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fisiológico e tecnológico de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de destilarias brasileiras de bioetanol, para a fermentação cervejeira com mosto de alta densidade visando à produção de cerveja especial do estilo *ale*.

3.2 Objetivos específicos

1) Selecionar linhagens com atributos fisiológicos relevantes ao processo cervejeiro e em particular com características de tolerância à fermentação com mosto de alta densidade, bem como em condições de reciclo celular como praticado nos processos cervejeiros.

2) Avaliar as características sensoriais e físico-químicas das cervejas especiais elaboradas com mosto de alta densidade com as linhagens selecionadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de leveduras

Neste estudo, foram analisadas 24 cepas de leveduras (Tabela 1) pertencentes à coleção do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras (Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP – Piracicaba, Brasil). Estas linhagens foram isoladas de destilarias brasileiras de produção de bioetanol, identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* por cariotipagem como descrito por Basso et al. (2008). As vinte e quatro linhagens já foram avaliadas em um estudo prévio (FURLAN, 2012), mostrando habilidade em tolerar fermentação com alto teor alcoólico para a produção de bioetanol, por isso a escolha das mesmas para o estudo. Três diferentes linhagens cervejeiras comerciais (Fermentis, Lesaffre, França) foram incluídas como controle, sendo duas *ale* (S-04 e S-33) e uma *lager* (W-34/70).

Tabela 1 - Linhagens utilizadas no trabalho

(continua)

Linhagem	Espécie	Origem
Safale-S-04	*S. cerevisiae*	Cepa comercial (Fermentis®)
Safbrew-S-33	*S. cerevisiae*	Cepa comercial (Fermentis®)
Saflager-W-34/70	*S. pastorianus*	Cepa comercial (Fermentis®)
PE-2	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
SA-1	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
CAT-1	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL419	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL210	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL207	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL228	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL150	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL361	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL390	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL291	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL292	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL438	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL165	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL295	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL

Tabela 1 - Linhagens utilizadas no trabalho

(conclusão)

Linhagem	Espécie	Origem
LBTL232	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL179	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL521	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL355	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL490	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL190	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL055	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL138	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL
LBTL139	*S. cerevisiae*	Coleção LBTL

4.2 Reativação e preservação das linhagens

As linhagens da coleção, armazenadas em glicerol em ultra-freezer, foram reativadas em tubos com tampa de rosca contendo 5 mL de meio YPD (1% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) peptona [HIMEDIA, Munbai, Índia], 2% (m/v) glicose [CHEMCO, Hortolândia, Brasil]) esterilizados. Para isso, foram transferidos 100 µL da cultura homogeneizada para os tubos, seguido de incubação a 30ºC por 48 horas antes de iniciar os ensaios.

As linhagens cervejeiras comerciais adquiridas na forma liofilizada foram reativadas em YPD e após crescimento 100 uL da cultura foram transferidos para tubos contendo 5 mL do mesmo meio, seguido de incubação.

A preservação das linhagens foi realizada em tubos eppendorf contendo 500 µL da cultura reativada e 500 µL de glicerol 30% (m/v) [CHEMCO], homogeneizados e armazenados em ultra-freezer a -80ºC.

4.3 Avaliação do crescimento em meio sintético de maltose

As linhagens foram avaliadas quanto ao crescimento em meio contendo somente maltose como fonte de carbono. Para isso, utilizou-se meio YPM (1% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) peptona, 2% maltose (m/v) [SIGMA, St. Louis, USA]).

A avaliação foi realizada em microplacas transparentes de fundo chato com 96 poços, em cada qual foi adicionado 90 µL de meio. Cada poço foi inoculado com 10 µL da cultura homogeneizada e diluída para que a densidade óptica inicial (DO_{600nm}) estivesse entre 0,01-0,02. Para o branco utilizou-se 90 µL de meio e 10 µL de água Milli-Q estéril. Cada linhagem

foi inoculada em triplicata. A placa, após inoculação, foi selada com filme adesivo ultra-transparente (PlateMax, UC-500 - Axygen Scientific), e incubada em leitor multifuncional de microplacas (Tecan, Infinite M200 – Rchisto) durante 30 horas. O crescimento foi avaliado por leitura da DO a 600 nm em intervalos de 2 horas precedidas de agitações lineares por cinco minutos. Todas essas condições foram realizadas automaticamente pelo leitor de placas. A avaliação do crescimento foi realizada na temperatura de 30 e 24ºC.

Para cada linhagem foi determinada a velocidade específica máxima de crescimento (u_{max} (h^{-1})) e o crescimento máximo (DO_{max}).

4.4 Preparo do mosto cervejeiro de alta densidade

O mosto de alta densidade foi elaborado unicamente com malte base de cevada do tipo Pilsen (AGRARIA, Brasil), lúpulo Hallertauer Perle (classificação: aromático/amargor, pellets com 8,3% α-ácidos, HVG, Alemanha) e água filtrada (sistema de filtros de carvão ativo).

Inicialmente, o malte de cevada foi triturado em moedor de rolos de forma a fragmentar a casca e expor o amido dos grãos. O preparo do mosto foi realizado a partir de mosturação por infusão simples do malte triturado em água a 64ºC durante 50 min, na proporção de 1 kg de malte para 3 L de água. Essa etapa foi realizada em panela de alumínio adaptada com filtro Bazooka e torneira, denominada de panela de mosturação. Ao final desse período, foi realizado o teste de hidrólise do amido do mosto com solução de iodo. A ausência de coloração roxo-azulada indicou a completa hidrólise do amido. O mosto foi aquecido até 76ºC e mantido em repouso por 10 min para inativação enzimática.

A filtração do mosto ocorreu também na panela de mosturação, sendo o mesmo recolhido a partir da torneira acoplada à base da panela. As cascas de malte (bagaço) acumuladas no interior da panela atuaram como uma camada filtrante. Após a filtração, essa camada de bagaço foi lavada com água aquecida a 76ºC (0,8 L/L de água utilizada na mostura) com a finalidade de aumentar o rendimento em extrato, uma vez que parte dos açúcares ainda permanece retida no bagaço.

O mosto filtrado foi transferido para a panela de fervura, à qual também estava acoplada uma torneira na base. O mosto foi submetido à fervura por 40 min e a adição do lúpulo (1,36 g/L mosto) ocorreu no início da mesma. Realizou-se o *whirlpool* ou turbilhonamento, que consiste na rotação vigorosa do mosto para que ocorra o choque de partículas como proteínas e polifenóis, seguido de repouso por 20-30 min para a decantação do material particulado no fundo da panela (“trub quente”), e posterior separação do mosto.

O mosto foi resfriado por meio de trocador de calor de placas, coletado em frascos estéreis e imediatamente armazenado a -20ºC até o uso.

As principais propriedades analíticas do mosto foram determinadas: concentração de extrato original (densidade relativa), pH e nitrogênio amínico livre (FAN).

4.5 Avaliação do crescimento em mosto cervejeiro de alta densidade

A avaliação do crescimento foi realizada em microplacas conforme descrito no item 4.3, com mosto cervejeiro de alta densidade (item 4.4). O crescimento foi determinado por absorbância (DO_{600nm}), medida em intervalos de 2 horas durante 40 horas em ambas temperaturas, 24 e 30ºC. O crescimento máximo (DO_{max}) e a velocidade específica máxima de crescimento (u_{max} (h^{-1})) foram determinados.

4.6 Fermentação em mosto cervejeiro de alta densidade

O ensaio de fermentação foi realizado em duplicata em tubos Falcon de fundo cônico estéreis, contendo 25 mL de mosto cervejeiro de alta densidade. Cada tubo com mosto foi inoculado na razão de 3 x 10^6 células/mL e a fermentação foi realizada na temperatura de 24ºC sem agitação.

Previamente à inoculação, estimou-se a concentração de células viáveis da suspensão de cada linhagem recém reativada, e determinou-se o volume de suspensão necessário para que cada cepa fosse inoculada na razão do mesmo número de células. Como o volume de suspensão foi variável para cada linhagem, os mesmos foram centrifugados (5000 rpm, 6 min – Centrífuga BECKMAN, CS-15), o sobrenadante descartado, e as células ressuspendidas em 500 µL de água milli-Q estéril e inoculadas no mosto.

A velocidade de fermentação foi monitorada pela perda de massa do sistema (tubo + mosto + inóculo) devido à liberação de CO_2 ao longo da fermentação. Partindo-se da pesagem do sistema no início da fermentação, seguindo-se de pesagens em vários intervalos de tempo até que a perda de peso se torne constante, é possível traçar a curva de liberação de CO_2 para estimar a velocidade de fermentação das linhagens (SILVA et al., 2006; SANCHEZ et al., 2012).

Após a fermentação, a viabilidade celular das linhagens foi determinada por coloração diferencial com eritrosina. Os tubos foram centrifugados (4000 rpm, 15 min – Sorvall, RT 6000D), separando a biomassa, e no sobrenadante (cerveja) foram analisados o teor de etanol, a densidade relativa e o pH. Também foi determinada a fermentabilidade de cada linhagem (item 4.13.3).

4.7 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio

A produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) foi estimada de acordo com Ono et al. (1991). Um volume de suspensão referente a uma gota (10 µL) da cultura reativada de cada linhagem foram transferidos, em triplicata, para placas de Petri contendo meio ágar LA (0,3% (m/v) peptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 4% (m/v) glicose, 0,02% (m/v) sulfato de amônio [NUCLEAR, Diadema, Brasil], 0,1% (m/v) acetato de chumbo neutro [J.T.BAKER, São Paulo, Brasil] e 2% (m/v) ágar [HIMEDIA, Mumbai, Índia]), e incubadas a 30ºC por 10 dias. O aparecimento de colônias de coloração marrom escuro indica alta produção de H_2S.

4.8 Avaliação da produção de espuma durante a fermentação

A produção de espuma durante a fermentação foi determinada conforme descrito por Regodón et al. (1997), com pequenas modificações. As leveduras reativadas foram inoculadas na razão de 3 x 10^6 células/mL em tubos (16 mm diâmetro x 150 mm altura) contendo 10 mL de mosto cervejeiro de alta densidade, incubados na temperatura de 24ºC sem agitação. A altura da espuma (mm) foi aferida ao longo da fermentação, permitindo verificar a máxima altura alcançada.

4.9 Avaliação quantitativa da capacidade de floculação

A capacidade de floculação das leveduras foi avaliada, em triplicata, pelo teste de Helm modificado com algumas adaptações sugeridas por D'Hautcourt e Smart (1999). As linhagens foram inoculadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo meio YPD, incubados à temperatura de 25ºC sob agitação de 120 rpm (Shaker Superohm – G-25) durante 72 horas. Após crescimento, a suspensão celular foi ajustada para uma concentração de 10^8 células/mL em água deionizada. Uma sequência de lavagens, precedidas de centrifugação da biomassa (2000 rpm, 5 min), foi realizada: uma lavagem com água deionizada, duas lavagens com solução de EDTA (0,5 M, pH 7,0 [NUCLEAR, Diadema, Brasil]), uma lavagem com solução de sulfato de cálcio (0,5 g/L [J.T. BAKER, São Paulo, Brasil]), e finalmente em solução de suspensão (0,5 g/L sulfato de cálcio; 6,8 g/L acetato de sódio [F.MAIA, São Paulo, Brasil]; 4,5 g/L ácido acético glacial [F.MAIA]; 4% (v/v) etanol [CHEMCO]; pH 4,5). Como controle, as suspensões de cada cepa também foram ressuspendidas em solução de EDTA (0,5 M, pH 7,0). As suspensões foram agitadas vigorosamente em vórtex e deixadas em repouso por 15 minutos para sedimentação celular. Alíquotas de 100 uL foram retiradas, logo abaixo do menisco, e diluídas 10 vezes em água deionizada para leitura de absorbância (DO_{600nm}) em

espectrofotômetro (Micronal – B380). O percentual de floculação foi determinado segundo a eq. (1).

$$\text{Floculação (\%)} = \left(\frac{\text{DO controle-DO experimental}}{\text{DO controle}}\right) \times 100 \qquad (1)$$

4.10 Avaliação da tolerância ao etanol

As leveduras foram avaliadas quanto à tolerância ao etanol mediante crescimento em microplacas (item 4.3) contendo meio YPD com etanol [CHEMCO, Hortolândia, Brasil] nas concentrações de 5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5% e 15,0% (v/v). Cada linhagem foi inoculada em quatro poços em cada tratamento. As microplacas foram incubadas a 30ºC por 48 h, exceto para o último tratamento que foi por 62 h.

4.11 Fermentação com reciclo celular em mosto cervejeiro de alta densidade

O experimento foi realizado em triplicata em tubos Falcon de fundo cônico estéreis de 50 mL contendo 25 mL de mosto de alta densidade.

Os tubos com mosto foram inoculados a uma taxa de 3 x 10^6 células/mL, incubados a temperatura de 24ºC sem agitação por 72 horas, e armazenados overnight a 4ºC, buscando simular a redução da temperatura do tanque industrial após a fermentação para decantar as células e facilitar a coleta para inoculação em um novo mosto (reciclo).

As células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm, 15 mim), pesadas e analisadas quanto a concentração e viabilidade celular, e utilizadas para inocular a fermentação subsequente, compreendendo um total de cinco ciclos fermentativos, mantendo as mesmas condições (mosto, taxa de inoculação, temperatura, tempo) em todos. No último ciclo, a exceção, o mosto foi clarificado mediante centrifugação (6000 rpm, 20 min), com o propósito de causar um estresse adicional às leveduras ((SIEBERT et al., 1986; KÜHBECK et al., 2006).

Em todos os ciclos foram analisados nos sobrenadantes o teor alcoólico, a densidade relativa e o pH. E no último reciclo foram estimados os teores celulares de trealose e glicogênio, e a formação de células *petite* na população de leveduras.

4.12 Elaboração das cervejas especiais com mosto de alta densidade

4.12.1 Propagação das linhagens

As linhagens reativadas em YPD foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de propagação (6% (m/v) extrato de malte [HIMEDIA, Mumbai, Índia], 1% peptona (m/v), 1% extrato de levedura (m/v)), incubados a 25ºC em agitação (110 rpm) overnight. Posteriormente, foram transferidos para Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL do mesmo meio, incubados nas mesmas condições.

As células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e preparada uma suspensão com água esterilizada na concentração de 2 x 10^9 cel/mL.

4.12.2 Fermentação do mosto de alta densidade

Para a fermentação do mosto, foram utilizados baldes fermentadores (capacidade de 10 L) estéreis de polipropileno atóxico, próprio para uso alimentício, adaptados com torneira em sua base e um orifício na tampa para liberação de gás carbônico. A este orifício foi acoplada uma mangueira de silicone atóxico, com saída para um recipiente contendo etanol 70% para evitar contaminação pelo ar exterior (Figura 2). Em cada balde foram transferidos cerca de 6,5 L de mosto e inoculados com levedura a uma taxa de 3 x 10^6 cel/mL, incubados a temperatura de 24ºC.

Figura 2 – Balde fermentador

4.12.3 Maturação da cerveja

Após a fermentação, os baldes contendo a cerveja “verde” ou imatura foram transferidos para câmara fria na temperatura de 4ºC, permanecendo por 12 dias em repouso para maturação.

4.12.4 Envase da cerveja

Para o envase da cerveja, foram utilizadas garrafas de cor âmbar com capacidade de 600 mL esterilizadas. A carbonatação da cerveja foi realizada mediante refermentação em garrafa com a mesma cepa utilizada na fermentação.

Para isso, antes do envase, foram adicionados em cada garrafa 4 g de açúcar cristal e um volume de suspensão de levedura recém reativada na proporção de 10^5 cel/mL de cerveja. Em seguida, a cerveja contida no balde fermentador foi envasada com o auxílio de um enchedor com válvula (*bottle filler*), acoplado à saída da torneira. O enchedor, ao pressionar o fundo da garrafa libera a cerveja e a preenche até volume desejado. Para tapar as garrafas foram utilizadas tampinhas do tipo *pry off* cravadas com um arrolhador manual. Para a refermentação, as garrafas foram armazenadas a temperatura ambiente, por no mínimo 15 dias.

As cervejas obtidas com cada linhagem de levedura foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: teor alcoólico, densidade relativa, pH, acidez total, cor, turbidez, compostos aromáticos e análise sensorial.

4.13 Análises

4.13.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada mediante análise em microscópio óptico por coloração diferencial das células com solução de corante eritrosina [MERCK, Darmstadt, Alemanha] em tampão fosfato (fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4) – SYNTH, Diadema, Brasil). As células foram contadas em câmara de Neubauer, tomando como referência que células vivas não se coram e células mortas se coram de rosa (OLIVEIRA et al., 1996). A viabilidade foi expressa em porcentagem em razão do número de células vivas pelo número total de células (vivas e mortas).

4.13.2 Teor de etanol

O teor de etanol foi determinado mediante destilação por arraste de vapor em microdestilador Kjeldahl (Tecnal – TE-012), seguida de posterior leitura do condensado recolhido em densímetro digital (Anton Paar – DMA48, Áustria) (ZAGO et al., 1996).

4.13.3 Determinação da densidade relativa

A análise de densidade relativa do mosto e dos fermentados (previamente clarificados por centrifugação a 4000 rpm, 15 min) foi realizada por densimetria em densímetro digital (Anton Paar – DMA 48, Áustria).

A relação entre a densidade de uma substância e a densidade da água, na mesma temperatura, é conhecida como gravidade específica ou densidade relativa. A gravidade específica do mosto, referida como gravidade original (GO), se refere à quantidade de sólidos dissolvidos que ele possui e também pode ser expressa em termos de extrato, em graus Platô (°P) – uma solução contendo x °P tem a mesma gravidade específica que uma solução contendo x gramas de sacarose em 100 gramas de solução (MANNING, 1993; ENSMINGER, 2006).

Nos fermentados (cerveja), a gravidade específica é referida como gravidade final aparente (GF), porque não se considera o efeito do etanol, que é menos denso.

Os dados referentes à gravidade específica do mosto e dos fermentados foram expressos em termos de extrato (°P) – extrato original e extrato aparente, respectivamente. Para converter gravidade específica (GS) em extrato (°P) utilizou-se a eq. (2) (ANALYTICA – EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2000).

$$°P = -460{,}234 + (662{,}649 \times GS) - (202{,}414 \times GS^2) \qquad (2)$$

A proporção de sólidos dissolvidos do mosto que foi consumida pela levedura durante a fermentação é denominada de fermentabilidade ou atenuação aparente (BRIGGS et al., 2004; HUUSKONEN et al., 2010), sendo calculada em função da gravidade original (extrato original) do mosto e da gravidade final aparente (extrato aparente), segundo a eq. (3).

$$\text{Fermentabilidade ou atenuação aparente } (\%) = \left(\frac{GO\ (°P) - GF\ (°P)}{GO\ (°P)}\right) \times 100 \qquad (3)$$

4.13.4 Determinação do pH

O pH foi determinado em potenciômetro digital (Marconi – PA-200), após agitação vigorosa das amostras até eliminação do CO_2.

4.13.5 Extração e quantificação de trealose

A trealose foi extraída pelo método de extração seletiva com ácido tricloroacético a 0ºC (TREVELYAN; HARRISON, 1956). Para a extração, amostras contendo 200 mg de biomassa úmida coletada por centrifugação em tubo de fundo cônico foram lavadas com água destilada gelada e novamente precipitadas (3500 rpm, durante 6 min). Em cada tubo foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético 0,5 M [SYNTH, Diadema, Brasil], em banho de gelo, durante 20 minutos com agitações casuais. Após isso, os tubos foram centrifugados nas mesmas condições descritas e o extrato sobrenadante foi armazenado em tubos eppendorf a -20ºC até o momento da análise. A quantificação foi realizada por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC) em cromatógrafo de troca iônica (Dionex - DX-300) equipado com coluna CarboPac PA-1 4 x 250 mm e detector de amperometria de pulso, usando NaOH 100 mM como fase móvel a um fluxo de 0,9 mL/min (BASSO et al., 2008).

4.13.6 Extração e quantificação de glicogênio

O glicogênio foi analisado conforme o método de Becker (1978) com modificações de Rocha-Leão et al. (1984). Para a extração, 200 mg de biomassa úmida foram coletadas em tubo de ensaio com tampa de rosca e lavadas com 5 mL de água destilada gelada, seguida de agitação em vórtex e centrifugação (3500 rpm, por 6 min) com posterior descarte do sobrenadante. Nos tubos contendo a biomassa precipitada foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 0,25 M recém preparado, e os tubos foram armazenados em freezer a -20ºC até análise. A quantificação foi realizada por hidrólise enzimática com amiloglicosidase [SIGMA, St. Louis, USA] e dosagem colorimétrica da glicose liberada após reação com glicose-oxidase e peroxidase [Kit Glicose WS - KOVALENT, São Gonçalo, Brasil], e as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro (Micronal – B380) a 500 ηm.

4.13.7 Estimativa de células *petite*

Para estimativa da formação de células *petite* na população de cada levedura utilizou-se a metodologia modificada (NAGAI, 1959; NAGAI; YANAGISHIMA; NAGAI, 1961) que emprega cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) como indicador de cor. Colônias normais se coram de vermelho e colônias *petite* permanecem brancas (não se coram). Para a determinação, inicialmente realizou-se o plaqueamento por superfície em meio YPD acrescido de 2% (m/v) ágar, seguido de incubação a 30ºC por 48 horas. Sobre as colônias crescidas na placa verteu-se cuidadosamente um meio composto de 0,5% glicose, 0,05% TTC

[SIGMA, St. Louis, USA] e 0,75% ágar. As placas foram incubadas a 30ºC por duas horas, seguida de análise da coloração das colônias.

4.13.8 Análise de nitrogênio amínico livre (FAN) no mosto

A concentração de nitrogênio amínico livre (FAN) foi determinada pelo método da ninidrina, usando glicina como padrão (LIE, 1973), com algumas adaptações. Em tubos com tampa de rosca foram transferidos 0,5 mL das amostras apropriadamente diluídas e 0,25 mL de reagente de cor (100 g/L $Na_2HPO_4.12H_2O$, 60 g/L KH_2PO_4, 5 g/L ninidrina, 3 g frutose, pH 6,6-6,8), aquecidos por 16 min em banho de água fervente, seguidos de resfriamento em banho a 20ºC e diluídos com 1 mL de solução de diluição (2 g KIO_3 em 600 mL de água destilada e 400 mL de etanol 96%). Os tubos foram agitados vigorosamente e realizada a leitura de absorbância a 570 ηm (Micronal – B380). Também foi realizada leitura da prova em branco composto por água. A concentração de FAN foi calculada mediante equação da reta, segundo uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicina (107,2 mg em 100 mL de água destilada) diluída 100 vezes (Anexo A).

4.13.9 Análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa

As amostras de cerveja foram submetidas à análise de concentração de acetaldeído, acetato de etila, metanol, alcoóis superiores (propanol, isobutanol, n-butanol, sec-butanol, isoamílico) e ácido acético, mediante técnica de cromatografia gasosa (BRASIL, 2005) em cromatógrafo Shimadzu modelo QP-2010 PLUS, com detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi N_2, com fluxo de 1,2 mL/min. A temperatura do injetor foi de 220ºC e a temperatura da coluna foi programada para 35ºC por 5 min, aumento até 220ºC a uma taxa de 4ºC/min, com retenção de 10 min a 220ºC. A temperatura do detector foi de 220ºC. Com injeção de 1,0 µL de amostra.

4.13.10 Análise de turbidez

Para a análise de turbidez, as amostras de cerveja foram previamente desgaseificadas e realizada a leitura de turbidez em turbidímetro portátil digital (Hach – modelo 2100P), expressa em NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

4.13.11 Análise de cor

Para a determinação da cor, as amostras de cerveja foram filtradas, em filtro de membrana de 0,45 µm, e realizada a leitura de absorbância a 430 ηm em espectrofotômetro

(Micronal – B380), segundo a metodologia 8.5 (ANALYTICA – EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2000). Para o cálculo da cor das amostras, expressa em unidades EBC (European Brewery Convention), foi utilizada a eq. (4).

$$\text{Cor (EBC)} = A \times f \times 25 \tag{4}$$

Onde:

A = leitura de absorbância;

f = fator de diluição.

4.13.12 Análise de acidez total

A acidez total das amostras de cerveja foi determinada por titulometria de neutralização com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 N. Em erlenmeyer de 125 mL foram transferidos 10 mL de amostra de cerveja (previamente descarbonatada e clarificada), 40 mL de água destilada e 4 gotas de solução indicadora de fenolftaleína 0,5% (m/v) (0,5 g fenolftaleína, 60 mL álcool etílico absoluto, 40 mL água destilada), tituladas com a solução de hidróxido de sódio até mudança de coloração. A acidez total, expressa em gramas de ácido sulfúrico por litro de amostra, foi calculada segundo a eq. (5).

$$\text{Acidez Total} \left(g\ H_2SO_4 \times L^{-1} \right) = \frac{Vg \times F \times N \times 49}{v} \tag{5}$$

Onde:

Vg = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL)

F = Fator de correção da solução padronizada de NaOH

N = normalidade da solução de NaOH

49 = equivalente do H_2SO_4

v = volume de amostra (mL)

4.13.13 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com a norma de padrão internacional ISO 11035 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO, 1994). Essa metodologia baseia-se no levantamento e seleção de descritores (elementos de percepção) para elaboração do perfil sensorial de um produto.

Os atributos sensoriais dos produtos são obtidos do ponto de vista qualitativo, a partir de descritores de todas as percepções que diferenciam um produto de outro, e quantitativo, a partir da avaliação da intensidade de cada descritor.

A análise sensorial das cervejas foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP. As amostras de cerveja foram servidas individualmente a temperatura de 7ºC em taças de degustação padrão ISO a um comitê composto de oito degustadores experientes conforme a norma ISO 11035, seguindo os seguintes procedimentos (PORTUGAL; PALACIOS, 2012):

1) Busca e seleção de descritores: três amostras representativas do conjunto de produtos foram oferecidas aos degustadores e realizado um levantamento de termos descritivos (visuais, olfativos e gustativos) utilizando um formulário, buscando conceber o máximo de termos que descrevessem todas as sensações percebidas. Termos genéricos, redundantes e hedônicos foram eliminados e termos semelhantes foram agrupados de forma consensual, até que todos fossem facilmente compreensíveis aos degustadores. Elaborou-se uma ficha de degustação (Anexo B) contendo os termos descritivos como resultado do processo para avaliação total das amostras e para cada produto foi estimada a intensidade dos descritores em uma escala de 0 (ausência de percepção) a 5 (intensidade muito alta).

2) Análise dos dados: para cada descritor foi calculada a média aritmética e realizada análise de componentes principais (ACP) para a fase visual, olfativa e gustativa.

4.13.14 Análises estatísticas

Os resultados obtidos em cada experimento para as diferentes linhagens foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), pelo software ESTAT (Sistema para análise de estatística versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas – UNESP, Jaboticabal, 1992).

Para a análise de componentes principais (ACP) referente ao experimento de fermentação com reciclo foi utilizado o software CANOCO (versão 4.5, Ithaca, NY, 2002).

A análise dos dados referentes à sensorial foi realizada com o software STATIGRAPHICS CENTURION XVI (versão 16.1.02, StatPoint Technologies, Inc.) por meio de análise (multivariada) de componentes principais, com técnica de exclusão de “listwise” e extração por valor próprio ou autovalor mínimo (= 1,0).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de destilarias de bioetanol foram avaliadas fisiológica e tecnologicamente para o processo cervejeiro com mosto de alta densidade (*high-gravity (HG) brewing*). Com essa avaliação, buscou-se selecionar cepas com atributos fisiológicos relevantes ao processo cervejeiro e com perfil de tolerância às condições impostas na fermentação HG, inclusive com reciclo celular, bem como para a elaboração de cervejas especiais do estilo *ale*. Tais linhagens, já avaliadas em um trabalho prévio (FURLAN, 2012), haviam exibido capacidade de superarem os estresses de fermentações com alto teor alcoólico para a produção de bioetanol. Isso sugere que alguns desses isolados poderiam apresentar potencial para utilização no processo cervejeiro HG, uma vez que este necessita de cepas tolerantes para que o desempenho fermentativo não comprometa a qualidade do produto final, principalmente quando é realizado o reciclo celular.

Para isso, inicialmente, realizaram-se avaliações fisiológicas dessas linhagens, tomando como controle cepas cervejeiras comerciais. A estratégia de avaliação e seleção baseou-se em quatro etapas eliminatórias: i) crescimento em meio contendo somente maltose como fonte de carbono e em mosto cervejeiro de alta densidade (HG); ii) fermentação em mosto HG; iii) outras características fisiológicas de interesse para o processo cervejeiro; iv) fermentação com reciclo celular em mosto HG.

Para a avaliação tecnológica, as cepas selecionadas foram utilizadas para a produção das cervejas, sendo estas analisadas físico-química e sensorialmente.

5.1 Mosto cervejeiro de alta densidade: elaboração e composição

Existe uma variedade de tipos de malte empregados nos processos cervejeiros. Cada tipo tem suas especificações e influencia parâmetros como o sabor, aroma e cor dos diversos estilos de cerveja. Os maltes de base, como o Pilsen, são aqueles usados em maior proporção no preparo do mosto e contribuem especialmente quanto à concentração de açúcares e poder enzimático. Os maltes especiais são utilizados em menor proporção e contribuem com propriedades diferenciadas de sabor, cor, aroma e espuma (PAPAZIAN, 2006).

O lúpulo é um importante ingrediente no preparo das cervejas. Sua principal contribuição é o sabor amargo que ele confere à bebida. Para conferir amargor, o lúpulo precisa ser adicionado no início da fervura do mosto para que os alfa-ácidos, que são insolúveis, sejam isomerizados em iso-alfa-ácidos que são solúveis e amargos. Os lúpulos também possuem uma série de óleos essenciais que contribuem com o aroma da cerveja.

Esses componentes são muito voláteis e para isso precisam ser adicionados ao final da fervura do mosto (DE KEUKELEIRE, 2000).

Para este trabalho, o mosto cervejeiro foi elaborado inteiramente com malte base de cevada do tipo Pilsen e a lupulagem foi realizada no início da fervura. Uma das razões para tanto foi para obter um mosto relativamente neutro em termos de contribuições de sabor e principalmente de aromas que seriam oriundos do malte e do lúpulo, a fim de poder salientar e tornar mais facilmente perceptível sensorialmente as características que cada levedura agregaria à cerveja, evitando que se mascarassem importantes contribuições possíveis de percepções de sabor e aroma responsáveis pelas cepas empregadas na fermentação.

Nos processos de fermentação cervejeira HG utilizam-se mostos com concentração de extrato que varia entre 16 até 18ºP, enquanto que nos processos tradicionais emprega-se mosto com extrato ao redor de 10 a 12ºP (BRIGGS et al., 2004; STEWART; RUSSELL, 2009). No processo de alta densidade, a levedura é exposta a uma fermentação mais estressante devido ao maior teor de açúcares no início e maior teor alcoólico ao final, comparando-se ao processo tradicional (GIBSON et al., 2007). A proposta do presente trabalho foi avaliar leveduras isoladas de destilarias de bioetanol em fermentação cervejeira com mosto de alta densidade. Para esse propósito elaborou-se um mosto com concentração de extrato dentro da faixa do processo HG. A caracterização do mosto elaborado para a execução do trabalho encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização do mosto cervejeiro de alta densidade

Concentração de extrato original	16,3 ± 0,1 ºP
pH	5,56 ± 0,07
FAN (nitrogênio amínico livre)	282,58 ± 18,47 mg/L

5.2 Crescimento em meio com maltose como fonte de carbono e em mosto cervejeiro HG

A maltose é o açúcar fermentescível encontrado em maior quantidade no mosto cervejeiro, representando 45-65% dos açúcares fermentescíveis presentes (BOULTON; QUAIN, 2001; SAERENS et al., 2010). É fundamental que a levedura consiga utilizar eficientemente esse açúcar, pois o rendimento e o desempenho da fermentação cervejeira irão depender, em grande parte, da metabolização desse carboidrato (LODOLO et al., 2008).

As linhagens de bioetanol bem como as cepas cervejeiras controles foram avaliadas quanto ao crescimento primeiramente em meio com maltose como única fonte de carbono a

30ºC, e posteriormente a 24ºC (Tabela 3), sendo esta última a temperatura utilizada nas fermentações dos experimentos seguintes.

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento estimado por densidade óptica máxima (DO_{600nm}) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} (h^{-1})) das diferentes linhagens em meio contendo maltose como única fonte de carbono (YPM) na temperatura de 30 e 24ºC durante 30 h

	30°C		**24°C**	
Linhagem	**DO_{600nm}**	**μ_{max}**	**DO_{600nm}**	**μ_{max}**
S-04	0,40 ^{ef}	0,36 ^{abcde}	0,44 ^{ab}	0,24 ^{abc}
S-33	0,40 ^{ef}	0,43 ^{ab}	0,44 ^{ab}	0,29 ^{a}
W-34/70	0,35 ^{f}	0,26 ^{ef}	0,44 ^{ab}	0,22 ^{abc}
PE-2	0,46 ^{bcde}	0,36 ^{abcde}	0,53 ^{ab}	0,26 ^{abc}
SA-1	0,54 ^{a}	0,26 ^{ef}	0,56 ^{ab}	0,18 ^{cde}
CAT-1	0,51 ^{abc}	0,43 ^{a}	0,56 ^{ab}	0,27 ^{ab}
LBTL419	0,54 ^{abc}	0,33 ^{bcde}	0,58 ^{a}	0,21 ^{abc}
LBTL210	0,51 ^{abc}	0,34 ^{abcde}	0,56 ^{ab}	0,21 ^{abc}
LBTL207	0,49 ^{abcd}	0,41 ^{abc}	0,53 ^{ab}	0,25 ^{abc}
LBTL228	0,49 ^{abc}	0,34 ^{abcde}	0,52 ^{ab}	0,18 ^{bcd}
LBTL150	0,45 ^{cde}	0,40 ^{abc}	0,49 ^{ab}	0,31 ^{a}
LBTL361	0,09 ^{h}	0,13 ^{gh}	0,13 ^{e}	0,08 ^{f}
LBTL390	0,48 ^{abcd}	0,37 ^{abcde}	0,55 ^{ab}	0,29 ^{a}
LBTL291	0,09 ^{h}	0,16 ^{gh}	0,14 ^{e}	0,07 ^{f}
LBTL292	0,50 ^{abc}	0,21 ^{fg}	0,15 ^{e}	0,10 ^{ef}
LBTL438	0,46 ^{bcde}	0,32 ^{cde}	0,51 ^{ab}	0,26 ^{abc}
LBTL295	0,19 ^{g}	0,12 ^{h}	0,17 ^{de}	0,11 ^{def}
LBTL232	0,46 ^{cde}	0,43 ^{ab}	0,47 ^{ab}	0,27 ^{abc}
LBTL165	0,33 ^{f}	0,18 ^{gh}	0,28 ^{cd}	0,13 ^{def}
LBTL179	0,54 ^{a}	0,27 ^{ef}	0,52 ^{ab}	0,23 ^{abc}
LBTL139	0,43 ^{cde}	0,41 ^{abcd}	0,45 ^{ab}	0,26 ^{ab}
LBTL521	0,41 ^{def}	0,38 ^{abcd}	0,46 ^{ab}	0,30 ^{a}
LBTL355	0,45 ^{cde}	0,36 ^{abcde}	0,49 ^{ab}	0,26 ^{abc}
LBTL490	0,07 ^{h}	0,11 ^{h}	0,11 ^{e}	0,11 ^{def}
LBTL190	0,39 ^{ef}	0,17 ^{gh}	0,41 ^{bc}	0,16 ^{def}
LBTL138	0,10 ^{h}	0,18 ^{gh}	0,08 ^{e}	0,10 ^{ef}
LBTL055	0,47 ^{bcde}	0,31 ^{de}	0,45 ^{ab}	0,24 ^{abc}

Letras sobrescritas iguais dentro da mesma coluna não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Dentre as 24 linhagens de bioetanol, grande parte (16 cepas) foi capaz de utilizar a maltose como fonte de carbono, tanto a 30 como a 24°C, apresentando parâmetros de crescimento (DO e μ_{max}) semelhantes às cepas cervejeiras tomadas como controle, especialmente às cepas *ale* (S-04 e S-33).

A menor temperatura reduziu a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) das cepas, inclusive dos controles. A temperatura é um dos fatores que afeta tanto o crescimento quanto a atividade metabólica dos microrganismos (JONES; HOUGH, 1970). Por isso, foi importante avaliar o crescimento em ambas as condições.

Dentre as linhagens de *S. cerevisiae*, há cepas que são incapazes de crescer em meio com maltose como fonte de carbono ou o fazem ineficientemente, e diferenças na forma de utilização desse açúcar são específicas para cada linhagem (BRIGGS et al., 2004). Cinco cepas (LBTL361, LBTL291, LBTL295, LBTL490, LBTL138) apresentaram dificuldade em se desenvolver no meio com maltose, exibindo parâmetros de crescimento (DO e μ_{max}) relativamente baixos em ambas as temperaturas, caracterizando um crescimento lento para tais leveduras. A cepa LBTL292 conseguiu se multiplicar no meio a 30°C, no entanto a 24°C seu desenvolvimento ficou comprometido. E as cepas LBTL165 e LBTL190, embora tenham apresentado crescimento, este ocorreu com uma velocidade significativamente menor que o das linhagens controle, inclusive da cepa *lager* (W-34\70), que a 24°C estaria sob uma temperatura não favorável ao seu metabolismo, que para tal seria em torno de 7 a 15°C.

Para utilizar a maltose, a levedura, primeiramente, necessita transportá-la para o interior da célula através de transportadores específicos presentes na membrana, e posteriormente hidrolisá-la por meio de enzimas α-glicosidases (maltases) em unidades de glicose (STEWART; RUSSELL, 2009). Para tanto, a fermentação da maltose em *Saccharomyces* requer ao menos um dentre os cinco locus *MAL* existentes, cada qual composto por três genes que codificam transportadores (*MALx1*), α-glicosidases (*MALx2*) e um ativador (*MALx3*), que regula a expressão dos outros dois. Todas as linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar a maltose contêm ao menos um lócus *MAL* completamente funcional (HORÁK, 2013).

Contudo, trabalhos tem demonstrado que a capacidade de utilização da maltose está mais relacionada com o seu transporte para o interior da célula do que com a atividade de maltase, sendo o fator limitante para tal o transporte e não a hidrólise (MENESES et al., 2002; RAUTIO; LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2009). Desta forma, poderia se pressupor que o crescimento relativamente lento de algumas cepas de bioetanol estaria associado ao ineficiente sistema de transporte desse açúcar para o interior celular. Tais

linhagens necessitariam de um tempo muito prolongado para conseguir consumir esse açúcar, o que seria uma desvantagem para o processo, podendo ocasionar lentidão na fermentação, açúcares residuais e aumentar a probabilidade de ocorrência de contaminantes.

Todas as cepas também foram submetidas à avaliação do crescimento em mosto cervejeiro HG nas mesmas temperaturas (Tabela 4). Similarmente ao que ocorreu na avaliação com meio YPM, todas as linhagens tiveram redução na velocidade específica máxima de crescimento na menor temperatura (24°C). As mesmas linhagens que apresentaram parâmetros de crescimento satisfatórios em YPM (16 cepas) também foram capazes de se desenvolver eficientemente no mosto HG, exibindo valores de DO e μ_{max} semelhantes aos dos controles, principalmente ao da S-04 e S-33.

Comparado a outros meios empregados na fermentação alcoólica, o mosto cervejeiro é o mais complexo, sendo composto de açúcares simples e dextrinas, além de uma série de nutrientes (BOULTON; QUAIN, 2001; PALMER, 2006). Na fermentação do mosto, as cepas cervejeiras são capazes de utilizar a sacarose, glicose, frutose, maltose e maltotriose aproximadamente nessa sequência, embora ocorra alguma sobreposição (RUSSELL, 2006). Para isso, alguns mecanismos de sinalização das condições nutricionais do meio permitem que ela direcione seu aparato genético e metabólico ao transporte e consumo, inicialmente, dos açúcares preferenciais (RUSSELL, 2006; HORÁK, 2013).

A glicose e a sacarose são sempre consumidas mais rapidamente. A sacarose é hidrolisada externamente, liberando glicose e frutose, que são transportadas para o interior da célula pelos mesmos transportadores de membrana por difusão facilitada. A célula tem preferência pela glicose, e esta reduz a captação de frutose, uma vez que ambas dividem os mesmo transportadores e estes tem maior afinidade pela glicose (D´AMORE et al., 1989; MENESES et al., 2002). A presença desses açúcares reprime a captação de outros como a maltose e a maltotriose. Geralmente, quando cerca de 60% da glicose já tiver sido consumida é que se inicia a absorção da maltose (D´AMORE et al., 1989), e posteriormente da maltotriose, sendo este o último açúcar a ser assimilado pela levedura.

Meneses et al. (2002) estudaram o comportamento de leveduras cervejeiras comparado a outras leveduras industriais (vinho, panificação e destilaria) e cepas laboratoriais em meio composto por vários açúcares (glicose, frutose, sacarose e maltose), e verificaram que a maioria das cepas industriais apresentou o mesmo padrão de assimilação sequencial dos açúcares seguindo o perfil das linhagens cervejeiras: sacarose, glicose, frutose e maltose. As cepas laboratoriais foram incapazes de utilizar a maltose, e variações em termos de DO

máxima atingida foram observadas, sendo os maiores valores alcançados pelas cepas de vinho e de destilarias.

Tabela 4 - Parâmetros de crescimento estimado por densidade óptica máxima (DO_{600nm}) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} (h^{-1})) das diferentes linhagens em mosto cervejeiro HG na temperatura de 30 e 24ºC durante 40 h

	30°C		**24°C**	
Linhagem	**DO_{600nm}**	**μ_{max}**	**DO_{600nm}**	**μ_{max}**
S-04	1,01 ^{bcd}	0,43 ^{g}	1,05 ^{bcde}	0,32 ^{cde}
S-33	0,99 ^{cd}	0,54 ^{cde}	1,05 ^{cde}	0,35 ^{abc}
W-34/70	0,87 ^{ef}	0,32 ^{h}	1,02 ^{de}	0,28 ^{ef}
PE-2	1,15 ^{a}	0,52 ^{ef}	1,12 ^{ab}	0,33 ^{cde}
SA-1	1,04 ^{abcd}	0,58 ^{abc}	1,19 ^{a}	0,31 ^{cde}
CAT-1	1,11 ^{abc}	0,62 ^{a}	1,08 ^{bcd}	0,36 ^{abc}
LBTL419	1,11 ^{ab}	0,56 ^{cde}	1,17 ^{a}	0,30 ^{ef}
LBTL210	1,09 ^{abc}	0,56 ^{bcd}	1,13 ^{ab}	0,33 ^{bcd}
LBTL207	1,03 ^{bcd}	0,60 ^{ab}	1,12 ^{ab}	0,38 ^{a}
LBTL228	1,11 ^{abc}	0,55 ^{cde}	1,15 ^{ab}	0,32 ^{cde}
LBTL150	1,10 ^{abc}	0,52 ^{ef}	1,07 ^{bcde}	0,34 ^{abc}
LBTL361	1,05 ^{abcd}	0,57 ^{abc}	1,03 ^{cde}	0,32 ^{cde}
LBTL390	1,06 ^{abc}	0,56 ^{cde}	1,11 ^{abc}	0,35 ^{abc}
LBTL291	0,45 ^{ghi}	0,52 ^{ef}	0,43 ^{g}	0,28 ^{f}
LBTL292	0,48 ^{g}	0,52 ^{ef}	0,40 ^{gh}	0,35 ^{abc}
LBTL438	1,16 ^{a}	0,53 ^{de}	1,10 ^{bcd}	0,35 ^{abc}
LBTL295	0,46 ^{gh}	0,54 ^{cde}	0,45 ^{g}	0,35 ^{abc}
LBTL232	1,04 ^{abcd}	0,57 ^{bcd}	1,17 ^{a}	0,35 ^{abc}
LBTL165	0,78 ^{f}	0,29 ^{h}	0,74 ^{f}	0,23 ^{g}
LBTL179	1,07 ^{abc}	0,58 ^{abc}	1,13 ^{ab}	0,31 ^{def}
LBTL139	1,01 ^{bcd}	0,47 ^{fg}	1,04 ^{cde}	0,32 ^{cde}
LBTL521	1,13 ^{a}	0,54 ^{cde}	1,14 ^{ab}	0,34 ^{abc}
LBTL355	1,06 ^{abc}	0,55 ^{cde}	1,10 ^{bcd}	0,36 ^{abc}
LBTL490	0,38 ^{i}	0,58 ^{abc}	0,37 ^{hi}	0,27 ^{f}
LBTL190	0,39 ^{hi}	0,58 ^{abc}	0,32 ^{i}	0,36 ^{ab}
LBTL138	0,40 ^{ghi}	0,49 ^{fg}	0,36 ^{hi}	0,30 ^{def}
LBTL055	0,94 ^{de}	0,54 ^{cde}	1,01 ^{e}	0,35 ^{abc}

Letras sobrescritas iguais dentro da mesma coluna não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

As cepas que apresentaram desenvolvimento insatisfatório em YPM também tiveram seu crescimento comprometido no mosto HG, em ambas as temperaturas, apresentando valores de DO relativamente inferiores aos dos controles, embora os valores de μ_{max} tenham sido semelhantes (LBTL291, LBTL292, LBTL295, LBTL490, LBTL190, LBTL138), sobretudo, ao da cepa controle S-33. As curvas de crescimento, a exemplo de algumas dessas cepas (Figura 3), mostram que tais linhagens atingem a fase exponencial, porém esta tem o seu curso comprometido, desacelerando a multiplicação repentinamente, entrando na fase estacionária. Isso pode estar associado à incapacidade de utilizar eficientemente a maltose presente no mosto cervejeiro por parte dessas linhagens, o que impossibilitaria que as células continuem se propagando, uma vez que os demais açúcares fermentescíveis presentes no mosto, glicose, frutose e sacarose, já tenham sido consumidos preferencialmente.

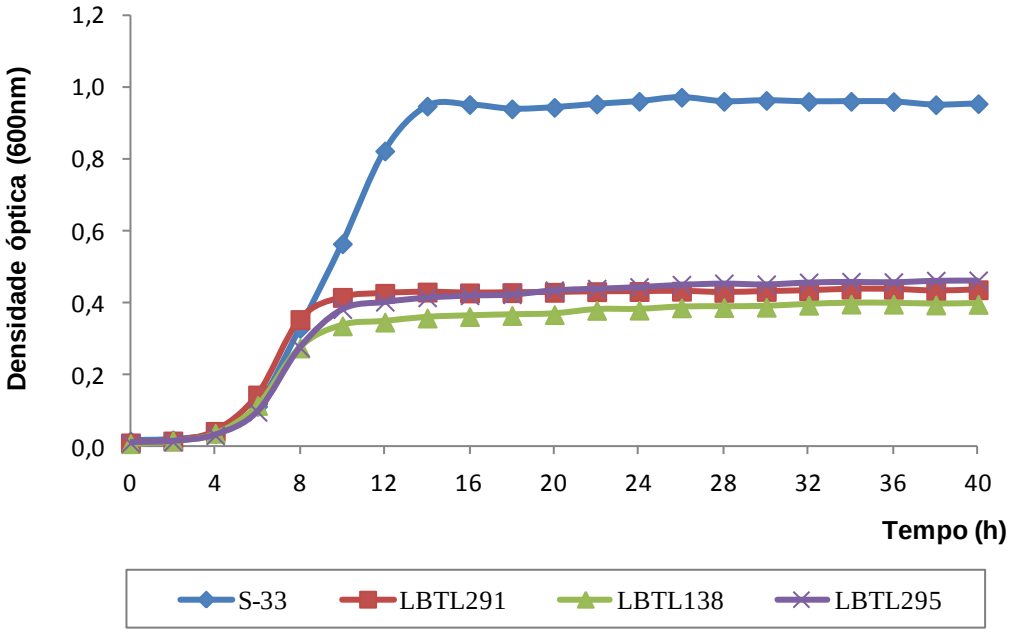


Figura 3 – Curva de crescimento da cepa cervejeira controle (S-33) e de algumas linhagens de bioetanol em mosto cervejeiro HG na temperatura de 30°C durante 40 h

A linhagem LBTL165 foi capaz de crescer no mosto, no entanto com uma velocidade inferior ao dos controles, principalmente a 24°C. A cepa LBTL361, cujo crescimento foi vagaroso em YPM (Tabela 3), foi capaz de se desenvolver no mosto HG, alcançando valores de DO e μ_{max} semelhantes aos das cepas *ale* (S-04 e S-33). A ineficiência dessa cepa em crescer em maltose como única fonte de carbono e posteriormente crescer em mosto cervejeiro habilmente pode estar relacionada à presença de outros açúcares no mosto. O transportador Agt1 pode carrear vários α-glicosídeos diferentes. Seu substrato preferencial é a

trealose e a sacarose, no entanto, ele também pode transportar maltose (STAMBUK et al., 1999). Pode-se especular que tal cepa possua o Agt1 e que a presença de sacarose no mosto possa ter ativado esse transportador e permitido a captação da maltose presente no mosto mais rapidamente. Além disso, como a captação da maltose para o interior celular é realizado por meio de transporte dependente de energia através de um mecanismo de simporte, no qual um próton é co-transportado juntamente com uma molécula de açúcar, sendo que para cada próton que entra na célula um ATP é gasto para expulsá-lo (VAN LEUWEEN et al., 1992), poderia se inferir que a metabolização dos outros açúcares (glicose, frutose e sacarose) tenha fornecido energia utilizada para dar início ao transporte da maltose pela célula.

Outra observação interessante ocorreu em relação ao perfil de crescimento da cepa cervejeira S-04 em mosto cervejeiro. Essa linhagem é uma cepa *ale* de alta floculação (FERMENTIS, 2015), que possui a capacidade de flocular quando os açúcares do mosto se esgotam. Essa característica ficou evidente em sua curva de crescimento, na qual observou-se reduções nas leituras de DO, por ocasião da floculação, a partir de 16 e 23 horas de crescimento no mosto à temperatura, respectivamente, de 30 e 24°C. Esse perfil ocorreu somente em mosto cervejeiro, não sendo observado em YPM (Figura 4). Tal característica poderia ser uma estratégia a ser utilizada em trabalhos que busquem linhagens que apresentem esse perfil de floculação.

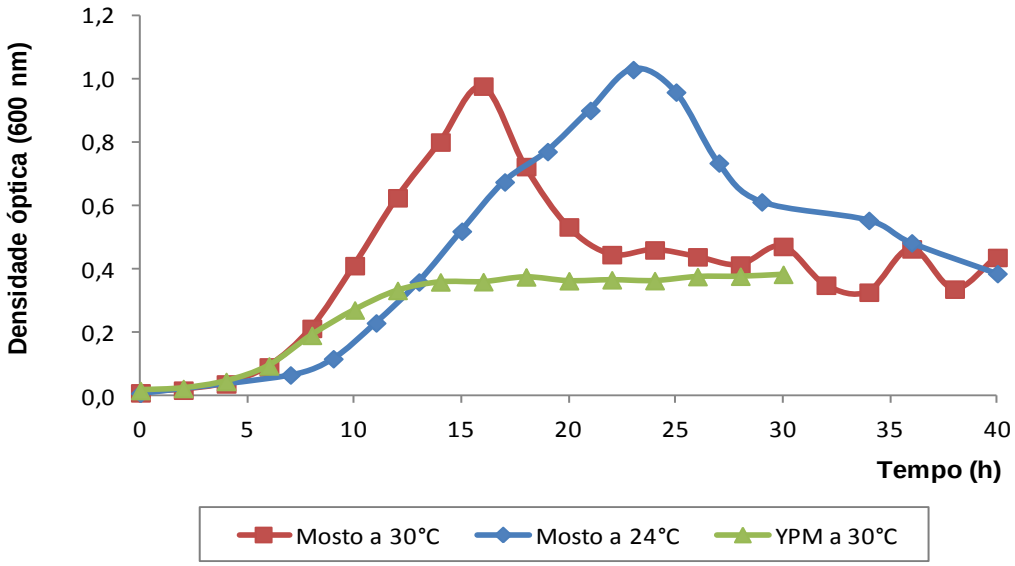


Figura 4- Curvas de crescimento (DO_{600nm}) da linhagem cervejeira comercial S-04 em mosto cervejeiro HG a 30 e 24ºC, e em meio sintético de maltose (YPM) a 30ºC

Pelo exposto até o momento, verificou-se que as linhagens LBTL291, LBTL292, LBTL295, LBTL490, LBTL190, LBTL138 e LBTL165 se mostraram inaptas para a fermentação cervejeira, sendo, portanto, excluídas das avaliações seguintes.

5.3 Fermentação em mosto HG

As linhagens de bioetanol, selecionadas na etapa anterior, foram submetidas a um ensaio fermentativo em mosto HG na temperatura de 24°C sem agitação. A partir do monitoramento da fermentação, foi possível traçar o perfil de velocidade fermentativa das linhagens, bem como seu desempenho quanto à produção de etanol, fermentabilidade do mosto e viabilidade celular.

As curvas de fermentação (Figura 5), obtidas pela perda de peso devido à liberação de CO_2, permitiram verificar a velocidade com que as linhagens fermentaram os açúcares do mosto. Diferentes perfis de liberação de CO_2 foram observados para as linhagens, inclusive para os controles (S-04, S-33 e W-34/70).

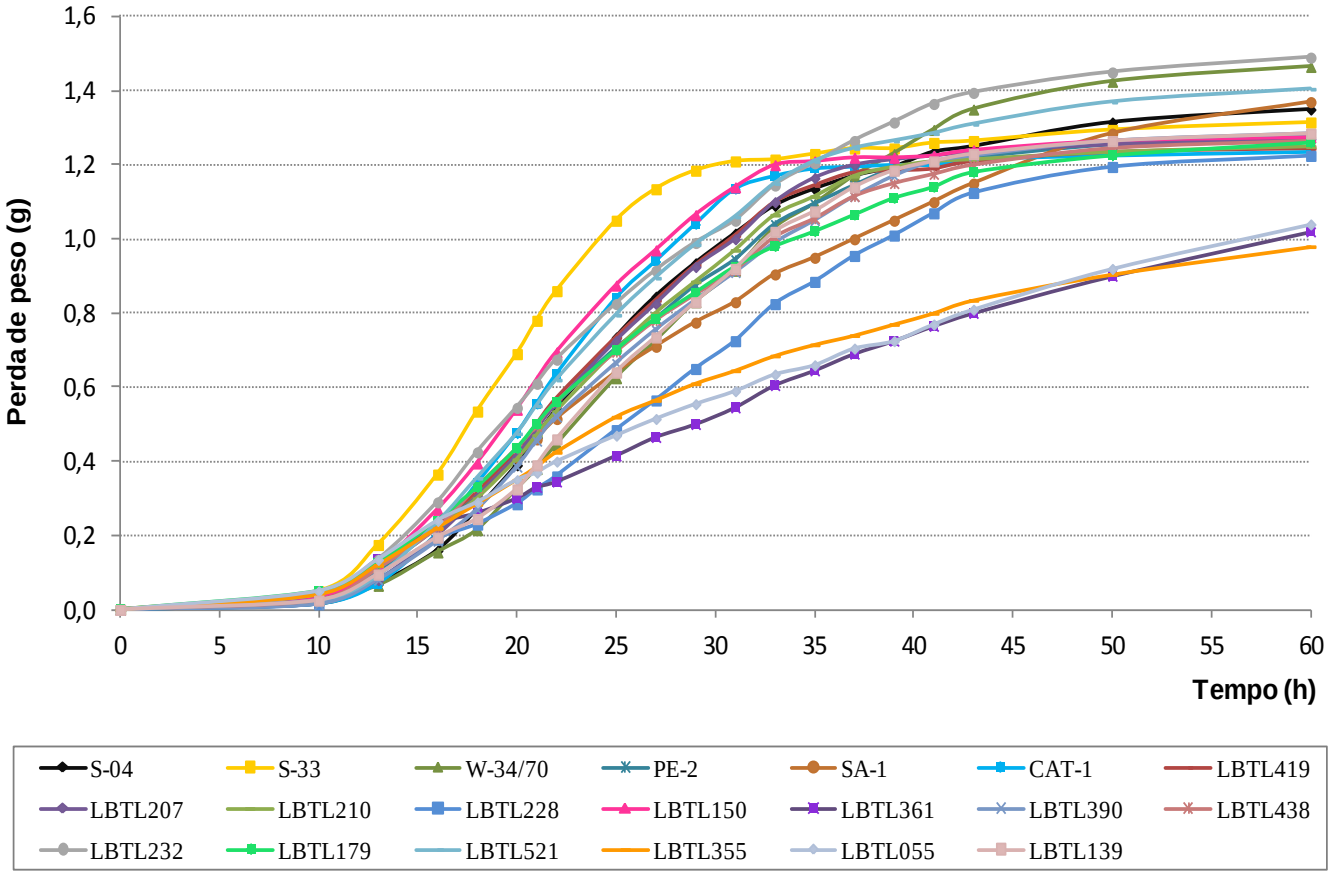


Figura 5 - Velocidade de fermentação das diferentes linhagens estimada por monitoramento da perda de peso (g) pela liberação de CO_2 durante a fermentação. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC sem agitação

Para as linhagens cervejeiras, a maior velocidade de fermentação foi verificada para a cepa *ale* S-33, seguida da S-04 (*ale*) e por último da W-34/70 (*lager*). As quantidades de CO_2 total liberado na fermentação do mosto por estas cepas foram de, respectivamente, 1,32, 1,35 e 1,47 g (Anexo C). Dentre as linhagens de bioetanol, grande parte apresentou-se com velocidades de fermentação análogas à S-04 e com perfil de liberação total de CO_2 similares ao da S-33. As cepas CAT-1 e LBTL150 exibiram maiores velocidades de fermentação, sendo superiores ao controle S-04, com liberação total de CO_2 semelhante ao do controle S-33. As cepas LBTL232 e LBTL521 destacaram-se pela fermentação dos açúcares do mosto em maior intensidade, liberando quantidades superiores de CO_2 total, além de apresentarem maior velocidade de fermentação que a S-04. Entretanto, para as linhagens LBTL361, LBTL355 e LBTL055 observou-se lentidão na fermentação dos açúcares do mosto.

Com exceção dessas três cepas, verificou-se que as linhagens atingiram a fase de estabilização da perda de peso ao final do tempo de monitoramento, o que indica que a fermentação foi finalizada. As quantidades totais de CO_2 liberado coincidem com os diferentes perfis de fermentabilidade do mosto (Figura 6) e de produção de etanol (Figura 7) pelas linhagens. Aquelas que tiveram maior liberação de CO_2 apresentaram maior fermentabilidade e consequentemente, maior produção de etanol.

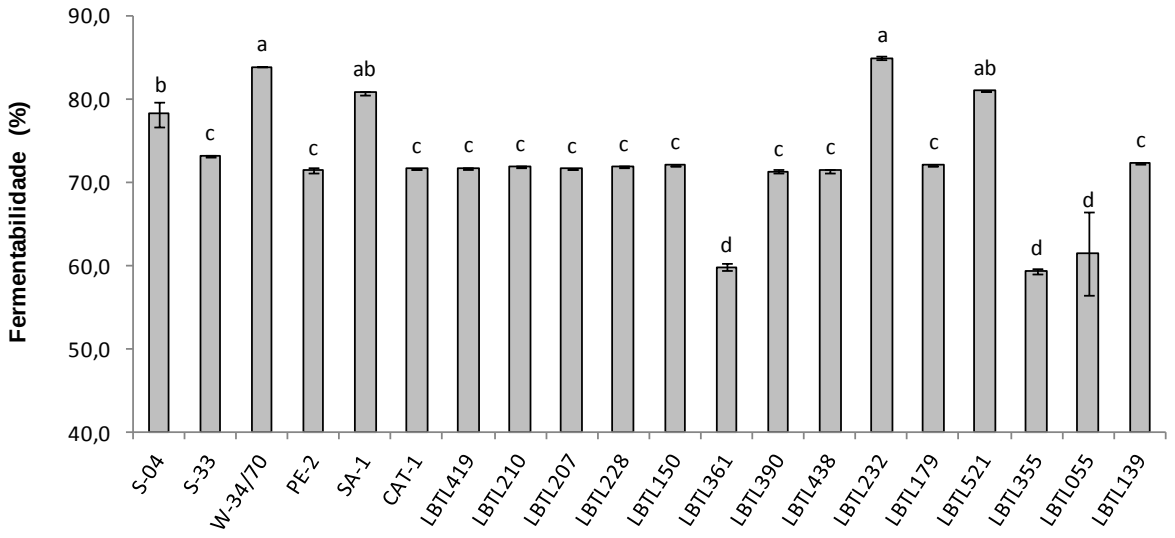


Figura 6 - Fermentabilidade (%) das diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC sem agitação. Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

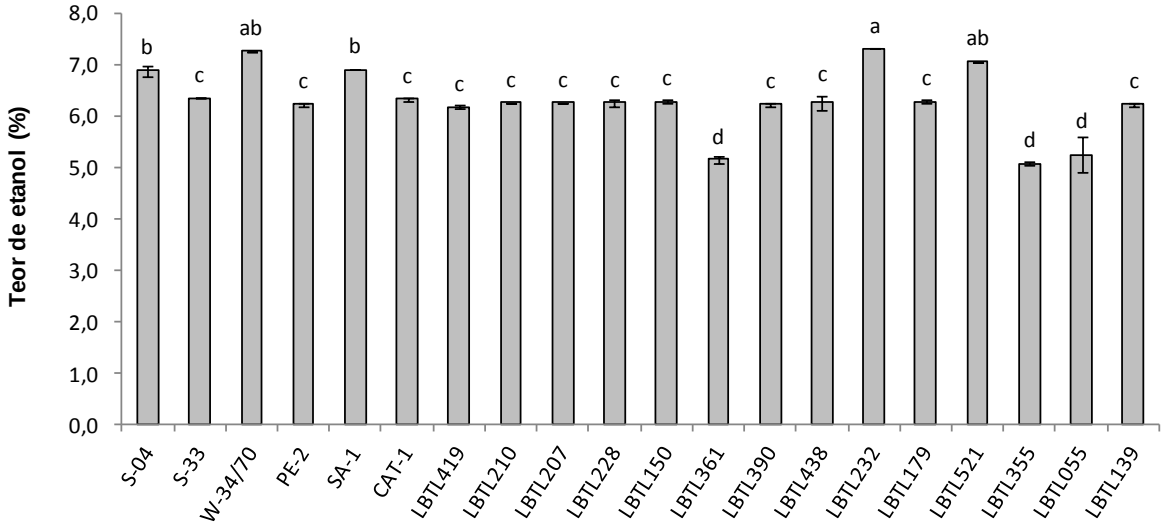


Figura 7 - Teor de etanol (%, v/v), após a fermentação, para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC sem agitação. Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

A fermentabilidade ou atenuação aparente do mosto refere-se à proporção de sólidos dissolvidos que foi consumida pela levedura, e convertida, principalmente, em etanol e CO_2, produtos majoritários da fermentação (BRIGGS et al., 2004). A maior parte das leveduras de cerveja é capaz de atenuar o mosto em uma faixa que varia de 65 a 80%. Há três faixas de atenuação do mosto para as cepas cervejeiras: baixa (65 a 70%), média (71 a 75%) e alta (76 a 80%) (PALMER, 2006).

A caracterização das cepas cervejeiras S-33, S-04 e W-34/70, segundo o seu fabricante (FERMENTIS, 2015), mostra que elas são, respectivamente, de baixa, média e alta atenuação, embora alguma variação possa ocorrer. Isso reflete o perfil de liberação total de CO_2, a fermentabilidade e a produção de etanol encontrados no experimento, mostrando o paralelismo que existe entre os três parâmetros.

As cepas *lager*, geralmente, conseguem atenuar o mosto em maior intensidade que as cepas *ale*. As primeiras apresentam maior eficiência na assimilação da maltotriose presente no mosto cervejeiro que as últimas, sendo encontradas menores quantidades de maltotriose residual nas fermentações *lager* (ZHENG et al., 1994; BOULTON; QUAIN, 2001). Ademais, dentre as cepas *ale*, há linhagens que são incapazes de utilizar esse açúcar (BRIGGS et al., 2004). O que não quer dizer que uma levedura seja preterida em função disso, pois em cervejas *ale*, o maior residual de açúcares contribui para uma bebida com mais corpo (PAPAZIAN, 2006).

Com os resultados obtidos, foi possível caracterizar o perfil de atenuação do mosto e produção alcoólica das linhagens de bioetanol. Dentre estas cepas, a maioria apresentou perfil de fermentabilidade e produção de etanol semelhantes ao da linhagem cervejeira S-33. Para a linhagem LBTL232, observou-se alta fermentabilidade e elevada produção de etanol assemelhando-se ao perfil da cepa cervejeira W-34/70. O comportamento das cepas SA-1 e LBTL521 quanto a esses parâmetros foi análogo ao da linhagem S-04. Estes resultados vêm nos trazer informações quanto ao comportamento que se esperaria dessas linhagens em fermentações cervejeiras, o que é um dos fatores relevantes no momento da escolha da cepa em função do estilo de cerveja que se deseja produzir e das características que se espera na mesma.

As cepas de bioetanol se mostraram tolerantes à fermentação com mosto de alta densidade. A maioria das linhagens foi capaz de sustentar alta viabilidade celular após a fermentação, apresentando valores acima de 90% (Figura 8). As menores viabilidades foram observadas para as cepas LBTL355 e LBTL055, que também apresentaram baixa velocidade de fermentação e menor conversão de açúcares a etanol. A cepa LBTL361, embora tenha se comportado de forma semelhante, exibiu elevada viabilidade celular. Tal comportamento pode ser resultante do estresse ocasionado pelo mosto de alta densidade, no qual a pressão osmótica, juntamente com o etanol produzido, pode estar atuando de forma inibitória sobre a fisiologia dessas linhagens.

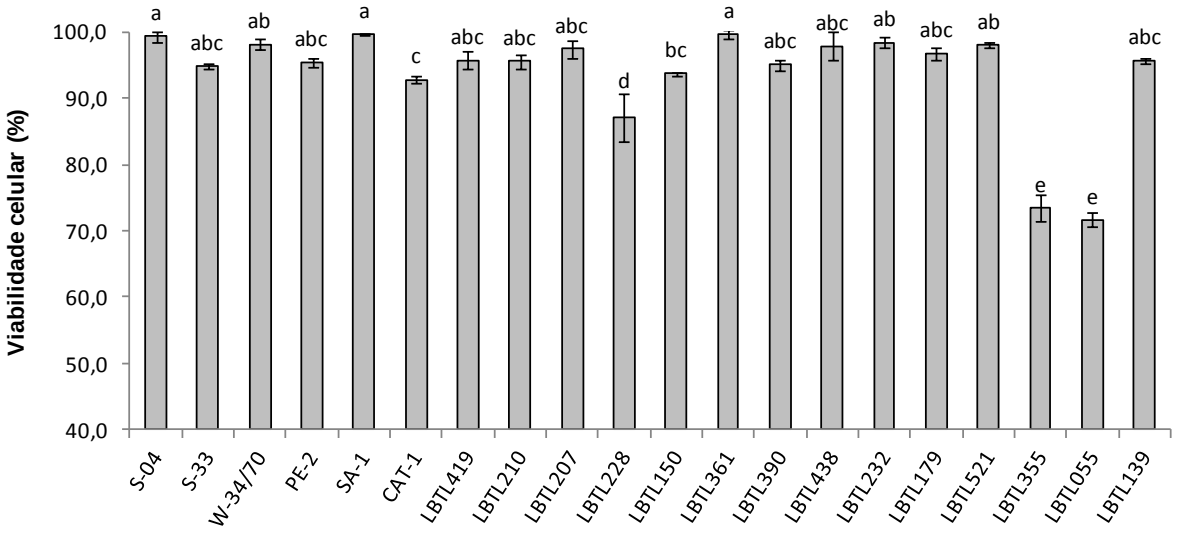


Figura 8 - Viabilidade celular (%), após a fermentação, para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC sem agitação. Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

No processo fermentativo de alta densidade, o mosto mais concentrado em açúcares exerce maior pressão osmótica sobre a levedura e a toxidez do etanol é acentuada ao final da fermentação (REES; STEWART, 1997; GIBSON et al., 2007; PIDDOCKE et al., 2009). Essas condições podem comprometer o estado fisiológico da levedura e afetar seu desempenho fermentativo. Piddocke et al. (2009) observaram menor velocidade de fermentação e maior teor de açúcares residuais em processos fermentativos com mosto concentrado. Yu et al. (2012) relataram reduções na taxa de captação de açúcares e na produtividade de etanol e verificaram menores viabilidades celulares conforme aumentou-se a densidade inicial dos mostos. No mesmo sentido, Lei et al. (2012) também constataram lentidão na fermentação, maior teor de açúcares residuais e queda na viabilidade celular. Além disso, todos estes trabalhos relataram alterações no perfil aromático das cervejas, comprometendo a qualidade sensorial da bebida.

Portanto, verifica-se que a fermentação com mosto de alta densidade necessita de linhagens tolerantes para que o processo fermentativo e a qualidade da bebida não fiquem comprometidos. E isso é particularmente importante quando se tem a pretensão de reutilizar a levedura em fermentações subsequentes.

Em vista disso, as linhagens LBTL361, LBTL355 e LBTL055, foram consideradas inaptas para a fermentação HG, sendo excluídas da seleção.

5.4 Outros parâmetros relevantes ao processo cervejeiro

5.4.1 Produção de sulfeto de hidrogênio

As linhagens que apresentaram desempenho fermentativo satisfatório foram submetidas à avaliação quanto à produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) em meio sintético. Nessa avaliação, a alta produção de H_2S se caracteriza pela coloração marrom escura das colônias, que ocorre pela reação desse componente com o chumbo, formando sulfato de chumbo (PbS) que resulta no escurecimento da colônia (ONO et al., 1991). Em cervejas, produções excessivas de H_2S prejudicam o aroma da bebida, causando odores desagradáveis, semelhantes a ovo podre (VANDERHAEGEN et al., 2003).

Nessa avaliação, verificou-se que as linhagens cervejeiras apresentaram diferentes colorações de colônias (Figura 9), configurando baixa produção de H_2S para a linhagem S-04 (*ale*), porém alta produção para as cepas S-33 (*ale*) e W-34/70 (*lager*). As leveduras de bioetanol demonstraram capacidades variadas de produção, porém em nenhuma foi verificada intensa formação. As colônias que permaneceram brancas representam linhagens com

ausência de produção desse componente, sendo observadas para as cepas PE-2, LBTL150 e LBTL438. As demais linhagens demonstraram baixa e mediana capacidade de produzir H_2S.

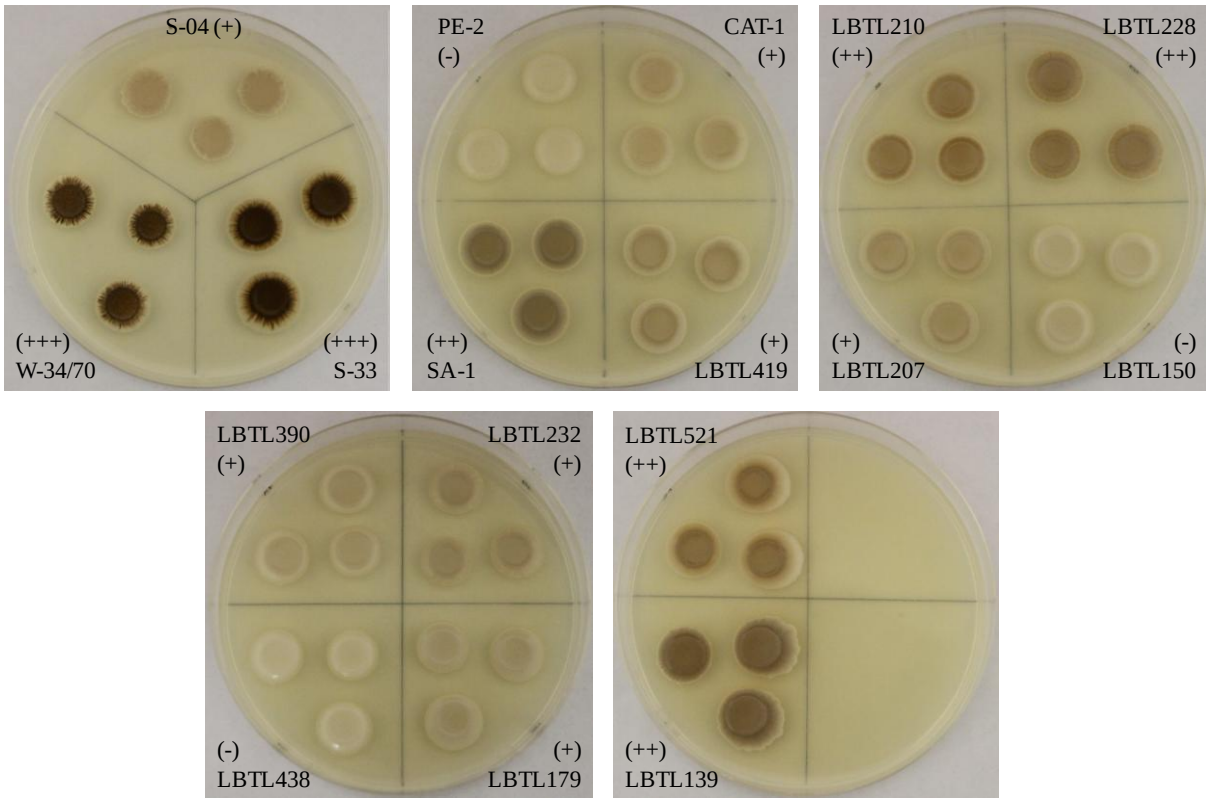


Figura 9 - Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) para as linhagens cervejeiras S-04, S-33 e W-34/70 e as linhagens de bioetanol. Teste conduzido em placas contendo meio ágar LA incubadas a 30ºC por 10 dias. Escurecimento das colônias evidencia a intensidade de produção de H_2S: (-) ausente; (+) baixa; (++) mediana; (+++) alta

Os compostos sulfurosos são aceitáveis em pequenas quantidades na cerveja. Muitos desses compostos são resultantes da matéria-prima empregada na produção da bebida, porém as concentrações de H_2S e também de dióxido de enxofre são resultantes da atividade metabólica da levedura (STEWART; RUSSELL, 2009).

A produção de H_2S, assim como sua concentração, varia de uma linhagem para outra, e está relacionada com a biossíntese dos aminoácidos cisteína e metionina, a partir da redução de compostos inorgânicos como sulfatos e sulfitos (BAMFORTH, 2000; STEWART; RUSSELL, 2009). O H_2S é preocupante em cervejas devido ao seu limiar de percepção ser relativamente baixo (5-10 µg/L). Valores acima disso podem agregar odores desagradáveis à bebida (MOLL, 1991 apud LANDAUD et al., 2008).

Além da síntese do H_2S ser linhagem-dependente, a composição do meio influencia a produção desse componente durante a fermentação. Por isso, as cepas cervejeiras S-33 e W-

34\70 podem ter produzido quantidades elevadas nesse teste. Em geral, maiores quantidades de H_2S são verificadas para cepas *lager* do que para as cepas *ale* (WALKER; SIMPSON, 1993). O aparato metabólico de cada linhagem influencia altamente a quantidade produzida em resposta ao meio em que se encontram (UGLIANO et al., 2011). O método de plaqueamento, embora não possa ser usado para prever a produção de H_2S durante a fermentação, fornece um indicativo do potencial produtivo desse componente pelas linhagens (UGLIANO et al., 2011).

5.4.2 Produção de espuma durante a fermentação e capacidade de floculação

As linhagens foram analisadas quanto ao potencial de produção de espuma durante a fermentação de mosto cervejeiro HG. E foram submetidas a uma avaliação quantitativa sobre a capacidade de floculação (Tabela 5).

A formação de espuma pode se tornar um inconveniente durante a fermentação. Quantidades excessivas são indesejáveis nesse momento, pois podem ocupar boa parte do volume do tanque fermentativo, além de trazer sérios transtornos ao processo como incrustação em tubulações, comprometimento da assepsia, perda de cerveja e do amargor do lúpulo, além de prejudicar a estabilidade da espuma na cerveja final (KORDIALICK-BOGACKA; CAMPBELL, 2000). Existem algumas formas de controlar a espuma como usar antiespumantes ou adicionar alguns produtos como silicone e ésteres de ácidos graxos, porém podem ocorrer danos à qualidade da espuma no produto final (KORDIALICK-BOGACKA; CAMPBELL, 2000).

As diferentes cepas de leveduras podem produzir quantidades variáveis de espuma durante a fermentação (BASSO et al., 2008). Assim, é desejável para o processo que o uso de linhagens com alta capacidade de produção seja evitado. Na fermentação do mosto cervejeiro, a formação de espuma para as linhagens de bioetanol não excedeu a altura máxima alcançada para as cepas cervejeiras *ale* S-04 e S-33 (Tabela 5), o que é um indicativo de que as primeiras não poderiam comprometer o processo por produções excessivas, uma vez que os controles tomados como referência são cepas de utilização industrial.

Comportamentos semelhantes a tais referências foram observados para as linhagens CAT-1, LBTL150, LBTL232 e LBTL521, o que pode estar associado a maior velocidade de liberação de CO_2 por parte dessas linhagens durante a fase tumultuosa da fermentação, conforme se verificou na Figura 5. As bolhas de CO_2 ao serem liberadas carregam do mosto substâncias superfície-ativas que possuem baixa tensão superficial, o que significa que podem aumentar a área de superfície da bolha e também formar uma camada elástica ao redor dela,

originando e estruturando a espuma (STEINER et al., 2011). Quanto maior a quantidade de CO_2 dissolvido mais espuma é formada. No entanto, a linhagem de levedura, assim como os componentes do malte (proteínas) e do lúpulo (iso-alfa-ácidos), influencia a produção e a estabilidade da espuma (STEINER et al., 2011). Como todas as cepas foram avaliadas na mesma condição, provavelmente as diferenças observadas se devem às características peculiares de cada linhagem.

Tabela 5 - Produção de espuma (altura máxima em mm) para as diferentes linhagens durante a fermentação de mosto cervejeiro HG a 24°C e quantificação da capacidade de floculação (%)

Linhagem	**Espuma (altura em mm)**	**Floculação (%)**
S-04	23,5 ^{a}	82,0 ^{ab}
S-33	23,5 ^{a}	71,0 ^{bc}
W-34/70	18,0 ^{de}	56,4 ^{def}
PE-2	16,5 ^{ef}	50,80 ^{ef}
SA-1	14,5 ^{fgh}	32,26 ^{g}
CAT-1	21,5 ^{abc}	46,56 ^{f}
LBTL419	15,5 ^{fg}	54,63 ^{def}
LBTL210	16,5 ^{ef}	63,17 ^{cd}
LBTL207	19,0 ^{cd}	50,26 ^{ef}
LBTL228	16,0 ^{efg}	49,91 ^{ef}
LBTL150	20,0 ^{bcd}	49,05 ^{ef}
LBTL390	15,0 ^{fgh}	56,50 ^{def}
LBTL438	16,5 ^{ef}	52,26 ^{def}
LBTL232	22,0 ^{ab}	70,46 ^{bc}
LBTL179	14,0 ^{gh}	58,81 ^{cde}
LBTL521	21,0 ^{abc}	86,19 ^{a}
LBTL139	13,5 ^{h}	55,47 ^{def}

Letras sobrescritas iguais dentro da mesma coluna não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Para todas as cepas avaliadas, a espuma alcançou a máxima altura em torno de 20 horas de fermentação e foi diminuindo gradativamente ao longo do tempo. A exceção a isso foi a linhagem LBTL232 que apresentou uma espuma persistente mesmo após 20 horas, inclusive com incrementos de espuma no transcorrer desse período, observando-se também um agregado de levedura na mesma, ocasionado por flotação de fermento. Para a cepa LBTL139, verificou-se comportamento semelhante em relação à flotação (Figura 10), o que é

prejudicial ao processo e pode levar aos inconvenientes já mencionados. Isso possivelmente está relacionado com a presença de proteínas hidrofóbicas, como as manoproteínas, na parede celular dessas leveduras, o que confere hidrofobicidade às células favorecendo sua aderência às bolhas de gás, ocasionando sua flotação (CHIAVARI et al., 2000).

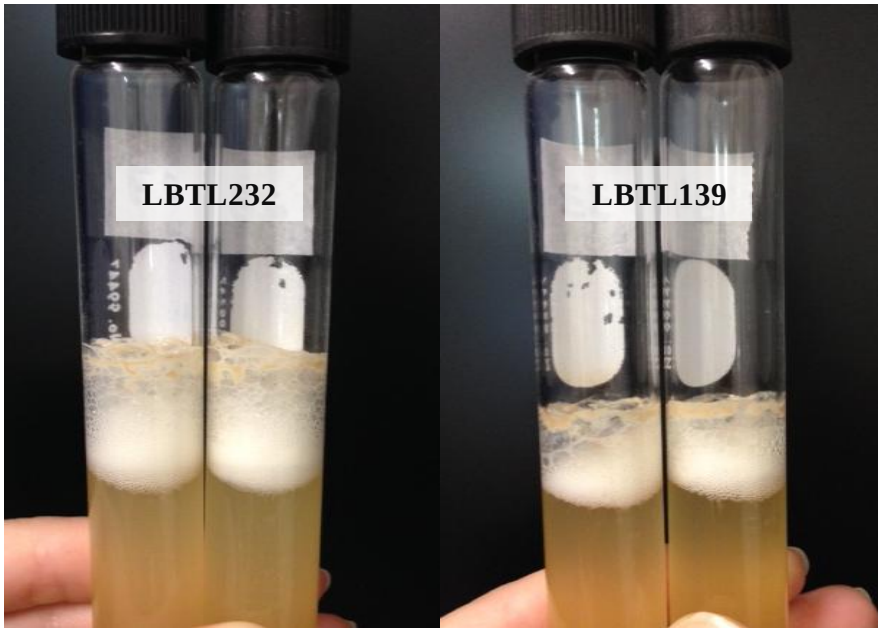


Figura 10 - Fotografia dos tubos utilizados na avaliação de produção de espuma para as cepas LBTL232 e LBTL139 referente à ocorrência de flotação de fermento aderido a espuma

A floculação é um fenômeno no qual células individuais se aderem em grupos, que posteriormente sedimentam-se no fundo do fermentador (VIDGREN; LONDESBOROUGH, 2011). A floculação é desejável no processo cervejeiro, pois facilita a separação da levedura da cerveja ao final da fermentação. No entanto, esse fenômeno é desejável somente quando os açúcares do mosto já tiverem sido consumidos, caso contrário pode causar lentidão na fermentação e formação de "*off-flavors*" (VERSTREPEN et al., 2003c).

Uma forma de avaliar a habilidade de floculação das leveduras é quase sempre através da taxa de sedimentação das células em condições de repouso (SPEERS et al., 1992). Uma suspensão celular homogênea é deixada em repouso, e após um tempo definido a concentração de células que permanecem na parte superior da suspensão é estimada e utilizada para calcular a proporção do total de células que já sedimentou (VIDGREN; LONDESBOROUGH, 2011).

Com relação a esse parâmetro (Tabela 5), observou-se que a maior parte das cepas de bioetanol demonstrou comportamento semelhante ao da cepa cervejeira W-34/70, apresentando taxas de sedimentação ao redor de 50%. Essa cepa cervejeira é caracterizada, de

acordo com seu fabricante, por elevado potencial de floculação (FERMENTIS, 2015). O maior percentual para esse parâmetro foi observado para a cepa LBTL521, que se aproximou do perfil da S-04, também de alta floculação, segundo o mesmo fabricante. A menor taxa de sedimentação foi verificada para a SA-1. Essa variação é comum para diferentes linhagens. D'Hautcourt e Smart (1999) verificaram que a capacidade de floculação mostrou ser linhagem-dependente, e fatores como o tempo de sedimentação e a presença de etanol podem afetá-la de diferentes formas. A floculação, além de ser dependente do aparato genético de cada levedura, o qual se reflete nas propriedades de sua superfície celular, é também influenciado pelas condições ambientais e por fatores físicos referentes à hidrodinâmica do meio (VIDGREN; LONDESBOROUGH, 2011). O percentual de floculação, determinado pela taxa de sedimentação das células, não segue uma tendência em função da característica *ale* ou *lager* das leveduras, nem do seu fenótipo de floculação (D'HAUTCOURT; SMART, 1999). Diferentes percentuais foram observados para cepas cervejeiras, variando de 35 a 64,7% para *lagers*, e ao redor de 59,3% para *ales* (POWELL et al., 2003).

5.4.3 Tolerância ao etanol

Em condições de fermentação de alta densidade, além da pressão osmótica, a levedura precisa resistir a maiores teores alcoólicos formados no meio fermentativo (REES; STEWART, 1997; PIDDOCKE et al., 2009). É importante que a levedura apresente capacidade de tolerar esse estresse, pois reduções na vitalidade e viabilidade celular podem ocorrer e comprometer a fermentação e prejudicar a qualidade da cerveja, já que estas dependem do estado fisiológico da levedura (STEWART; RUSSELL; 2009). Em vista disso, as linhagens foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento em meio contendo variadas concentrações de etanol.

A avaliação mostrou que as linhagens não foram afetadas quanto ao crescimento em concentrações iniciais de até 7,5% de etanol (Figura 11), com exceção da cepa cervejeira W-34/70, que foi incapaz de crescer nessa condição.

A adição de etanol ao meio na concentração inicial de 10% teve pouco efeito sobre o crescimento das leveduras avaliadas. No entanto, aumentando-se para 12,5%, o desenvolvimento das cepas cervejeiras S-33 e S-04 ficou comprometido, sendo esta última incapaz de crescer. Nessa condição, as linhagens de bioetanol foram pouco afetadas. No entanto, a adição de 15% de etanol no meio foi bastante prejudicial ao crescimento, mas mesmo assim, várias cepas de bioetanol conseguiram se desenvolver como a PE-2, CAT-1, LBTL207, LBTL150, LBTL179, LBTL521 e a LBTL139. Trabalhos mostram variadas

capacidades de tolerância ao etanol dentre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A presença de 5 a 8% de etanol no meio é bem tolerado para essa espécie, ao passo que concentrações de 13 a 18% passam a comprometer o seu desenvolvimento (GARCÍA et al., 2016), embora haja cepas com habilidade de crescer em concentrações de etanol ao redor de 15% (VICENTE et al., 2006; ELMACI et al., 2014).

O etanol é um agente de estresse sobre o metabolismo das leveduras, afetando seu desempenho fermentativo (GIBSON et al., 2007) de várias formas. Ele atua principalmente sobre a membrana plasmática da célula, afetando sua polaridade e fluidez (INGRAN, 1976; JONES, 1989; BANAT et al., 1998), prejudicando sistemas de transporte de açúcares (BAI et al., 2008), impactando negativamente no crescimento, na velocidade de fermentação e na viabilidade celular (GIBSON et al., 2007; YU et al., 2012).

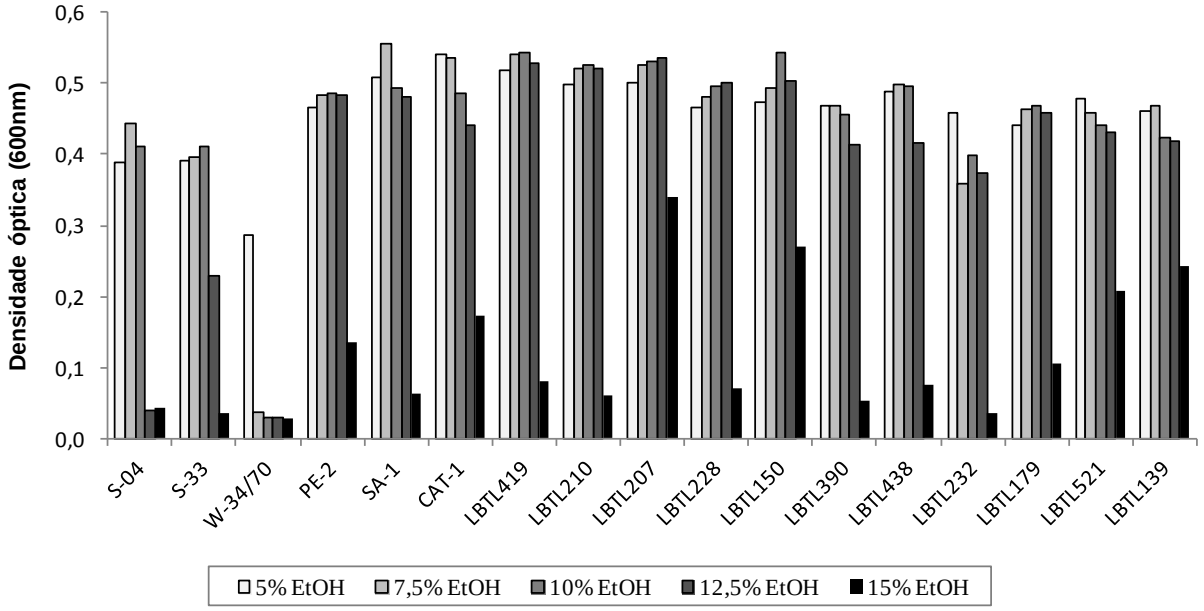


Figura 11 - Crescimento das diferentes linhagens estimado por densidade óptica (DO_{600nm}) em meio YPD acrescido de etanol nas concentrações de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% (v/v). Crescimento realizado na temperatura de 30ºC durante 48 h para as quatro primeiras concentrações e 62 h para a última

Levando-se em consideração todas as características avaliadas até o momento, as linhagens PE-2, CAT-1, LBTL419, LBTL207, LBTL150, LBTL390, LBTL438, LBTL179 e LBTL521 foram selecionadas para a etapa seguinte. A cepa cervejeira S-33 foi definida como sendo o controle a ser utilizado nos próximos experimentos. Sua escolha se fez pertinente porque, além de ser uma cepa *ale*, ela se apresentou com maior tolerância ao etanol dentre os controles utilizados, o que é desejável já que se teve a pretensão de avaliar o potencial fisiológico e tecnológico das linhagens de bioetanol quanto à fermentação cervejeira com

mosto HG, e também devido à avaliação destas últimas ter mostrado que a maioria se apresentou com perfil de fermentabilidade semelhante ao desta cepa.

5.5 Fermentação em mosto HG com reciclo celular

Neste experimento procurou-se acessar a capacidade fisiológica das leveduras em condição de recirculação da biomassa em fermentações subsequentes em mosto cervejeiro HG. Para isso, as linhagens foram submetidas à fermentação do mosto durante cinco ciclos fermentativos a 24°C. Procurou-se simular as condições empregadas nas cervejarias quanto à reinoculação da biomassa, mantendo as mesmas concentrações de inóculo em todos os reciclos, e a redução da temperatura após a fermentação, para auxiliar na decantação do fermento. Para o último ciclo, o mosto foi clarificado para causar estresse adicional às leveduras.

A formação de biomassa foi diversificada entre as linhagens avaliadas (Figura 12). As cepas LBTL419 e LBTL521 mostraram uma tendência de maior formação quanto a esse parâmetro até o quarto ciclo, assemelhando-se à linhagem controle (S-33). A CAT-1 apresentou perfil de menor produção, embora sintetizando teores de etanol (Figura 16) análogos ao da S-33, bem como mantendo alta viabilidade celular (Figura 13). Tais características de formação de biomassa se mostram específicas para cada linhagem, uma vez que, ao menos até o quarto ciclo, suas viabilidades celulares apresentaram-se constantes, bem como a síntese de etanol, não podendo, portanto, correlacionar-se a uma menor tolerância aos estresses do processo.

Até o quarto ciclo, a viabilidade celular manteve-se elevada para todas as linhagens, com percentuais acima de 90% (Figura 13). Para esse parâmetro, as cepas LBTL207, LBTL419 e LBTL521 se destacaram, especialmente no decorrer dos reciclos. A manutenção de alta viabilidade é fundamental para que as leveduras possam ser reutilizadas em fermentações subsequentes, pois o desempenho fermentativo, assim como a qualidade da cerveja, no sentido de manter as características sensoriais da bebida reproduzíveis, dependem da condição fisiológica da levedura (BLIECK et al., 2007).

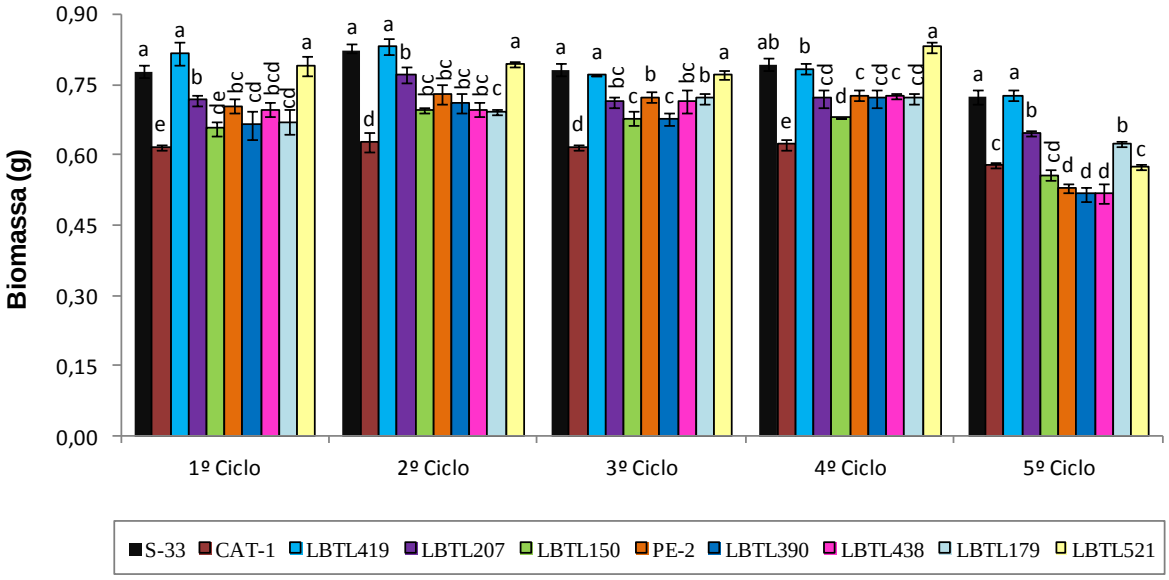


Figura 12 - Biomassa úmida centrifugada (g) obtida após a fermentação no decorrer de cinco ciclos fermentativos para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

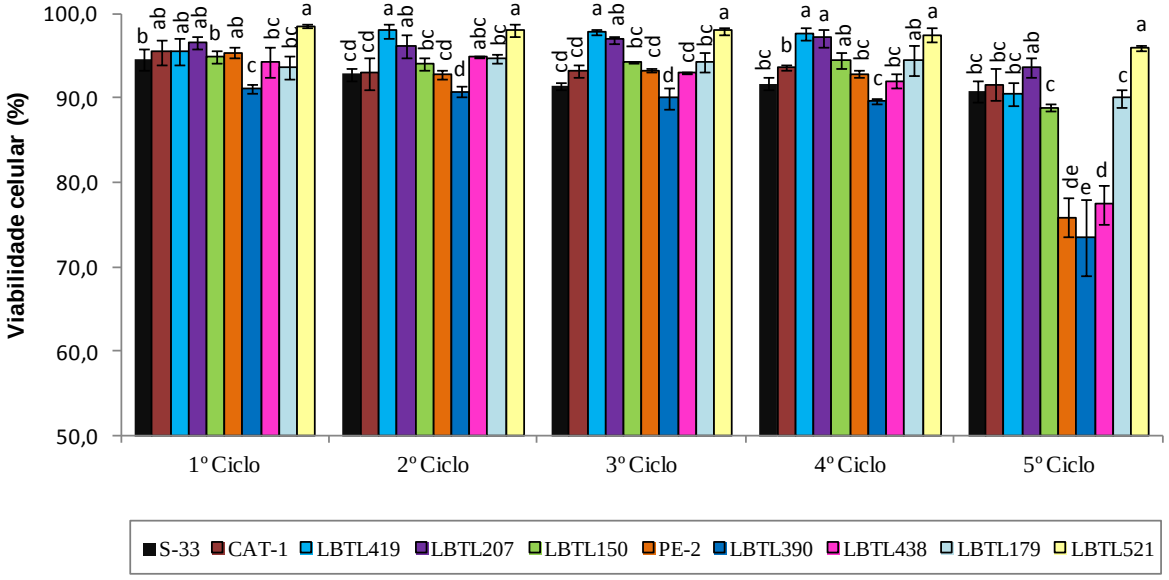


Figura 13 - Viabilidade celular (%) obtida após a fermentação no decorrer de cinco ciclos fermentativos para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Observou-se que até o quarto ciclo os parâmetros considerados (biomassa, viabilidade e etanol) na análise mantiveram-se relativamente constantes e bastante semelhantes entre si para as diferentes cepas, deixando incerta a seleção de algumas linhagens em detrimento de outras. Assim, no quinto ciclo, para acessar possíveis diferenças fisiológicas entre as cepas avaliadas, o mosto foi clarificado, removendo o material particulado em suspensão, como

forma de causar um estresse adicional às mesmas, além daqueles já ocasionados pela própria fermentação HG.

A clarificação do mosto para a condução da última fermentação teve efeito inibitório sobre as leveduras. Neste ciclo, percebe-se que as linhagens tiveram o crescimento restringido, no entanto com menor intensidade para as cepas CAT-1, LBTL419 e LBTL207, assim como para a referência S-33, mantendo-se com altas viabilidades (> 90%). As linhagens LBTL521 e LBTL150, embora afetadas quanto a esse parâmetro, não mostraram quedas relevantes na viabilidade celular, principalmente para a primeira cepa. Já as linhagens PE-2, LBTL390 e LBTL438 foram bastante comprometidas quanto à viabilidade, além de prejuízo ao crescimento nessa condição. O tempo de fermentação também se prolongou para todas as cepas, ao passo que foram necessárias 24 horas adicionais para finalizar a fermentação, que levava 72 horas até então.

Na literatura, há trabalhos que relatam sobre o efeito do material particulado (turbidez) do mosto sobre a levedura. Mostos com maior turbidez implicam em fermentações mais rápidas, o que pode estar associado a maior disponibilidade de ácidos graxos para a levedura no início da fermentação, além da maior turbidez favorecer a permanência da levedura em suspensão por mais tempo (KÜHBECK et al., 2006). Outra observação no trabalho de Siebert et al. (1986) é que o efeito protetor promovido pela presença de material particulado (trub, terra diatomácea) no mosto pode estar associado ao menor nível de CO_2 na fermentação, proporcionado pela presença do material particulado que promove nucleação e evolução das bolhas de gás no fermentador, reduzindo sua supersaturação e aliviando seu efeito inibitório, levando a maior crescimento e viabilidade da levedura.

A presença de material particulado insolúvel (alumina, areia do mar) no mosto tem mostrado melhora no desempenho fermentativo da levedura, o que parece não estar relacionado com o fornecimento de nutrientes, mas provavelmente com a redução do efeito inibitório do CO_2 (THOMAS et al., 1994).

Os teores observados de trealose (Figura 14), no quinto ciclo, foram variáveis para as diferentes cepas. As linhagens LBTL207 e LBTL419 apresentaram os maiores conteúdos, ficando significativamente acima da referência S-33. Em *S. cerevisiae*, o acúmulo desse carboidrato está relacionado com a manutenção da viabilidade celular e tolerância ao etanol e outros agentes estressantes (acidez, temperatura, pressão osmótica) durante a fermentação (MANSURE et al., 1997; BENAROUDJ et al., 2001; HERDEIRO et al., 2006).

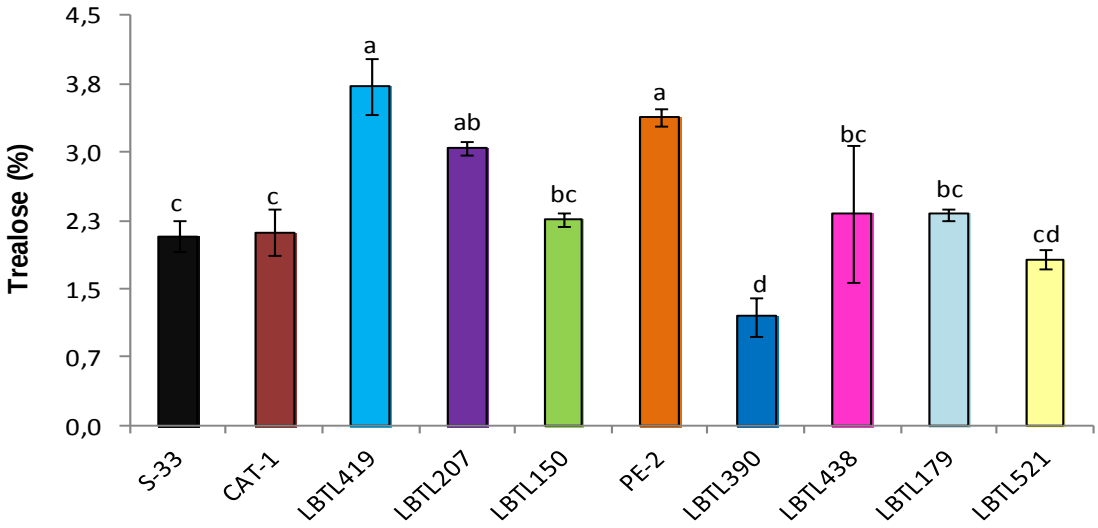


Figura 14 - Teores celulares de trealose (%, mg/100 mg de massa seca) para as diferentes linhagens ao final do último ciclo fermentativo. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais não diferem entre si significativamente (p > 0,05)

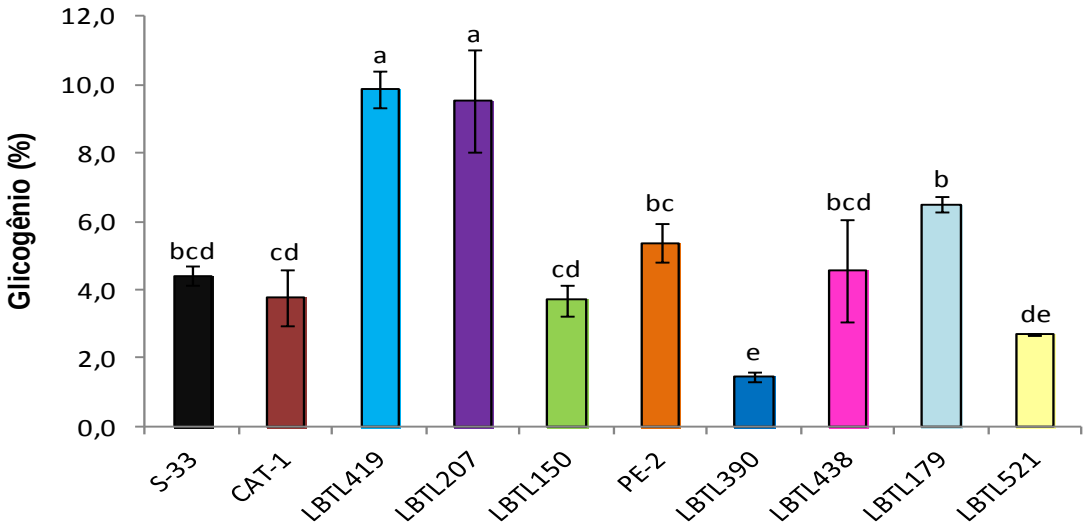


Figura 15 - Teores celulares de glicogênio (%, mg/100 mg de massa seca) para as diferentes linhagens ao final do último ciclo fermentativo. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais não diferem entre si significativamente (p > 0,05)

Tendência semelhante foi verificada em relação ao teor de glicogênio (Figura 15), com elevado acúmulo para as mesmas cepas. Ambas as reservas se relacionam com a maior resistência a fatores estressantes (FRANÇOIS; PARROU, 2001). Observação esta, corroborada em função da manutenção de elevada viabilidade celular por parte dessas linhagens no quinto ciclo.

Para a cepa LBTL390, ao contrário, cuja capacidade de acumular tanto trealose quanto glicogênio foi inferior em relação a todas as linhagens avaliadas, observou-se menor

percentual de viabilidade celular, apresentando maior fragilidade diante de uma condição mais severa. Para as linhagens CAT-1, LBTL150 e LBTL179 foram verificados percentuais de viabilidade e acúmulo de reservas semelhantes ao da referência S-33.

A linhagem LBTL521 foi capaz de manter alta viabilidade, a despeito de menor formação de biomassa e menor acúmulo de trealose e glicogênio no quinto ciclo. Os valores de viabilidade de diferentes linhagens de leveduras e seus respectivos níveis de trealose nem sempre mostram uma relação direta (GUTIERREZ, 1990; FURLAN, 2012), visto que o efeito protetor dessa molécula depende dela estar alocada em ambos os lados da membrana plasmática, executada por um transportador. Dessa forma, há linhagens que são ineficientes em fazer a disposição das moléculas de trealose na membrana adequadamente, e assim, mesmo acumulando essa reserva não conseguem sustentar sua viabilidade (ELEUTHERIO et al., 1993). Também o efeito protetor da trealose, no que tange a sua alocação na célula, parece ter estreita relação com o local de ação do agente estressante, ou seja, se ele atua no interior celular ou na membrana plasmática (HERDEIRO et al., 2006).

Nos processos fermentativos, a habilidade em acumular carboidratos de reserva é um importante critério para a seleção de linhagens de leveduras, principalmente por sua relação com a robustez e qualidade celular (FRANÇOIS; PARROU, 2001). Nos processos cervejeiros, a manutenção de elevada viabilidade, associada ao acúmulo de reservas é importante para o desempenho fermentativo com um todo, especialmente quando se pratica o reciclo celular, particularmente em condições de fermentação de alta densidade, cujo estresse osmótico e etanólico atuam mais intensamente sobre a levedura (LODOLO et al., 2008), como é o caso deste trabalho.

É comum durante a prática do reciclo nas cervejarias o armazenamento da levedura entre uma fermentação e outra. Nessa condição, o glicogênio fornece energia para a manutenção da biomassa (BRIGGS et al., 2004). Também, durante a fase lag da fermentação, a mobilização dessa reserva fornece carbono e energia, com as quais as células, juntamente com o oxigênio, sintetizam esteróis e ácidos graxos, importantes para a composição da membrana plasmática (BRIGGS et al., 2004; RUSSELL, 2006; GIBSON et al., 2007).

Em cervejas especiais, também se verifica com muita frequência, a realização da refermentação da bebida em garrafa para promover a carbonatação (VANDERHAEGEN et al., 2003). Nesse sentido, a viabilidade e o acúmulo de reservas apresentam grande importância, pois o ambiente da refermentação está longe de ser adequado ao desenvolvimento da levedura, em função do alto teor alcoólico, escassez de nutrientes e acidez (DEKONINCK et al., 2012).

Com relação à produção de etanol, os teores foram constantes no decorrer dos ciclos (Figura 16). Apenas para a cepa LBTL521, o percentual decaiu levemente no quinto ciclo. O perfil de fermentabilidade (Figura 17) das cepas se manteve ao longo dos reciclos, com exceção da LBTL521 e da LBTL438, que ficou um pouco comprometido no último ciclo, em razão do estresse ocasionado pela clarificação do mosto.

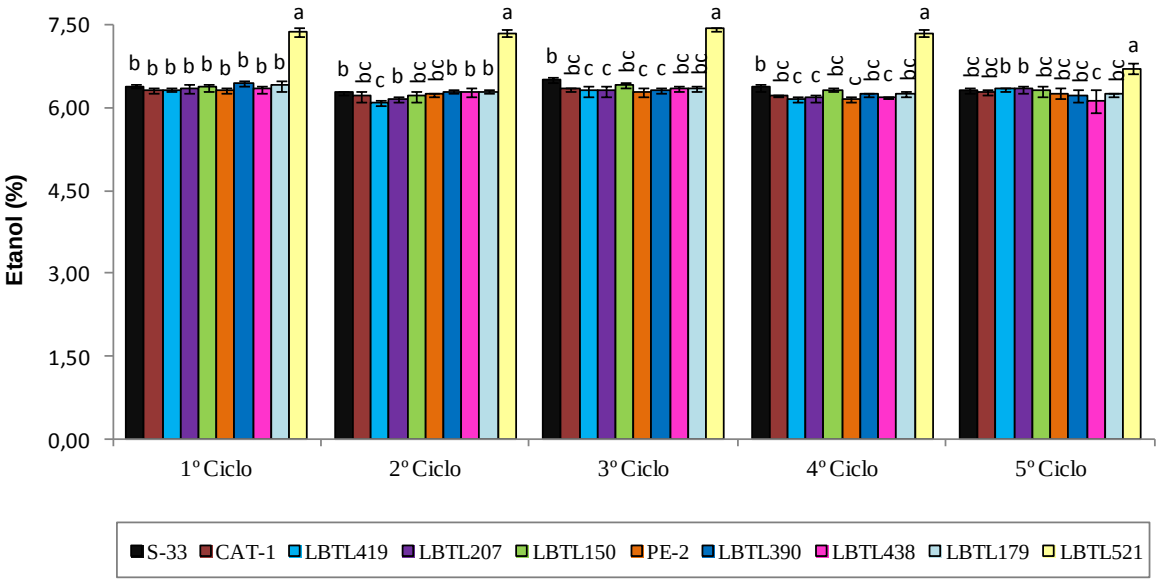


Figura 16 - Teor de etanol (%, v/v) obtido após a fermentação no decorrer de cinco ciclos fermentativos para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem entre si significativamente (p > 0,05)

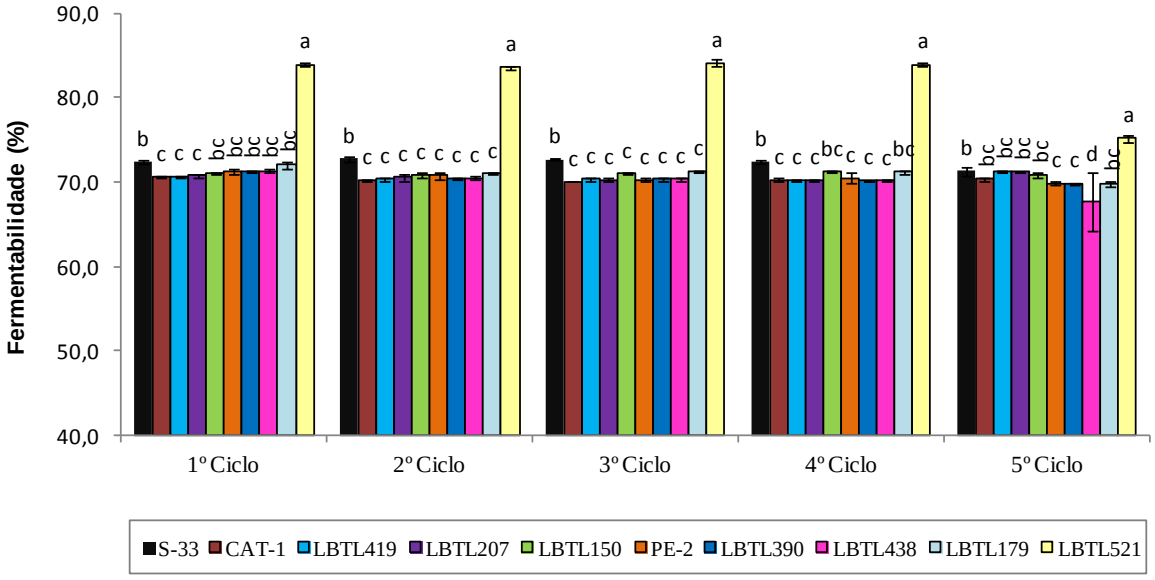


Figura 17 - Fermentabilidade (%) das diferentes linhagens no decorrer de cinco ciclos fermentativos para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC. Letras iguais dentro do mesmo ciclo não diferem entre si significativamente (p > 0,05)

Ao final do último reciclo também foi analisada a ocorrência de células *petite* para as leveduras avaliadas. A prática do reciclo celular nas fermentações cervejeiras, juntamente com as condições estressantes a que as leveduras são expostas no processo fermentativo, pode levar a queda na viabilidade e também ao envelhecimento celular e ocorrência de mutações mitocondriais, aumentando a proporção de mutantes *petite* na população (GIBSON et al., 2007; STEWART; RUSSELL, 2009). Gibson et al. (2008) verificaram que o envelhecimento pode levar a danos no DNA mitocondrial e aumentar a propensão das células de leveduras cervejeiras se tornarem deficientes respiratórios. O acúmulo de células *petite* pode resultar em efeitos prejudiciais à fermentação, como lentidão, maior teor de açúcares residuais, comprometimento da floculação e alterações danosas aos compostos aromáticos da cerveja (ERNANDES et al., 1993).

Na ocasião do último reciclo, não foi observada para nenhuma das leveduras avaliadas a ocorrência desses mutantes na população, verificada pela ausência de crescimento de colônias *petite* - que permaneceriam brancas após tratamento com TTC nas placas - mesmo para as cepas que apresentaram queda na viabilidade celular. Deve-se ponderar que, pela própria limitação metodológica, a ausência de crescimento não significa que não existam células *petite* na população celular, mas sim que elas estariam presentes em uma proporção bastante reduzida, possivelmente dentro da frequência normal de ocorrência que varia de 0,5 a 5% da população, como observado para leveduras cervejeiras (RUSSELL, 2006). Gibson et al. (2008) observaram que leveduras tolerantes podem ser menos propensas a gerar esses mutantes por ocasião dos reciclos. Essa tolerância foi verificada nas leveduras de bioetanol nas fermentações subsequentes do mosto HG, pois que foram aptas a sustentar elevada viabilidade no transcorrer dos reciclos, a exceção do último, cuja clarificação do mosto atribuiu maior estresse às leveduras. Gibson et al. (2008) e Trevisol et al. (2011) verificaram que cada cepa pode apresentar maior ou menor tendência de mutações mitocondriais, sendo essa característica dependente da linhagem. Os primeiros autores sugerem ainda que parece existir uma relação entre a sensibilidade ao estresse e o potencial de formar *petites*. Sendo verificado que, apesar da especificidade de cada cepa, a trealose é um importante fator na manutenção da longevidade celular e na prevenção de tais mutações (TREVISOL et al., 2011).

No terceiro ciclo, foi analisado o potencial de produção de compostos voláteis (Tabela 6) pelas linhagens com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre elas, que pudessem contribuir para a seleção das cepas para a elaboração das cervejas.

Tabela 6 - Compostos voláteis (mg/L) analisados no fermentado ao final do terceiro ciclo para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 16,3ºP na temperatura de 24ºC

	Compostos voláteis (mg/L)					
Linhagem	**Acetaldeído**	**Acetato de etila**	**1-propanol**	**Iso-butanol**	**Álcool isoamílico**	**Ácido acético**
S-33	158,88	22,63	27,00	45,50	144,13	77,25
CAT-1	20,88	19,00	23,75	61,75	173,00	66,00
LBTL207	51,00	21,38	29,75	37,13	132,88	61,50
LBTL419	22,63	15,25	24,25	30,88	118,38	59,88
LBTL150	41,75	17,88	23,75	51,63	168,63	61,88
PE-2	22,50	20,50	24,25	58,75	178,88	60,00
LBTL390	12,38	22,75	24,75	63,00	186,63	nd
LBTL438	31,50	22,75	26,63	70,00	168,63	58,75
LBTL179	135,00	17,63	22,63	52,88	174,00	61,00
LBTL521	21,13	30,88	31,38	52,50	196,88	60,13

A concentração dos compostos voláteis apresentou pouca variação entre as leveduras, exceto para o acetaldeído com quantidades elevadas para a referência S-33 e a para a LBTL179. Provavelmente, isso se deve ao fato da análise ter sido realizada nas amostras após a fermentação, ou seja, sem passar pela etapa de maturação, que é fundamental para aprimorar o sabor e o aroma da bebida (WILLAERT, 2006; BRIGGS et al., 2004). Nessa fase, os níveis de acetaldeído são reduzidos pela ação da levedura a teores aceitáveis, dentro do limiar de percepção que varia de 5 a 50 mg/L (BAMFORTH, 2000).

Os ésteres, assim como os alcoóis superiores, são compostos desejáveis em cervejas, especialmente para o estilo *ale*, contribuindo com sabores e aromas frutados (PIRES et al., 2014). A síntese de ésteres pelas linhagens em termos de acetato de etila ficou dentro do limiar de percepção de 20-40 mg/L (MEILGAARD, 1975), bem como para os alcoóis superiores 1-propanol e iso-butanol, com limiares de percepção, respectivamente, de 800 e 200 mg/L (MEILGAARD, 1975), com exceção do álcool isoamílico, produzido em maiores quantidades pelas linhagens, ficando acima do limiar de 70 mg/L (MEILGAARD, 1975). No entanto, para este composto são encontrados em cervejas valores que variam de 30 a 150 mg/L (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

O ácido acético é um produto oriundo do metabolismo da levedura (BAMFORTH, 2000), no entanto concentrações elevadas podem ser resultado de contaminação bacteriana (STEWART; RUSSELL, 2009). Para este composto, as cepas avaliadas produziram níveis

dentro do limiar de percepção (60 a 120 mg/L, WHITE; ZAINASHEFF, 2010) em cervejas. Pela análise de compostos voláteis não foi possível elencar diferenças que contribuíssem para a seleção de algumas cepas em detrimento de outras.

Para verificar a disposição das linhagens em relação aos parâmetros avaliados no quinto ciclo, realizou-se uma análise de componentes principais (ACP). Na análise observam-se as linhagens em relação às variáveis biomassa, etanol, viabilidade, trealose e glicogênio (Figura 18). Percebe-se que as cepas de levedura se reuniram em cinco grupos distintos com base nas 5 variáveis. A cepa LBTL521 se apresentou como um grupo isolado em função, principalmente, de maior capacidade de produção de etanol, além de manutenção de alta viabilidade.

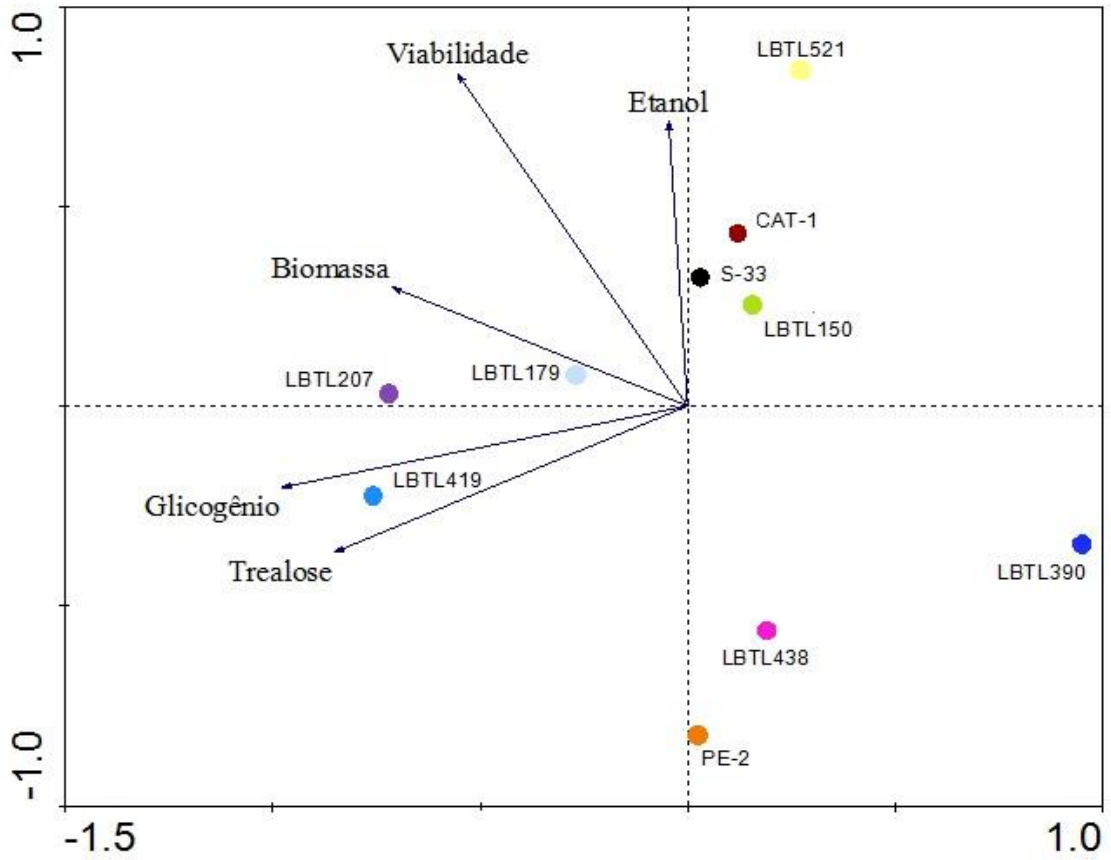


Figura 18 - Análise de componentes principais (ACP) mostrando a disposição das diferentes linhagens em função das variáveis biomassa, etanol, viabilidade celular, trealose e glicogênio, determinadas no quinto ciclo fermentativo

As cepas S-33, CAT-1 e LBTL150 se reuniram em um grupo que se caracteriza por desempenho satisfatório quanto aos parâmetros considerados, no entanto sem realce para uma ou outra variável.

As linhagens PE-2, LBTL390 e LBTL438 evidenciam outro grupo basicamente em razão de apresentar baixas viabilidades celulares e menor formação de biomassa. A levedura LBTL390 ainda se distancia um pouco das outras em consequência do baixo acúmulo de trealose e glicogênio.

Percebe-se a constituição de outro grupo composto pelas cepas LBTL419, LBTL207 e LBTL179, que se mostram com capacidade de acumular maiores de teores de reservas de trealose e glicogênio, principalmente as duas primeiras.

O quinto ciclo fermentativo possibilitou uma discriminação quanto às capacidades fisiológicas das diferentes linhagens em uma condição de estresse. Nesta, associaram-se os agentes da fermentação HG, pressão osmótica e etanol, à clarificação do mosto. Com a análise de ACP, foi possível realizar a seleção das linhagens com um embasamento nas diferenças observadas para cada grupo formado. Assim, ao menos uma linhagem de cada grupo foi selecionada (LBTL150, LBTL521, LBTL419, LBTL207 e LBTL438), que juntamente com a referência S-33, foram empregadas na etapa seguinte de avaliação.

Pode-se fazer um paralelo entre alguns pontos de semelhança existentes no processo cervejeiro e no processo de bioetanol que possivelmente possam ter contribuído, em partes, para a prospecção de linhagens com potencial fisiológico para a fermentação cervejeira HG. Na produção de bioetanol, é comum a utilização de mostos com concentração em torno de 18 a 22% (m/m) de açúcares (BASSO et al., 2011), e no processo cervejeiro HG fermenta-se mostos ao redor de 16 a 18% (m/m) (BRIGGS et al., 2004; STEWART; RUSSELL, 2009). Neste último, pode-se dizer que o estresse osmótico acaba sendo até mais intenso, em função do mosto ser fornecido em uma única porção a uma quantidade de inóculo relativamente pequena (5 g massa úmida/L) (BRIGGS et al., 2004), enquanto que no primeiro, o fornecimento é fracionado e distribuído a uma quantidade de inóculo relativamente maior (100 g massa úmida/L), minimizando tanto o impacto da pressão osmótica sobre a biomassa, como também o tempo em que a mesma permanece em contato com o substrato (BASSO et al., 2011).

No processo de bioetanol também é prática comum o reciclo celular que perdura ao longo da safra da cana-de-açúcar (200 a 250 dias), impondo condições estressantes continuamente à levedura, favorecendo, por vezes, a dominância de linhagens selvagens no processo com perfis de tolerância (BASSO et al., 2008). Ademais, entre cada ciclo fermentativo, realiza-se o tratamento ácido, ao qual a biomassa é exposta a um pH ácido (ao redor de 2,0) para minimizar a contaminação bacteriana (WHEALS et al., 1999). O reciclo também é praticado nos processos cervejeiros, assim como o tratamento ácido, no entanto

limitado a certo número de vezes (5 a 20), antes que o estado fisiológico da levedura possa comprometer a qualidade da bebida (BRIGGS et al., 2004; STEWART; RUSSELL, 2009).

Embora sejam processos diferentes, cada qual com suas peculiaridades, em ambos, os fatores de estresse atuantes sobre a levedura são bastante semelhantes. Assim, é possível que algumas leveduras tolerantes às condições impostas no processo alcooleiro também o sejam para o processo cervejeiro, tanto que os isolados LBTL207 e LBTL419, que se mostraram com os melhores atributos de tolerância (viabilidade, trealose e glicogênio) em fermentação com alto teor alcoólico para a produção de bioetanol em um trabalho prévio (FURLAN, 2012) também se destacaram no processo cervejeiro HG neste estudo.

5.6 Análises físico-químicas e sensorial

As cervejas foram elaboradas com as cepas selecionadas, e após fermentação e maturação foram envasadas em garrafas âmbar de 600 mL. Foram adicionados açúcar e levedura à cerveja no momento do envase visando a refermentação e carbonatação natural da bebida. As cervejas foram submetidas às análises físico-químicas e sensorial.

A cor e a turbidez são características que remetem aos aspectos visuais da bebida. As cervejas elaboradas com as diferentes cepas exibiram pouca variação em relação à cor (Figura 19), apresentando nuances entre o amarelo (7,5 a 12,0 EBC) e o dourado (12,5 a 15,0 EBC), caracterizando cervejas claras conforme a EBC (*European Brewery Convention*) (MORADO et al., 2009). Diferentes fatores podem ter contribuído para a variação de cor das cervejas obtidas. Sabe-se que esse parâmetro pode ser influenciado diretamente pelo tipo de malte usado no preparo do mosto, em função das melanoidinas que se formam pela reação dos açúcares com os aminoácidos na presença de calor (BOULTON; QUAIN, 2001). No entanto, não deve ser o caso para este estudo, já que utilizou-se um mosto primário padronizado para todos os casos. Tais variações também podem advir da oxidação de polifenóis ou taninos durante as etapas de processamento ou maturação (BAMFORTH, 2003). Por outro lado, algumas evidências sugerem que mudanças na coloração também podem ser oriundas da fermentação, especificamente da linhagem de levedura utilizada no processo (FIX, 2014).

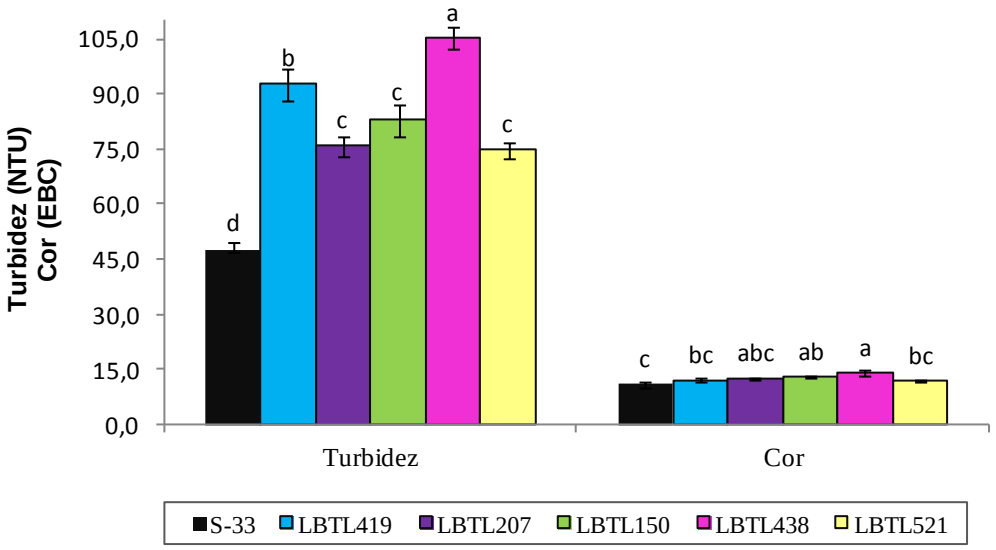


Figura 19 - Parâmetros de turbidez (NTU) e cor (EBC) das cervejas elaboradas com as diferentes linhagens. Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

As características de turbidez das cervejas encontram-se na Figura 19. As cervejas produzidas com as leveduras avaliadas mostraram-se relativamente mais turvas em comparação com a cepa controle. A cepa LBTL438 foi a que produziu maior turbidez (105,33 NTU), seguida da LBTL419 (92,67 NTU). Foi verificado visualmente, também para o controle, que as cervejas estavam menos turvas quando armazenadas à temperatura ambiente, e que esta turbidez veio a aumentar quando as mesmas foram submetidas à refrigeração. Sabe-se que o condicionamento a baixas temperaturas pode induzir a turbidez a frio em função da interação entre os polipeptídeos e polifenóis presentes (BAMFORTH, 2003; STEINER et al., 2011), e que outros fatores também podem levar a diferentes níveis de turvação na bebida como a cepa utilizada e o meio empregado na fermentação (DOUGLAS et al., 2006). É possível ainda que as leveduras avaliadas neste estudo sejam capazes de liberar maiores teores de proteínas relacionadas à turbidez, o que poderia ser um fator distintivo desses tipos de isolados (DOUGLAS et al., 2006).

Os valores de turbidez aqui observados apresentaram-se semelhantes ao obtidos no trabalho de Angeloni (2016) para cervejas artesanais do estilo *ale*, refermentadas em garrafa, e Olaniran et al. (2011) também observaram diferenças quanto à turbidez em cervejas elaboradas com diferentes cepas em condições artesanais e com refermentação.

Embora a turbidez em cervejas possa estar associada a um defeito na bebida, podendo relacionar-se a contaminações bacterianas e consequente deterioração da qualidade sensorial (STEWART; RUSSELL, 2009), pode-se descartar essa possibilidade nas cervejas aqui elaboradas, visto que os parâmetros indicativos de contaminantes, como elevadas

concentrações de ácido acético e alta acidez, apresentaram-se dentro dos limites encontrados em cervejas. Além disso, cervejas que passam por refermentação em garrafa também podem apresentar-se mais turvas devido à presença de levedura residual (KUIPER et al., 2002), o que reforçaria a tese de ser um fator intrínseco, já que se utilizaram as mesmas cepas para o processo de refermentação. Também deve-se considerar que cervejas especiais, produzidas de forma artesanal, não passam pela etapa de centrifugação e/ou filtração antes do envase, o que induz a redução da proporção de proteínas e polifenóis relacionados à formação de turbidez (KUIPER et al., 2002).

Meledina et al. (2015) também verificaram que a concentração de partículas coloidais na cerveja depende da linhagem usada na produção. No entanto, observaram que quanto mais precário for o estado fisiológico da levedura, menor é a sua adsorção aos compostos que induzem turbidez, assim mais substâncias permanecem em suspensão na cerveja, reduzindo sua estabilidade. No caso da cepa LBTL438, que mostrou-se vulnerável ao processo de clarificação (item 5.5), a refermentação em garrafa pode ter comprometido seu estado fisiológico, o que talvez tenha alguma relação com a turbidez encontrada. Sabe-se que a turbidez também pode associar-se ao extravasamento de carboidratos e proteínas do interior da célula para o meio em situações de estresse e também quando ocorre autólise celular (STEINER; BECKER; GASTL, 2010).

Contudo, a turbidez das cervejas produzidas com as cepas avaliadas parece estar mais relacionada a fatores físicos e ao processamento da bebida do que a fatores microbiológicos. No entanto, como diversos elementos podem relacionar-se à turbidez em cervejas (proteínas, polifenóis, polissacarídeos, matéria inorgânica, contaminantes, entre outros) (STEINER; BECKER; GASTL, 2010) as causas devem ser investigadas caso a caso, para se tirar quaisquer conclusões.

Com relação ao pH e à acidez total titulável, observaram-se diferenças entre as cervejas produzidas com as diferentes linhagens, variando de 4,56 a 4,63 e de 1,48 a 1,67 g/L, respectivamente (Figura 20). A cerveja é um produto ácido, sendo o pH da bebida amplamente dependente da fermentação. Normalmente, o pH situa-se numa faixa de 3,8 a 4,6 (BAMFORTH, 2003), sendo influenciado pela produção de ácidos orgânicos liberados pela levedura (STEWART; RUSSELL, 2009) e também pelo consumo dos peptídeos presentes no mosto que juntamente com as proteínas solúveis e polipeptídeos atuam como um sistema tampão sobre o mesmo (BAMFORTH, 2003).

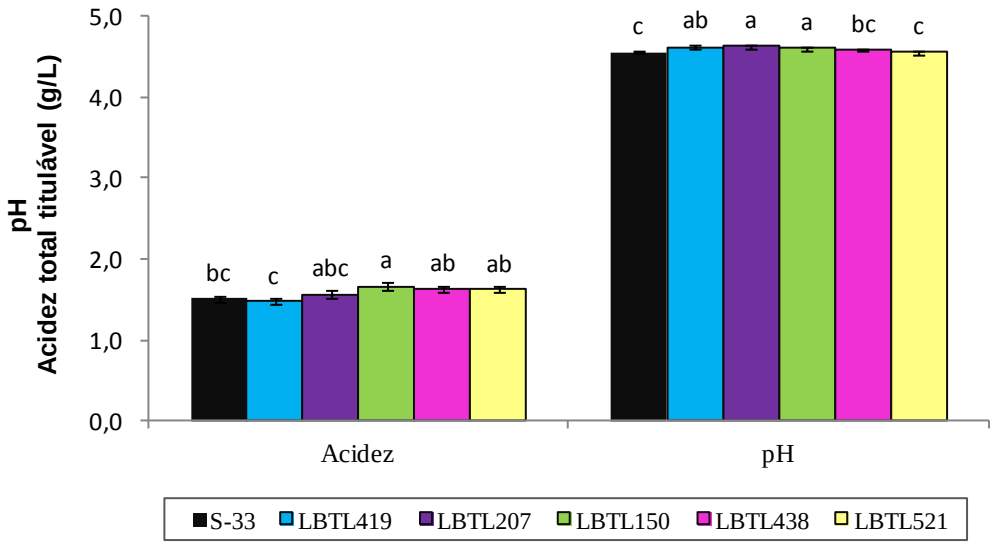


Figura 20 - Parâmetros de acidez total titulável (g H_2SO_4/L)) e pH das cervejas elaboradas com as diferentes linhagens. Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

De forma geral, pode-se assumir que quanto menor o pH, maior é a acidez titulável, ainda que não estejam diretamente correlacionados. A acidez titulável mede toda a concentração de H^+ do meio - tanto na forma dissociada como não dissociada – enquanto o pH está relacionado unicamente à forma dissociada dos ácidos. No ambiente fermentativo, os parâmetros de acidez e pH são influenciados essencialmente pela presença de ácidos orgânicos fracos sintetizados pela levedura (STEWART; RUSSELL, 2009). A acidez tem relevância no sentido da percepção sensorial do sabor ácido da bebida, o qual se relaciona com a presença dos ácidos orgânicos fracos tanto na forma dissociada como não dissociada (TAYLOR, 2015). Como a cerveja é um meio ácido, os ácidos fracos (piruvato, citrato, succinato, malato e acetato) encontram-se predominantemente no estado não dissociado (TAYLOR, 2015) basicamente em função de seus valores de pKa (ácido acético pK=4,76; ácido cítrico pK1=3,13 e pK2=4,76; ácido succínico pK1=4,21 e pK2=5,64; ácido málico pK1=3,14 e pK2=5,13) (DAWSON et al., 1969).

As cervejas aqui produzidas apresentaram-se com baixa acidez titulável, refletindo a assepsia do processo, verificada também pela concentração do ácido acético determinado na bebida (Figura 22b). Valores elevados de acidez titulável são observados em cervejas ácidas, do estilo "*sour beer*", variando de 4,4 a 18,7 g/L (TAYLOR, 2015). Nesse estilo, isso é desejável, e tal acidez advém também da atividade de outros microrganismos na bebida como bactérias e leveduras não *Saccharomyces* (ANGELONI, 2016).

Os valores obtidos para teor alcoólico e extrato aparente (Figura 21) apresentaram-se dentro do esperado em função do mosto de alta densidade empregado e do perfil de

fermentabilidade de cada linhagem, conforme comportamentos já observados nos experimentos anteriores. Assim, a cerveja elaborada com a cepa LBTL521 se destacou por maior teor alcoólico e menor extrato aparente, ao passo que as demais se apresentaram semelhantes à cerveja produzida com a cepa controle S-33 para esses parâmetros.

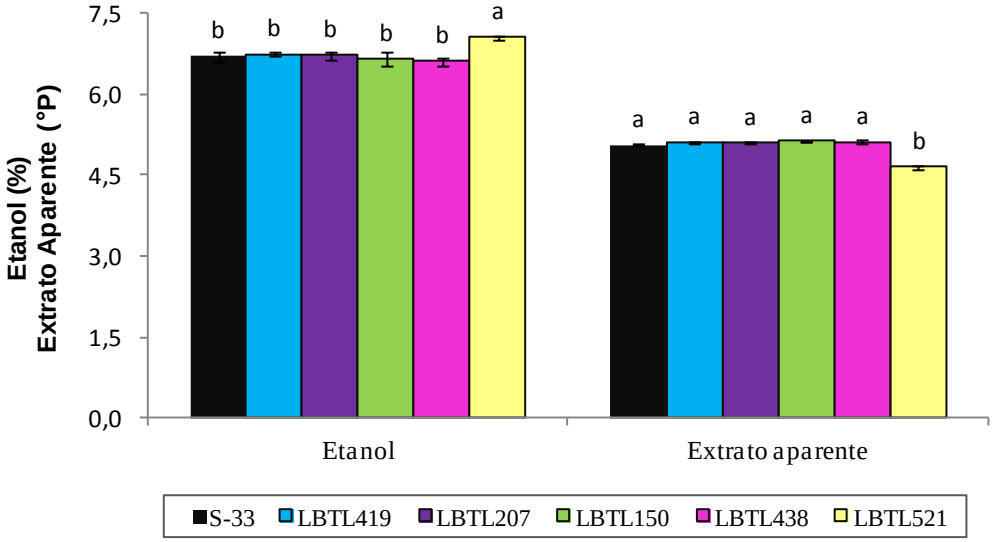


Figura 21 - Parâmetros de teor alcoólico (% v/v) e extrato aparente (°P) das cervejas elaboradas com as diferentes linhagens. Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Os compostos secundários presentes na cerveja têm relação direta com o aroma e o sabor da bebida, sendo, em grande parte, resultantes do metabolismo da levedura empregada na fermentação do mosto cervejeiro (BAMFORTH, 2000; LODOLO et al., 2008). A análise de compostos voláteis das diferentes cervejas se encontra na Figura 22.

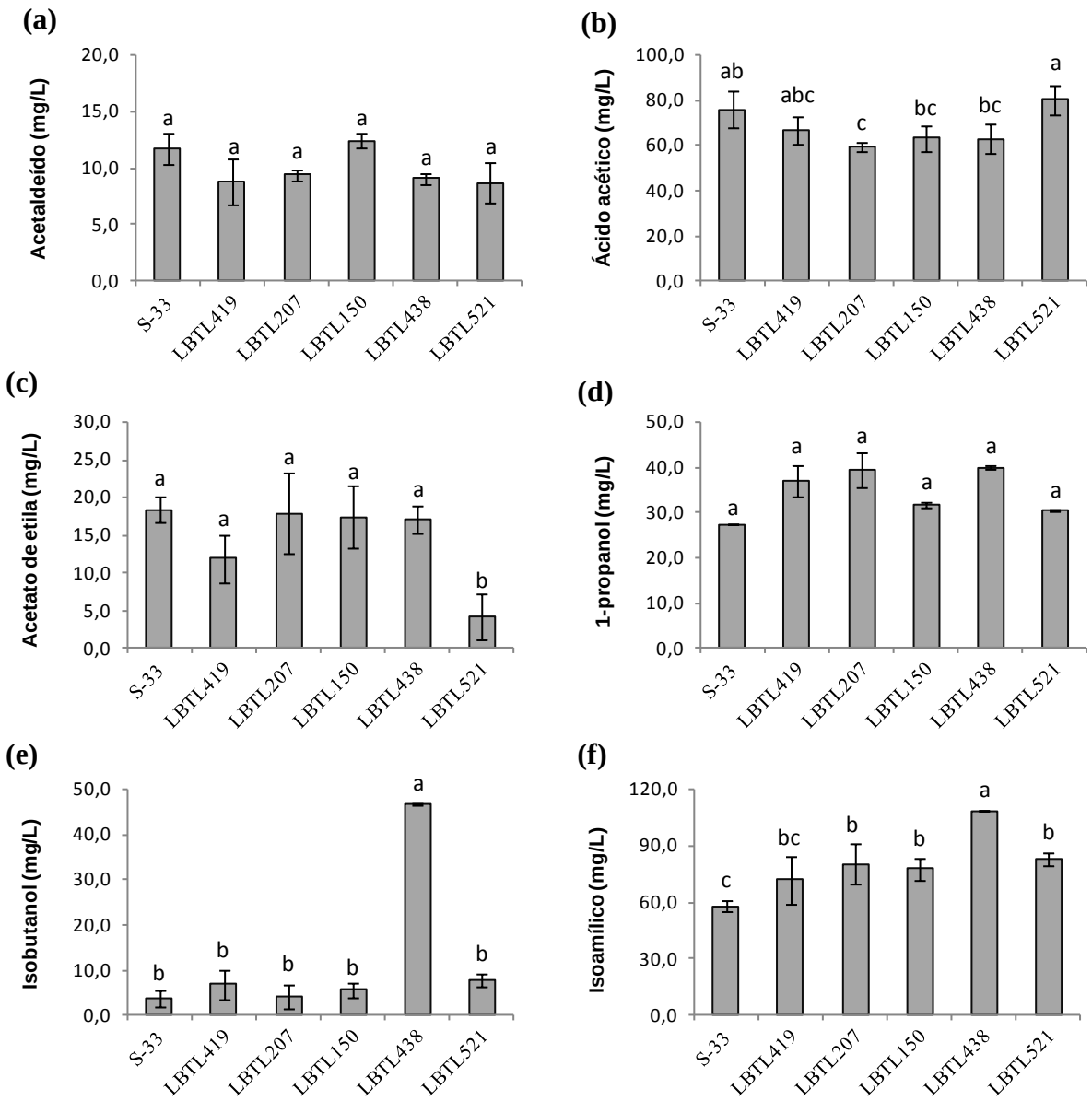


Figura 22 - Perfil de compostos voláteis (mg/L) das cervejas produzidas com as diferentes leveduras. Comparação das cervejas para as linhagens quanto ao: (a) acetaldeído; (b) ácido acético, (c) acetato de etila; (d) 1-propanol; (e) isobutanol; (f) isoamílico. Letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

As cervejas elaboradas com as cepas de bioetanol apresentaram concentrações de acetaldeído (Figura 22a) dentro do limiar de percepção, que se situa entre 10 a 20 mg/L (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Esse composto é o principal aldeído presente nas cervejas, e quando se encontra acima dos limites de percepção pode conferir aromas a maçã verde ou grama recém-cortada (BAMFORTH, 2000). Para isso, a fase de maturação é fundamental para o aprimoramento do sabor e aroma da bebida (STEWART; RUSSELL, 2009). Níveis elevados de acetaldeído normalmente remetem à condição fisiológica debilitada da cultura de levedura empregada na fermentação, pois a conversão deste composto a etanol acaba ficando

comprometida pela baixa produção de enzimas álcool desidrogenases, essenciais na catálise dessa reação (BOULTON; QUAIN, 2001).

A acidez elevada, como já mencionado, é desejável em alguns estilos particulares de cervejas, como as "*sour beers*" (MORADO, 2009; TAYLOR, 2015), no entanto em outros pode configurar defeitos sensoriais, resultantes da contaminação por microrganismos indesejáveis e associados a um produto de baixa qualidade. Para as cervejas aqui produzidas, o teor de ácido acético (Figura 22b) ficou abaixo do limiar de percepção (60-120 mg/L), sendo que para as cepas LBTL207, LBTL150 e LBTL438, as concentrações foram significativamente menores que para o controle (S-33). O sabor ácido é atribuído à bebida não apenas pelo acetato, mas também por uma série de ácidos orgânicos produzidos pela levedura como o piruvato, citrato, malato e succinato, que juntos contribuem também para a redução do pH ao longo da fermentação (LODOLO et al., 2008).

Os ésteres e os alcoóis superiores são os componentes que mais influenciam na qualidade da cerveja, pois agregam notas que remetem a frutas, flores, solvente e adocicado (PIRES et al., 2014). Dentre os ésteres, o acetato de etila pode conferir aromas que remetem a solvente e por isso não deve exceder certas concentrações. Para todas as cervejas, foram observados teores abaixo do limiar de percepção, com menores concentrações para a LBTL419 e LBTL521 (Figura 22c).

Os alcoóis superiores são os compostos organolépticos mais abundantes presentes em cervejas (STEWART; RUSSELL, 2009) e, além disso, estão envolvidos na formação de outros compostos secundários, como os ésteres, por exemplo (PEDDIE, 1990). O propanol, o isobutanol e o isoamílico são os principais alcoóis envolvidos no perfil sensorial de cervejas (PIRES et al., 2014). As concentrações de 1-propanol (Figura 22d) para as diferentes cervejas variaram de 27 a 40 mg/L, ficando bem abaixo do limiar de percepção de 800 mg/L (MEILGAARD, 1975). Os teores de isobutanol (Figura 22e) foram observados em teores significativamente maiores na cerveja elaborada com a LBTL438, enquanto que para as demais os níveis ficaram abaixo de 10 mg/L. O álcool isoamílico (Figura 22f) foi detectado em concentrações ligeiramente acima do limar de percepção (70 mg/L) (MEILGAARD, 1975) nas cervejas LBTL207, LBTL150 e LBTL52, ao passo que na LBTL438 os teores foram consideravelmente mais elevados (108 mg/L). O álcool isoamílico é um dos principais compostos aromáticos derivado da levedura, remetendo a impressões adocicadas no paladar e notas alcoólicas e a banana (PIRES et al., 2014). A presença de alcoóis superiores em concentrações próximas ou ligeiramente acima do limiar de percepção é desejável em

cervejas do estilo *ale*, pois agrega maior complexidade à bebida (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Como as cervejas foram elaboradas nas mesmas condições para todos os parâmetros de produção, as diferenças observadas podem ser atribuídas particularmente às linhagens de levedura. Isso evidencia a grande relevância da cepa que se emprega no processo e, além disso, permite direcionar-se à escolha daquelas que podem incorporar à cerveja as características que se deseja encontrar na bebida.

Com a análise sensorial das cervejas (Figura 23), foi possível elencar e quantificar os elementos de percepção relacionados aos aspectos visual, olfativo e gustativo das bebidas elaboradas com as diferentes linhagens de levedura.

No que se refere aos aspectos visuais (Figura 23 a1, a2), é possível verificar uma distinção das cervejas 207, 150, e principalmente da 438, em relação à coloração dourada/âmbar, ao passo que as demais tendem ao amarelo-palha. Para os aspectos da espuma, a amostra 521 mostrou-se com características distintivas e superiores quanto a formação e persistência quando comparada à controle. Quanto à turbidez evidenciaram-se diferenças apenas entre as cervejas produzidas com a S-33 e as cepas de bioetanol.

Com relação à fase olfativa (Figura 23 b1, b2), a maior variabilidade entre as amostras se dá em função da variável “especiarias” (responsável por 56,45% da variância observada – Anexo G), seguida das variáveis “levedura” e “cítrico”. O conjunto dessas três variáveis explica 94,95% da variabilidade existente entre os dados (Anexo G). As amostras 438, 207 e 150 se mostraram com maior complexidade olfativa, trazendo notas que remetem a especiarias, frutas passas, banana e caramelo, caracterizando uma bebida mais madura. Nessas amostras, pode-se dizer que há maior riqueza de características organolépticas, apresentando um *bouquet* mais complexo. Particularmente na amostra 438, pode-se observar um paralelismo entre os aromas e a maior concentração de alcoóis superiores, especialmente o isoamílico (Figura 22f), que está ligado a notas adocicadas e de banana na bebida (PIRES et al., 2014). Nas amostras S-33 e 521 verifica-se um perfil olfativo tendendo predominantemente a aromas primários, com notas cítricas, herbáceas e de frutas frescas – o mesmo também foi observado para a amostra 419, com menor intensidade, sendo fatores que associam-se a bebidas com maior perfil de frescor e jovialidade. As amostras 419 e 521 ainda trazem notas de especiarias em comparação com a controle S-33.

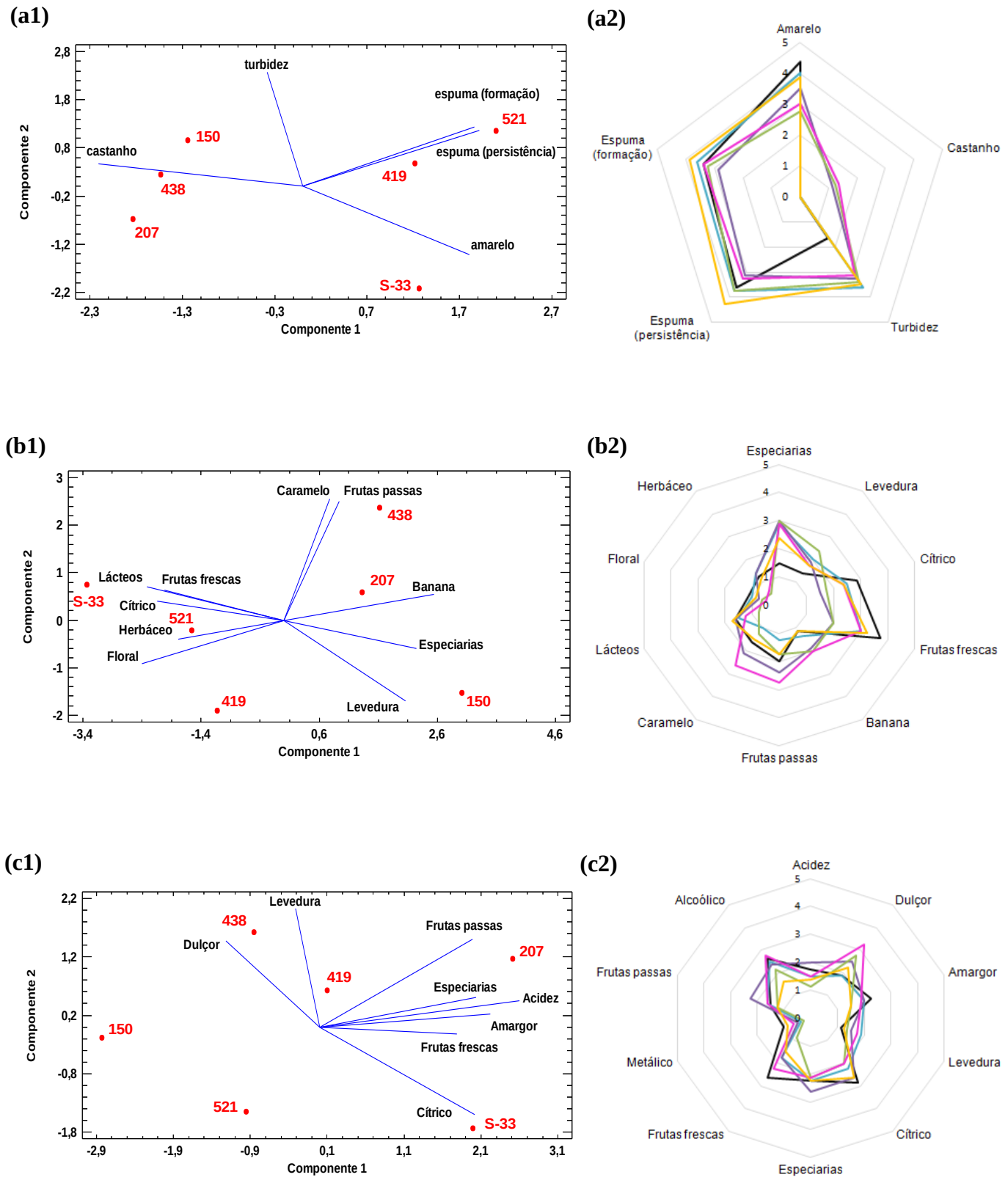


Figura 23 - Análise de componentes principais (ACP) das cervejas produzidas com as linhagens de leveduras para as diferentes fases da análise sensorial. Distribuição das amostras em relação aos descritores referentes às fases: (a1) visual, (b1) olfativa e (c1) gustativa. Perfil sensorial das cervejas nas fases: (a2) visual, (b2) olfativa e (c2) gustativa. As linhas coloridas se referem às amostras: S-33 (linha preta), 419 (linha azul), 207 (linha roxa), 150 (linha verde), 438 (linha rosa) e 521 (linha amarela)

Na fase gustativa (Figura 23 c1, c2), os descritores aromáticos “cítrico”, “especiarias”, “frutas frescas”, “frutas passas” têm pouco peso na variabilidade entre as amostras. No entanto, tiveram maior influência na distinção das amostras as variáveis primárias do gosto (dulçor, acidez e amargor), sendo responsáveis por 89,58% da variância encontrada (Anexo G). Para a amostra 207 percebe-se complexidade similar à fase olfativa, com destaque para as notas a frutas passas, especiarias e também para as características de acidez. A amostra 438 também denota atributos de dulçor, apresentando a mesma tendência olfativa, com descritores a “caramelo” e “frutas passas”. A amostra 150 apresentou menor complexidade gustativa e exibiu um perfil mais adocicado ao paladar. As amostras S-33 e 521 caracterizaram-se predominantemente por notas cítricas, assemelhando-se à tendência olfativa.

As linhagens 207, 150 e 438 confeririam maior complexidade organoléptica à bebida, conferindo aromas secundários mais complexos, com predominância de descritores a “especiarias” e “frutas passas”. Tais atributos são de interesse e poderiam ser explorados em estilos de cerveja de trigo alemãs (*Weizen/Weissbier*), nas quais predominam os aromas e sabores a especiarias, como o cravo, e frutados, como de banana, que são provenientes da cepa utilizada na fermentação. Também em cervejas mais fortes, com maior complexidade sensorial, que empregam maltes especiais, como as *Weizenbock*, nas quais os aromas de frutas passas são intensos, combinados com notas de especiarias. Poderiam também ter aplicação na produção de estilos tradicionais belgas, como a *Dubbel*, com aromas e sabores complexos, que seguem essa mesma linha, e como a *Belgian Dark Strong Ale*, também com aromas que remetem a frutas passas, adocicados e condimentados (BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM - BJCP, 2008).

Já as linhagens 521 e 419 apresentaram um perfil mais aproximado ao da cepa cervejeira S-33, no que se refere às notas cítricas e a frutas frescas, porém com a particularidade de incorporar também descritores mais complexos como a “especiarias”. Essas características poderiam ser exploradas para a elaboração de estilos que aliam notas cítricas e de frutas com lúpulos que também trazem essa tendência de frescor à bebida. A exemplo, tem-se as cervejas do estilo *Witbier*, nas quais encontram-se aromas frutados, cítricos, com nuances de especiarias e herbáceos; com características de sabor seguindo a mesma tendência, com leve dulçor. As do estilo belga *Saison*, que, da mesma forma, remetem a um perfil aromático frutado e cítrico, com alguma referência a especiarias; e também as cervejas de trigo americanas (*American Wheat*) nas quais se combinam lúpulos de caráter cítrico e aromas frutados que incorporam notável refrescância à bebida (BJCP, 2008).

Para as cervejarias que seguem a Lei de Pureza Alemã, que diz que os únicos ingredientes permitidos para a produção de cerveja são água, malte, lúpulo e levedura (MORADO, 2009), as características organolépticas trazidas pelas cepas de bioetanol à bebida se tornam muito interessantes, já que não se pode fazer uso, por exemplo, de frutas e condimentos para enriquecer sensorialmente a bebida.

No mesmo sentido, essa influência da levedura se alia fortemente ao conceito de "*bioflavouring"*, no qual se preconiza a contribuição de sabores aos produtos por vias biológicas, ou seja, usando-se de organismos que possam contribuir com um aprimoramento sensorial, trazendo ou acentuando atributos desejáveis sem uso de aditivos químicos (VANDERHAEGEN et al., 2003). Nesse sentido, a levedura pode ser o elemento-chave para a obtenção de um produto único e original. Da mesma forma, podem ser mais exploradas quanto à refermentação em garrafa, mais do que simples produtoras de CO_2 e etanol, mas também para o aperfeiçoamento do sabor e aroma.

Quase sem exceção, a linhagem de levedura utilizada para a produção de determinado tipo de cerveja é um componente essencial único. Muitas cepas de leveduras cervejeiras foram selecionadas acidentalmente como sendo apropriadas para um estilo de cerveja particular, levando em conta propriedades como características de floculação, temperaturas de crescimento, tolerância ao etanol. Com grande importância, encontra-se a influência crucial da linhagem no desenvolvimento dos constituintes de sabor e aroma (BOULTON; QUAIN, 2001), podendo contribuir com diferenças significativas no perfil sensorial da bebida (PARKER et al., 2015). Isso tem grande relevância frente a crescente demanda por cervejas especiais, o que abre portas para inovações no processo.

A versatilidade fisiológica encontrada dentro da espécie *S. cerevisiae* possibilita utilizá-las nos mais variados processos fermentativos, pois o ambiente a que ela é submetida é o principal fator que exerce influência sobre seu comportamento, seguido pelo fator genético e por último pela interação entre os dois (ALBERTIN et al., 2011). Tanto é que linhagens isoladas de diversas fontes tem se mostrado com potencial para o processo cervejeiro (ARAÚJO, 2013; LENTZ et al., 2014; CANONICO et al., 2014; MARONGIU et al., 2015).

A seleção de linhagens de leveduras para processos biológicos de interesse industrial pode ser realizada a partir de numerosas estratégias. Uma delas é através da prospecção da biodiversidade natural existente nos mais variados ambientes (STEENSELS et al., 2014). Nessa perspectiva, o ambiente de processos produtivos de bioetanol se mostrou como uma fonte preciosa de biodiversidade, até então não explorada, para os processos cervejeiros, destacando linhagens com potencial para a elaboração de produtos diferenciados, com

peculiaridades de sabor e aroma. Tais linhagens se mostraram apropriadas para a fermentação cervejeira HG, tornando possível a introdução de leveduras brasileiras nos processos de produção de cerveja, o que possibilita a criação de bebidas com caráter regional, aliando-se ao conceito de personalização das cervejas especiais, assim com as cervejas belgas o são, especialmente em função de suas leveduras.

6 CONCLUSÕES

O ambiente de processos brasileiros de bioetanol é uma fonte viável de prospecção de linhagens de *S. cerevisiae* que podem contribuir com atributos fisiológicos de interesse para o processo cervejeiro. As similaridades existentes entre ambos quanto às condições de estresse podem ter sido um elemento significativo para a seleção de cepas com perfil de tolerância à fermentação cervejeira com mosto de alta densidade. A prospecção de linhagens, tendo como base um estudo prévio que destacou cepas tolerantes à fermentação com alto teor alcoólico para a produção de bioetanol, mostrou-se apropriada para a seleção de cepas com perfis de tolerância à fermentação cervejeira HG.

Os resultados mostraram que algumas linhagens isoladas de processo de produção de bioetanol têm potencial para conduzir fermentações cervejeiras, suportando também as condições de reciclo celular, com grande perfil de tolerância e também pela versatilidade metabólica.

As cepas LBTL419 e LBTL207 apresentaram atributos particulares de tolerância, mantendo elevada viabilidade e com destacado perfil de acúmulo de trealose e glicogênio.

A estratégia de seleção a partir da avaliação de aspectos fisiológicos das leveduras culminou com a possibilidade de seleção de algumas cepas que trouxeram atributos sensoriais positivos e de interesse para a produção de diferentes estilos de cerveja.

As linhagens selecionadas neste estudo apresentaram potencial para a produção de cerveja especial, agregando características organolépticas destacáveis e proeminentes nas cervejas obtidas. As cepas LBTL419 e LBTL521 deram origem a cervejas com descritores de frutas frescas e especiarias, apresentado aplicação em cervejas com caráter fresco e jovial. As cepas LBTL207, LBTL150 e LBTL438, por outro lado, proporcionaram notas a frutas passas, banana e especiarias, mostrando-se com potencial para a produção de cervejas com um *bouquet* mais complexo.

Os resultados aqui apresentados levam a crer que tais linhagens podem contribuir para a produção de cervejas especiais diferenciadas, com peculiaridades de sabor e aroma. Seu potencial fisiológico associado à aplicação tecnológica abre portas para a utilização de

leveduras brasileiras nos processos cervejeiros, podendo ampliar a gama de leveduras disponíveis para a produção de cerveja no Brasil. Linhagens tipicamente nacionais favoreceriam a diminuição da dependência externa, diante das leveduras importadas, e a regionalização do produto, característica que se aliaria ao conceito de personalidade das cervejas especiais.

7 POSSIBILIDADES DE ESTUDOS FUTUROS

- Estudar a cinética de metabolização dos açúcares do mosto por estas leveduras e a mobilização das reservas de trealose e glicogênio ao longo da fermentação, buscando conhecer as especificidades fisiológicas de cada cepa.

- Avaliar as linhagens que mostraram atributos de tolerância em fermentação HG quanto ao desempenho fermentativo em processos VHG, nos quais se empregam mostos com concentração acima de 18°P.

- Avaliar as leveduras em outras condições de processo variando a temperatura, a taxa de inoculação e a formulação do mosto para verificar como tais influenciam no desempenho fermentativo e na produção de compostos voláteis.

- Avaliar as leveduras em mostos de alta densidade que empregam adjuntos em sua composição, os quais tornam as condições mais estressantes em função da menor disponibilidade de compostos nitrogenados, pois são matérias-primas que contribuem para o aumento do teor de açúcares do mosto, porém são pobres em nutrientes.

- Avaliar as leveduras quanto à refermentação em garrafa, buscando estudar como esse processo impacta em sua fisiologia e que contribuições em termos de compostos aromáticos elas podem agregar à cerveja nessa fase.

REFERÊNCIAS

ALBERTIN, W.; MARULLO, P.; AIGLE, M.; DILLMANN, C.; DE VIENNE, D.; BELY, M.; SICARD, D. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 8, p. 2772-2784, 2011.

AN, M.Z.; TANG, Y.Q.; MITSUMASU, K.; LIU, Z.S.; SHIGERU, M.; KENJI, K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, p. 1367-1374, 2011.

ANDRÉS-IGLESIAS, C.; MONTERO, O.; SANCHO, D.; A BLANCO, C. New trends in beer flavour compound analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 95, n. 8, p. 1571-1576, 2015.

ANGELONI, L.H.P. **Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos**. 2016. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD^+ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2179-2187, 1997.

ARANHA, C. Com o copo cheio. **Exame PME,** 04 set. 2014. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/revista-exame-pme/edicoes/76/noticias/com-o-copo-cheio> Acesso em: 03 fev. 2015.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **O setor cervejeiro é um dos que mais empregam no Brasil.** 2014. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/2014/10/o-setor-de-cerveja-e-um-dos-que-mais-empregam-pais/>. Acesso em: 07 jan. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. **Categorias de mercado:** fermentados – cerveja. 2014. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/categorias/>. Acesso em: 05 fev. 2015.

ASSOCIAÇÃO DOS FABRICANTES DE REFRIGERANTES DO BRASIL. **Cerveja:** dados do setor. 2013. Disponível em: <http://afrebras.org.br/setor/cerveja/dados-do-setor/>. Acesso em: 06 fev. 2015.

ATTFIELD, P.V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 1/2, p. 259-263, 1987.

_____. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker´s yeast. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BAMFORTH, C.W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. **The Chemical Educator**, Meridian, v. 5, p. 102-112, 2000.

_____. **Beer:** tap into the art and science of brewing. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2003. 246 p.

BAMFORTH, C.W.; KANAUCHI, M. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer´s yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 110, n. 2, p. 83-93, 2004.

BANAT, I.M., NIGAM, P., SINGH, D., MARCHANT, R., McHALE, A.P. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I. Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 1208-1216, 2009.

BARCHET, R. Hot trub: formation and removal. **Brewing Techniques**, Cottage Grove, v. 1, n. 4, 1993. Disponível em: <http://morebeer.com/brewingtechniques/library/backissues/issue1.4/index.html> Acesso em: 13 maio 2015.

BARNETT, J.A.; ENTIAN, K.D. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. **Yeast**, Davis, v. 22, n. 11, p. 835-894, 2005.

BARTH-HASS GROUP. **Beer production:** market leaders and their challengers in the top 40 countries in 2012. Disponível em: <http://www.barthhaasgroup.com/johbarth/images/pdfs/report2013/Barth_Beilage_2013.pdf> . Acesso em: 03 jun. 2013.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: DOS SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel production:** recent developments and prospects. Croatia: INTECH, 2011. chap. 5, p. 85-100.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BECKER, V.J. A method for glycogen determination in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 86, n. 1, p. 56-64, 1978.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. **Diretrizes de estilo para cerveja.** 2008. Disponível em: <http://www.bjcp.org/intl/2008styles-PT.pdf>. Acesso em: 03 maio 2016.

BENAROUDJ, N.; LEE, D.H.; GOLDBERG, A.L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 26, p. 24261-24267, 2001.

BLIECK, L.; TOYE, G.; DUMORTIER, F.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.R.; THEVELEIN, J.M.; VAN DIJCK, P. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 815-824, 2007.

BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Oxford: Blackwell Science, 2001. 638 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, 09 set. 2005.

_____. **Crescimento da renda aumenta demanda por alimentos no Brasil**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2013/10/crescimento-da-renda-aumenta-demanda-por-alimentos-no-brasil>. Acesso em: 06 fev. 2015.

BREWERS ASSOCIATION. **Number of breweries**. 2015. Disponível em: <http://www.brewersassociation.org/statistics/number-of-breweries/>. Acesso em: 03 fev. 2016.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A.; STEVENS, R. **Brewing:** science and practice. Cambridge: Woodhead Publ., 2004. 848 p.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. **Jounal of the Institute of Brewing**, London, v. 120, n. 3, p. 262-267, 2014.

CERVIERI JR., O.; TEIXEIRA JR, J.R.; GALINARI, R.; RAWET, E.L.; SILVEIRA, C.T.J. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 40, p. 93-129, 2014. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/3462>. Acesso em: 03 fev 2015.

CHEN, Y.; YANG, X.; ZHANG, S.; WANG, X.; GUO, C.; GUO, X.; XIAO, D. Development of *Saccharomyces cerevisiae* producing higher levels of sulfur dioxide and glutathione to improve beer flavor stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, n. 2, p. 402-413, 2012.

CHIAVARI, C.; ZAMBONELLI, C.; BENEVELLI, M.; CAGGIA, C.; TIVI, V. Structure of foam and film forming cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 50, p. 167-176, 2000.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. **Data for biochemical research**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1969. 654 p.

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000.

DEKONINCK, T.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. Bottle conditioning of beer: strategies to improve yeast refermentation performance. In: WORLD BREWING CONGRESS, 2012, Portland. **Proceedings…** Portland, 2012. Disponível em: <http://www.mbaa.com/meetings/archive/2012/Proceedings/pages/48.aspx>. Acesso em: 15 jan. 2016.

D'HAUTCOURT, O.; SMART, K.A. Measurement of brewing yeast flocculation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Davis, v. 57, n. 4, p. 123-128, 1999.

DICKINSON, J.R.; SALGADO, L.E.J.; HEWLINS, M.J.E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 10, p. 8028-8034, 2003.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J.B. de. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v. 1, cap. 2, p. 15-48.

EDELEN, C.L.; MILLER, J.L.; PATINO, H. Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. **Technical Quarterly – Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v. 33, n. 1, p. 30-32, 1996.

EDEN, A.; VAN NEDERVELDE, L.; DRUKKER, M.; BENVENISTY, N.; DEBOURG, A. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, n. 3, p. 296-300, 2001.

ELEUTHERIO, E.C.A.; ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1156, n. 3, p. 263-266, 1993.

ELMACI, S.B.; ÖZÇELIK, F.; TOKATLI, M. ÇAKIR, I. Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 105, n. 5, p. 835-847, 2014.

ERNANDES, J.R.; WILLIAMS, J.W.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Respiratory deficiency in brewing yeast strains: effects on fermentation, flocculation, and beer flavor components. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Davis, v. 51, p. 16-20, 1993.

ERTEN, H.; TANGULER, H.; CABAROGLU, T.; CANBAS, A. The influence of inoculum level on fermentation and flavour compounds of white wines made from cv. Emir. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 3, p. 232-236, 2006.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, 2000.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. **Analytica-EBC**: method 8.5; revised Oct. 2000. London: Elsevier, 1963. 78 p.

FERMENTIS. **Product range**. 2015. Disponível em: <http://www.fermentis.com/brewing/homebrewing/product-range/>. Acesso em: 12 abr. 2016.

FIX, G. **Beer colors.** 2014. Disponível em: <http://beerrecipes.org/beercolor.php#sthash.VEKXDTvn.dpbs>. Acesso em: 26 abr. 2016.

FLARYS, F. **Mercado de cervejas premium no Brasil está em franca fermentação.** 2014. Disponível em: <http://g1.globo.com/rj/regiao-serrana/noticia/2014/04/mercado-de-cervejas-premium-no-brasil-esta-em-franca-fermentacao.html>. Acesso em: 22 abr. 2016.

FRANÇOIS, J.; PARROU, J.L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 125-145, 2001.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 910-915, 1997.

FURLAN, R.M.C. **Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GARCÍA, M.; GREETHAM, D.; WIMALASENA, T.T.; PHISTER, T.G.; CABELLOS, J.M.; ARROYO, T. The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v. 120, 2016. doi:10.1111/jam.13139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26999790>. Acesso em: 16 abr. 2016.

GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, Davis, v. 32, n. 1, p. 17-27, 2015.

GIBSON, B.R.; PRESCOTT, K.A.; SMART, K.A. Petite mutation in aged and oxidatively stressed ale and lager brewing yeast. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 636-642, 2008.

GIBSON, B.R.; STORGARDS, E.; KROGERUS, K.; VIDGREN, V. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Frohberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. **Yeast**, Davis, v. 30, n. 7, p. 255-266, 2013.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.R.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 535-569, 2007.

GOLDAMMER, T. **The brewer´s handbook:** the complete book to brewing beer. 2nd ed. Clifton: Apex Publ., 2008. 496 p.

GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 47, p. 597-608, 1990.

HAMMOND, J.R.M. Yeast genetics. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. (Ed.). **Brewing microbiology**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1996. chap. 3, p. 43-82.

HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; VAN MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2259-2266, 2008.

HERDEIRO, R.S.; PEREIRA, M.D.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1760, p. 340-346, 2006.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current Genetics**, New York, v. 59, n. 1, p. 1-31, 2013.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V.; LIMA, L.; MULDER, L.; GEURTS, W.; WALSH, M.; LONDESBOROUGH, J. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1563-1573, 2010.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 125, n. 2, p. 670-678, 1976.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **11035:** sensory analysis: identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach. Geneva, 1994. 26 p.

JONES, R.P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 11, p. 130-153, 1989.

KIRIN BEER UNIVERSITY. **Global beer production by country in 2014:** report. 2015. Disponível em: <http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/0810_01.html>. Acesso em: 18 jan. 2016.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 103, n. 5, p. 451-456, 2007.

KOLJONEN, T.; HÄMÄLÄINEN, J.J.; SJÖHOLM, K.; PIETILÄ, K. A model for the prediction of fermentable sugar concentrations during mashing. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 26, n. 3, p. 329-350, 1995.

KROGERUS, K.; GIBSON, B.R. 125th anniversary review: diacetyl and its control during brewery fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 119, n. 3, p. 86-97, 2013a.

KROGERUS, K.; GIBSON, B.R. Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer´s wort. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 15, p. 6919-6930, 2013b.

KÜHBECK, F.; BACK, W.; KROTTENTHALER, M. Influence of lauter turbidity on wort composition, fermentation performance and beer quality – a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 3, p. 215-221, 2006.

_____. Particle size distribution in wort during large scale brewhouse operations. **AIChE Journal**, New York, v. 53, n. 5, p. 1373-1388, 2007.

KUIPER, S.; VAN RIJN, C.; NIJDAM, W.; RASPE, O.; VAN WOLFEREN, H.; KRIJNEN, G.; ELWENSPOEK, M. Filtration of lager beer with microsieves: flux, permeate haze and in-line microscope observations. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 196, n. 2, p. 159-170, 2002.

LANDAUD, S.; HELINCK, S.; BONNARME, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 1191-1205, 2008.

LANDAUD, S.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 107, n. 2, p. 107-117, 2001.

LEI, H.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer’s yeast. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 77, p. 1-6, 2013.

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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, n. 6, p. 1562-1574, 2012.

LENTZ, M.; PUTZKE, T.; HESSLER, R.; LUMAN, E. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 120, n. 4, p. 559-564, 2014.

LIE, S. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 79, n. 1, p. 37-41, 1973.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 65, p. 85-98, 1998.

LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.F.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1018-1036.

LONDESBOROUGH, J.; VUORIO, O. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from bakers' yeast: purification of a proteolytically activated form. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 2, p. 323-330, 1991.

LU, J.; DONG, J.; WU, D.; CHEN, Y.; GUO, X.; SHI, Y.; SUN, X.; XIAO, D. Construction of recombinant industrial brewer´s yeast with lower diacetyl production and proteinase A activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 235, n. 5, p. 951-961, 2012.

MACHADO, J.G.C.F.; TAKITANE, I.C. Marketing de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Indústria de bebidas**: inovação, gestão e produção. São Paulo: Edgard Blucher, 2011. v. 3, cap. 13, p. 255-291.

MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 12, p. 1201-1203, 1997.

MARONGIU, A.; ZARA, G.; LEGRAS, J.; DEL CARO, A.; MASCIA, I.; FADDA, C.; BUDRONI, M. Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 42, n. 1, p. 85-92, 2015.

MELEDINA, T.V.; DAVYDENKO, S.G.; DEDEGKAEV, A.T. Yeast physiological state influence on beer turbidity. **Agronomy Research**, Tartu, v. 13, n. 4, p. 992-1001, 2015.

MENESES, F.J.; HENSCHKE, P.A.; JIRANEK, V. A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilization. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, n. 3, p. 310-321, 2002.

MONOSÍK, R.; MAGDOLEN, P.; STREDANSKÝ, M.; STURDÍK, E. Monitoring of monosaccharides, oligosaccharides, ethanol and glycerol during wort fermentation by biosensors, HPLC and spectrophotometry. **Food Chemistry**, London, v. 138, p. 220-226, 2013.

MONTANARI, L.; FLORIDI, S.; MARCONI, O.; TIRONZELLI, M.; FANTOZZI, P. Effect of mashing procedures on brewing. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 175-179, 2005.

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

MOSEDALE, J.R.; FORD, A. Variation of the flavor and extractives of European oak wood from two French forests. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 70, n. 3, p. 273-287, 1996.

NAGAI, S. Induction of the respiration-deficient mutation in yeast by various synthetic dyes. **Science**, Washington, v. 130, n. 3383, p. 1188-1189, 1959.

NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N.; NAGAI, H. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. **Bacteriology Reviews**, Washington, v. 25, n. 4, p. 404-426, 1961.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 83, n. 1, p. 30-31, 1977.

OLANIRAN, A.O.; MAHARAJ, Y.R.; PILLAY, B. Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. **Electronic Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2011.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. 89 p.

ONO, B.; ISHII, N.; FUJINO, S.; AOYAMA, I. Role of hydrosulfide íons (HS^-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3183-3186, 1991.

PALMER, G.H. Barley and malt. In: PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. (Ed.). **Handbook of brewing**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. chap. 5, p. 139-160.

PAPAZIAN, C. Beer styles: their origins and classification. In: PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. (Ed.). **Handbook of brewing**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. chap. 2, p. 39-75.

PARKER, N.; JAMES, S.; DICKS, J. BOND, C.; NUENO-PALOP, C.; WHITE, C.; ROBERTS, I.N. Investigating flavor characteristics of British ale yeasts: techniques, resources and opportunities for innovation. **Yeast**, Davis, v. 32, n. 1, p. 281-287, 2015.

PARROU, J-.L.; ENJALBERT, B.; PLOURDE, L.; BAUCHE, A.; GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 15, p. 191-203, 1999.

PEDDIE, H.A.B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 5, p. 327-331, 1990.

PETERSEN, E.E.; MARGARITIS, A.; STEWART, R.J.; PILKINGTON, P.H.; MENSOUR, N.A. The effects of wort valine concentration on total diacetyl profile and levels late in batch fermentations with brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Davis, v. 62, n. 4, p. 131-139, 2004.

PIDDOCKE, M.P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H.P.; NIELSEN; K.F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 3, p. 453-464, 2009.

PIRES, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A.A. Yeast: the soul of beer´s aroma: a review of flavor-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 1937-1949, 2014.

PORTUGAL, C.B.; PALACIOS, A. Vale dos Vinhedos: perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 18-27, 2012.

POWELL, C.D.; QUAIN, D.E.; SMART, K.A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 149-157, 2003.

PRATT, P.L.; BRYCE, J.H.; STEWART, G.G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 109, n. 3, p. 218-228, 2003.

PROCOPIO, S.; SPRUNG, P.; BECKER, T. Effect of amino acid supply on the transcription of flavor-related genes and aroma compound production during lager yeast fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, Madrid, v. 63, n. 1, p. 289-297, 2015.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: systematic, genetic diversity and evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, n. 1, p. 1-9, 2003.

RAUTIO, J.; LONDESBOROUGH, J. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 109, n. 3, p. 251-261, 2003.

REES, E.M.R.; STEWART, G.G. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 103, n. 5, p. 287-291, 1997.

REGODÓN, J.A.; PERÉZ, F.; VALDÉS, M.E.; DE MIGUEL, C.; RAMIREZ, M. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 247-254, 1997.

RENGER, R.S.; VAN HATEREN, S.H.; LUYBEN, K. C.A.M. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 98, n. 6, p. 509-513, 1992.

ROCHA-LEÃO, M.H.M.; PANEK, A.D.; COSTA-CARVALHO, V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. **IRCS Medical Science-Biochemistry**, Lancaster, v. 12, n. 5, p. 411-412, 1984.

RUSSELL, I. Yeast. In: PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. (Ed.). **Handbook of brewing**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. chap. 8, p. 281-332.

SAERENS, S.M.G.; DUONG, C.T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewers's yeast: current state, perspectives and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 5, p. 1195-1212, 2010.

SAERENS, S.M.G.; DELVAUX, F.R.; VERSTREPEN, K.J.; THEVELEIN, J.M.; Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, Chichester, v. 3, n. 2, p. 165-177, 2010.

SAERENS, S.M.G.; VERBELEN, P.J.; VANBENEDEN, N.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavor formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 6, p. 1039-1051, 2008.

SANCHEZ, R.G.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**, Davis, v. 29, n. 8, p. 343-355, 2012.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Potencial de consumo de cervejas no Brasil**. 2014. 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: 10 fev. 2015.

SHEN, H.Y.; DE SCHRIJVER, S.; MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. Effects of CO2 on the formation of flavor volatiles during fermentation with immobilized brewer´s yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 636-643, 2004.

SHEN, N.; WANG, J.; LIU, C.; LI, Y.; LI, Q. Domesticating brewing yeast for decreasing acetaldehyde production and improving beer flavor stability. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 238, n. 3, p. 347-355, 2014.

SHI, L.; SUTTER, B.M.; YE, X.; TU, B.P. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, p. 1982-1990, 2010.

SICARD, D.; LEGRAS, J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu strict* complex. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 334, n. 3, p. 229-236, 2011.

SIEBERT, K.J.; BLUM, P.H.; WISK, T.J.; STENROOS, L.E.; ANKLAM, W.J. The effect of trub on fermentation. **MBBA Technical Quarterly**, Saint Paul, v. 23, p. 37-43, 1986.

SIGLER, K.; MATOULKOVÁ, D.; DIENSTBIER, M.; GABRIEL, P. Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1027-1035, 2009.

SILLJÉ, H.H.W.; PAALMAN, J.W.G.; SCHURE, E.G.; OLSTHOORN, S.Q.B.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, J.; VERRIPS, C.T. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 2, p. 396-400, 1999.

SILVA, C.L.C.; ROSA, C.A.; OLIVEIRA, E.S. Studies on the kinetic parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydrogen sulfide-producing strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 857-863, 2006.

SISTEMA DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS. **Produção de cervejas e refrigerantes:** 2014/2015. 2016. Disponível em: <http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebidas/SistContrProdSicobe.htm>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SLAUGHTER, J.C.; NOMURA, T. Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, p. 64-67, 1992.

SPEERS, R.A.; TUNG, M.A.; DURANCE, T.D.; STEWART, G.G. Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurement: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 98, n. 4, p. 293-300, 1992.

STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAUJO, P.S. Active α-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 105-110, 1999.

STEINER, E.; BECKER, T.; GASTL, M. Turbidity and haze formation in beer – insights and overview. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 116, n. 4, p. 360-368, 2010.

STEINER, E.; GASTL, M.; BECKER, T. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 232, p. 191-204, 2011.

STEWART, G.G.; RUSSELL, I. **An introduction to brewing science & technology.** London: The Institute of Brewing and Distilling, 2009. Series 3: Brewer´s yeast, 108 p.

SUOMALAINEN, H.; RONKAINEN, P. Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. **Nature**, London, v. 220, n. 5169, p. 792-793, 1968.

TAMAI, Y.; MOMMA, T.; YOSHIMOTO, H.; KANEKO, Y. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. **Yeast**, Davis, v. 14, n. 10, p. 923-933, 1998.

TAYLOR, K. Sour beers: it´s more than just pH. In: CRAFT BREWERS CONFERENCE, 2015, Portland. **Proceedings...** Disponível em: <http://www.craftbrewersconference.com/wp-content/uploads/2015_presentations/W1320_Kara_Taylor.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2016.

THE BREWERS OF EUROPE. **Beer statistics.** 2015. Disponível em: <http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2015/statistics_2015_web_002.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2015.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker´s yeast during anaerobic fermentation. **The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.

TREVISOL, E.T.V.; PANEK, A.D.; MANNARINO, S.C.; ELEUTHERIO, E.C.A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 697-704, 2011.

UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P.A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 3, p. 423-429, 2011.

VALERO, E.; MOYANO, L.; MILLAN, M.C.; MEDINA, M.; ORTEGA, J.M. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*: influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, London, v. 78, n. 1, p. 57-61, 2002.

VAN LEEUWEN, C.C.M.; WEUSTHUIS, R.A.; POSTMA, E.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; VAN DIJKEN, J.P. Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, London, v. 284, n. 2, p. 441-445, 1992.

VAN MULDERS, S.E.; CHRISTIANEN, E.; SAERENS, S.M.G.; DAENEN, L.; VERBELEN, P.J.; WILLAERT, R.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.R. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 178-190, 2009.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging: a critical review. **Food Chemistry**, London, v. 95, n. 3, p. 357-381, 2006.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 62, n. 3, p. 140-150, 2003.

VENTURINI FILHO, W.G. Microbiologia da cerveja. In: _____. **Tecnologia de cerveja**. Botucatu: FUNEP, 2000. cap. 4, p. 23-30.

VERBELEN, P.J.; DEKONINCK, T.M.L.; SAERENS, S.M.G.; VAN MULDERS, S.E.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 1, p. 155-167, 2009.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 3, p. 197-205, 2003a.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.P..; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. DELVAUX, F.R. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003b.

VERSTREPEN, K.J.; VAN LAERE, S.D.M.; VANDERHAEGEN, B.M.P.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.P.; PRETORIUS, I.S.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF-2 control the formation of a broad range of volatile esters. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5228-5237, 2003c.

VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G.; CASTRO, I.M.; DOS SANTOS, A.N.G.; COUTRIM, M.X.; BRANDÃO, R.L. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

VIDGREN, V.; LONDESBOROUGH, J. 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 117, n. 4, p. 475-487, 2011.

VIDGREN, V.; HUUSKONEN, A.; VIRTANEN, H.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Improved fermentation performance of a lager yeast after repair of its *AGT1* maltose and maltotriose transporter genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 8, p. 2333-2345, 2009.

WAINWRIGHT, T. Diacetyl: a review. Part I: analytical and biochemical considerations. Part II: brewing experience. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 79, n. 6, p. 451-470, 1973.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley, 1998. 350 p.

WALKER, M.D.; SIMPSON, W.J. Production of volatile sulphur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 40-43, 1993.

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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 3, p. 1016-1025, 2013.

WANG, Z.; HE, X.; LIU, N.; ZHANG, B. Construction of self-cloning industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 989-994, 2008.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 482-487, 1999.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast:** the practical guide to beer fermentation. Colorado: Brewers Publ., 2010. 304 p.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 209-217, 1990.

WILLAERT, R. Biochemistry and fermentation of beer. In: HUI, Y.H. (Ed.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. v. 4, chap. 172. p. 1-19.

YAMANO, S.; TOMIZUKA, K.; SONE, H.; IMURA, M.; TAKEUCHI, T.; TANAKA, J.; INOUE, T. Brewing performance of a brewer´s yeast having α-acetolactato descarboxilase from *Acetobacter aceti* subsp. x*ylinum*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 21-26, 1995.

YOSHIDA, S.; IMOTO, J.; MINATO, T.; OOUCHI, R.; SUGIHARA, M.; IMAI, T.; ISHIGURO, T.; MIZUTANI, S.; TOMITA, M.; SOGA, T. Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO2 levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 9, p. 2787-2796, 2008.

YOSHIOKA, K.; HASHIMOTO, N. Ester formation by alcohol acetiltransferase from brewers' yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 10, p. 2183-2190, 1981.

YOUNG, T.W. The biochemistry and physiology of yeast growth. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. (Ed.). **Brewing microbiology**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1996. chap. 2, p. 13-42.

YU, Z.; ZHAO, M.; LI, H.; ZHAO, H.; ZHANG, Q.; WAN, C.; LI, H. A comparative study on physiological activities of lager and ale brewing yeasts under different gravity conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Korean, v. 17, n. 4, p. 818-826, 2012.

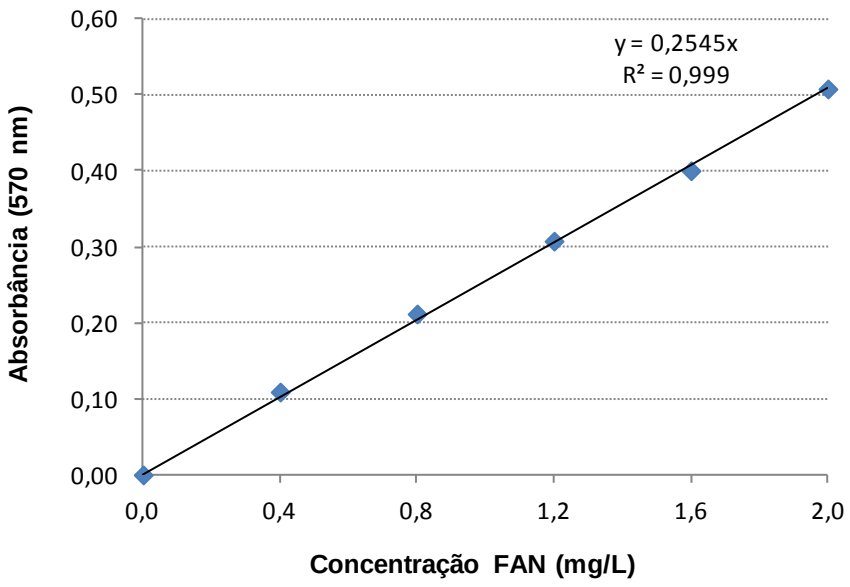
ZAGO, E.A.; SILVA, F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. 194 p.

ZHANG, H.; RUAN, H.; LI, W.; ZHANG, W.; SU, Z.; HE, G.; CHEN, Q. Construction of recombinant industrial *S. cerevisiae* strain with barley lipid-transfer protein 1 secretion capability and lower PrA activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 233, n. 4, p. 707-716, 2011.

ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 159-166, 1994.

ANEXOS

Anexo A



Curva padrão – concentração de nitrogênio alfa-amínico (FAN) (mg/L) em função da absorbância (570 nm). A concentração de FAN foi calculada mediante equação da reta, segundo curva construída a partir de solução padrão de glicina (107,2 mg em 100 mL de água destilada) diluída 100 vezes. A solução padrão diluída contém 2 mg FAN/L

Anexo B

Ficha de degustação, utilizada na análise sensorial, contendo os termos descritivos para avaliação das amostras de cerveja em relação à fase visual, olfativa e gustativa. Para cada cerveja foi estimada a intensidade dos descritores em uma escala de 0 (ausência de percepção) a 5 (intensidade muito alta)

Nome:
Data:

Cervejas especiais elaboradas com diferentes leveduras

Cerveja Nº:_____

Pontuação: Marcar com um X o valor que percebe:
0 equivale ausência
5 equivale intensidade muito alta

FASE VISUAL							
Amarelo	(de amarelo palha/pálido até dourado intenso)	0	1	2	3	4	5
Castanho		0	1	2	3	4	5
Turbidez		0	1	2	3	4	5
Persistência da espuma		0	1	2	3	4	5
Formação da espuma	(densidade, compactação, tamanho de bolhas)	0	1	2	3	4	5
FASE OLFATIVA – AROMAS							
Especiarias	(cravo, pimenta, canela)	0	1	2	3	4	5
Levedura	(fermento, panificação)	0	1	2	3	4	5
Cítrico	(laranja, tangerina, limão, lima)	0	1	2	3	4	5
Frutas frescas	(pêssego, frutas vermelhas, melão, maracujá, maça)	0	1	2	3	4	5
Banana		0	1	2	3	4	5
Frutas passas	(damasco, ameixa, uvas, compota)	0	1	2	3	4	5
Caramelo	(açúcar-mascavo, toffe, maltado)	0	1	2	3	4	5
Lácteos	(iogurte, manteiga, leite)	0	1	2	3	4	5
Floral		0	1	2	3	4	5
Herbáceo	(ervas frescas, menta, hortelã)	0	1	2	3	4	5
FASE GUSTATIVA – GOSTO/PERCEPÇÃO NA BOCA							
Carbonatação	(sensação táctil CO2 em boca)	0	1	2	3	4	5
Corpo	(estrutura em boca)	0	1	2	3	4	5
Alcoólico	(sensação alcoólica, percepção de calor na boca)	0	1	2	3	4	5
Persistência		0	1	2	3	4	5
Acidez	(sensação de acidez global)	0	1	2	3	4	5
Dulçor	(adocicado, maltado, caramelo)	0	1	2	3	4	5
Amargor		0	1	2	3	4	5
Levedura	(fermento, panificação)	0	1	2	3	4	5
Cítrico	(laranja, tangerina, limão, lima)	0	1	2	3	4	5
Especiarias	(cravo, pimenta, canela)	0	1	2	3	4	5
Frutas frescas	(pêssego, frutas vermelhas, melão, maracujá, maça)	0	1	2	3	4	5
Metálico		0	1	2	3	4	5
Frutas passas	(damasco, ameixa, uvas, compota)	0	1	2	3	4	5
Drinkability		0	1	2	3	4	5

Anexo C

Parâmetros determinados no experimento de fermentação em mosto HG (16,3°P) para as diferentes linhagens. Biomassa úmida centrifugada (g); Teor de etanol (% v/v); Extrato aparente (°P); Viabilidade celular (%); Fermentabilidade (%); Peso total de CO_2 liberado (g) ao longo da fermentação

(continua)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)	ETANOL (%)	EXTRATO APARENTE (°P)	VIABILIDADE (%)	FERMENTABILIDADE (%)	TOTAL CO_2 (g)
S-04	0,92	6,95	3,52	98,70	78,40	1,35
	0,93	6,80	3,85	99,80	76,39	1,35
Média	**0,93**	**6,88**	**3,68**	**99,25**	**77,39**	**1,35**
Desvio padrão	**0,01**	**0,11**	**0,23**	**0,78**	**1,42**	**0,00**
S-33	0,81	6,35	4,53	95,20	72,23	1,31
	0,82	6,35	4,50	94,50	72,38	1,32
Média	**0,81**	**6,35**	**4,51**	**94,85**	**72,30**	**1,32**
Desvio padrão	**0,01**	**0,00**	**0,02**	**0,49**	**0,11**	**0,01**
W-34/70	0,73	7,25	2,74	98,70	83,21	1,45
	0,73	7,25	2,74	97,50	83,21	1,48
Média	**0,73**	**7,25**	**2,74**	**98,10**	**83,21**	**1,47**
Desvio padrão	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,85**	**0,00**	**0,02**
PE-2	0,75	6,25	4,78	95,90	70,69	1,26
	0,74	6,20	4,85	94,80	70,23	1,30
Média	**0,75**	**6,23**	**4,81**	**95,35**	**70,46**	**1,28**
Desvio padrão	**0,01**	**0,04**	**0,05**	**0,78**	**0,33**	**0,03**
SA-1	0,81	6,90	3,22	99,50	80,26	1,38
	0,81	6,90	3,27	99,70	79,95	1,36
Média	**0,81**	**6,90**	**3,24**	**99,60**	**80,10**	**1,37**
Desvio padrão	**0,00**	**0,00**	**0,04**	**0,14**	**0,22**	**0,01**
CAT-1	0,60	6,30	4,78	92,40	70,69	1,22
	0,63	6,35	4,78	93,20	70,69	1,25
Média	**0,62**	**6,33**	**4,78**	**92,80**	**70,69**	**1,24**
Desvio padrão	**0,02**	**0,04**	**0,00**	**0,57**	**0,00**	**0,02**
LBTL419	0,82	6,15	4,78	94,80	70,69	1,28
	0,79	6,20	4,75	96,60	70,84	1,21
Média	**0,80**	**6,18**	**4,76**	**95,70**	**70,77**	**1,25**
Desvio padrão	**0,02**	**0,04**	**0,02**	**1,27**	**0,11**	**0,05**
LBTL210	0,79	6,25	4,73	94,70	71,00	1,23
	0,79	6,25	4,75	96,30	70,84	1,27
Média	**0,79**	**6,25**	**4,74**	**95,50**	**70,92**	**1,25**
Desvio padrão	**0,00**	**0,00**	**0,02**	**1,13**	**0,11**	**0,03**
LBTL207	0,70	6,25	4,78	98,40	70,69	1,25
	0,72	6,25	4,78	96,40	70,69	1,29
Média	**0,71**	**6,25**	**4,78**	**97,40**	**70,69**	**1,27**
Desvio padrão	**0,01**	**0,00**	**0,00**	**1,41**	**0,00**	**0,03**
LBTL228	0,76	6,20	4,73	89,70	71,00	1,22
	0,77	6,30	4,75	84,50	70,84	1,23
Média	**0,77**	**6,25**	**4,74**	**87,10**	**70,92**	**1,23**
Desvio	**0,01**	**0,07**	**0,02**	**3,68**	**0,11**	**0,01**
LBTL150	0,67	6,25	4,70	93,50	71,15	1,30
	0,66	6,30	4,70	93,90	71,15	1,25
Média	**0,67**	**6,28**	**4,70**	**93,70**	**71,15**	**1,28**
Desvio padrão	**0,01**	**0,04**	**0,00**	**0,28**	**0,00**	**0,04**

Anexo C

Parâmetros determinados no experimento de fermentação em mosto HG (16,3°P) para as diferentes linhagens. Biomassa úmida centrifugada (g); Teor de etanol (% v/v); Extrato aparente (°P); Viabilidade celular (%); Fermentabilidade (%); Peso total de CO_2 liberado (g) ao longo da fermentação

(conclusão)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)	ETANOL (%)	EXTRATO APARENTE (°P)	VIABILIDADE (%)	FERMENTABILIDADE (%)	TOTAL CO_2 (g)
LBTL361	0,73	5,20	6,67	100,00	59,09	1,04
	0,72	5,10	6,77	99,20	58,49	1,00
Média	**0,72**	**5,15**	**6,72**	**99,60**	**58,79**	**1,02**
Desvio padrão	**0,01**	**0,07**	**0,07**	**0,57**	**0,43**	**0,03**
LBTL390	0,68	6,20	4,85	94,50	70,23	1,26
	0,70	6,25	4,80	95,60	70,54	1,31
Média	**0,69**	**6,23**	**4,83**	**95,05**	**70,38**	**1,29**
Desvio padrão	**0,01**	**0,04**	**0,04**	**0,78**	**0,22**	**0,04**
LBTL438	0,72	6,15	4,83	96,40	70,38	1,30
	0,70	6,35	4,78	99,30	70,69	1,23
Média	**0,71**	**6,25**	**4,80**	**97,85**	**70,54**	**1,27**
Desvio padrão	**0,01**	**0,14**	**0,04**	**2,05**	**0,22**	**0,05**
LBTL232	0,77	7,30	2,58	97,80	84,14	1,50
	0,81	7,30	2,53	98,90	84,45	1,48
Média	**0,79**	**7,30**	**2,56**	**98,35**	**84,30**	**1,49**
Desvio	**0,03**	**0,00**	**0,04**	**0,78**	**0,22**	**0,01**
LBTL179	0,71	6,30	4,70	97,40	71,15	1,27
	0,72	6,25	4,70	96,10	71,15	1,25
Média	**0,72**	**6,28**	**4,70**	**96,75**	**71,15**	**1,26**
Desvio padrão	**0,01**	**0,04**	**0,00**	**0,92**	**0,00**	**0,01**
LBTL521	0,82	7,05	3,22	98,30	80,26	1,43
	0,81	7,05	3,22	97,70	80,26	1,38
Média	**0,82**	**7,05**	**3,22**	**98,00**	**80,26**	**1,41**
Desvio padrão	**0,01**	**0,00**	**0,00**	**0,42**	**0,00**	**0,04**
LBTL355	0,67	5,05	6,74	74,80	58,64	1,00
	0,66	5,10	6,81	72,00	58,19	0,96
Média	**0,67**	**5,08**	**6,78**	**73,40**	**58,41**	**0,98**
Desvio	**0,01**	**0,04**	**0,05**	**1,98**	**0,32**	**0,03**
LBTL055	0,68	5,50	5,87	70,90	63,96	1,11
	0,62	5,00	7,01	72,50	56,97	0,97
Média	**0,65**	**5,25**	**6,44**	**71,70**	**60,47**	**1,04**
Desvio padrão	**0,04**	**0,35**	**0,81**	**1,13**	**4,94**	**0,10**
LBTL139	0,71	6,20	4,68	95,90	71,31	1,27
	0,69	6,25	4,65	95,40	71,46	1,30
Média	**0,70**	**6,23**	**4,66**	**95,65**	**71,38**	**1,29**
Desvio padrão	**0,01**	**0,04**	**0,02**	**0,35**	**0,11**	**0,02**

Anexo D

Parâmetros determinados no experimento de fermentação de mosto HG (16,3°P) com reciclo celular para as diferentes linhagens. Teor de etanol (%, v/v); Extrato aparente (°P); Fermentabilidade (%)

(continua)

LINHAGEM	ETANOL (%)					EXTRATO APARENTE (°P)					FERMENTABILIDADE (%)				
	1°C	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**	**1°C**	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**	**1°C**	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**
	6,35	6,25	6,45	6,30	6,25	4,48	4,48	4,43	4,53	4,78	72,52	72,52	72,83	72,21	70,68
S-33	6,40	6,25	6,55	6,40	6,35	4,53	4,43	4,45	4,48	4,68	72,21	72,83	72,68	72,52	71,29
	6,40	6,30	6,50	6,40	6,30	4,48	4,40	4,45	4,48	4,58	72,52	72,98	72,68	72,52	71,91
Média	**6,38**	**6,27**	**6,50**	**6,37**	**6,30**	**4,50**	**4,44**	**4,45**	**4,50**	**4,68**	**72,42**	**72,78**	**72,73**	**72,42**	**71,29**
Desvio Padrão	**0,03**	**0,03**	**0,05**	**0,06**	**0,05**	**0,03**	**0,04**	**0,01**	**0,03**	**0,10**	**0,18**	**0,23**	**0,09**	**0,18**	**0,61**
	6,25	6,15	6,30	6,20	6,25	4,78	4,83	4,88	4,80	4,85	70,68	70,37	70,06	70,52	70,22
CAT-1	6,30	6,15	6,35	6,25	6,35	4,80	4,85	4,88	4,85	4,83	70,52	70,22	70,06	70,22	70,37
	6,35	6,30	6,35	6,20	6,25	4,75	4,88	4,88	4,88	4,80	70,83	70,06	70,06	70,06	70,52
Média	**6,30**	**6,20**	**6,33**	**6,22**	**6,28**	**4,78**	**4,85**	**4,88**	**4,85**	**4,83**	**70,68**	**70,22**	**70,06**	**70,27**	**70,37**
Desvio Padrão	**0,05**	**0,09**	**0,03**	**0,03**	**0,06**	**0,03**	**0,03**	**0,00**	**0,04**	**0,03**	**0,15**	**0,15**	**0,00**	**0,23**	**0,15**
	6,35	6,05	6,35	6,10	6,30	4,75	4,85	4,80	4,85	4,70	70,83	70,22	70,52	70,22	71,14
LBTL419	6,30	6,05	6,35	6,20	6,35	4,78	4,85	4,83	4,83	4,68	70,68	70,22	70,37	70,37	71,29
	6,30	6,15	6,20	6,15	6,35	4,78	4,78	4,85	4,85	4,68	70,68	70,68	70,22	70,22	71,29
Média	**6,32**	**6,08**	**6,30**	**6,15**	**6,33**	**4,77**	**4,83**	**4,83**	**4,85**	**4,69**	**70,73**	**70,37**	**70,37**	**70,27**	**71,24**
Desvio Padrão	**0,03**	**0,06**	**0,09**	**0,05**	**0,03**	**0,01**	**0,04**	**0,03**	**0,01**	**0,01**	**0,09**	**0,27**	**0,15**	**0,09**	**0,09**
	6,25	6,20	6,25	6,10	6,30	4,73	4,80	4,83	4,83	4,68	70,99	70,52	70,37	70,37	71,29
LBTL207	6,40	6,10	6,25	6,20	6,40	4,78	4,73	4,88	4,85	4,70	70,68	70,99	70,06	70,22	71,14
	6,35	6,15	6,40	6,20	6,30	4,78	4,85	4,83	4,85	4,70	70,68	70,22	70,37	70,22	71,14
Média	**6,33**	**6,15**	**6,30**	**6,17**	**6,33**	**4,76**	**4,80**	**4,85**	**4,85**	**4,70**	**70,78**	**70,58**	**70,27**	**70,27**	**71,19**
Desvio Padrão	**0,08**	**0,05**	**0,09**	**0,06**	**0,06**	**0,03**	**0,06**	**0,03**	**0,01**	**0,01**	**0,18**	**0,39**	**0,18**	**0,09**	**0,09**
	6,30	6,20	6,35	6,30	6,20	4,73	4,73	4,73	4,68	4,80	70,99	70,99	70,99	71,29	70,52
LBTL150	6,40	6,10	6,40	6,35	6,35	4,70	4,80	4,73	4,70	4,75	71,14	70,52	70,99	71,14	70,83
	6,40	6,30	6,45	6,30	6,35	4,70	4,70	4,70	4,68	4,70	71,14	71,14	71,14	71,29	71,14
Média	**6,37**	**6,20**	**6,40**	**6,32**	**6,30**	**4,71**	**4,75**	**4,72**	**4,69**	**4,75**	**71,09**	**70,88**	**71,04**	**71,24**	**70,83**
Desvio Padrão	**0,06**	**0,10**	**0,05**	**0,03**	**0,09**	**0,01**	**0,05**	**0,01**	**0,01**	**0,05**	**0,09**	**0,32**	**0,09**	**0,09**	**0,31**

Anexo D

Parâmetros determinados no experimento de fermentação de mosto HG (16,3°P) com reciclo celular para as diferentes linhagens. Teor de etanol (%, v/v); Extrato aparente (°P); Fermentabilidade (%)

(conclusão)

LINHAGEM	ETANOL (%)					EXTRATO APARENTE (°P)					FERMENTABILIDADE (%)				
	1°C	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**	**1°C**	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**	**1°C**	**2°C**	**3°C**	**4°C**	**5°C**
	6,30	6,20	6,25	6,10	6,15	4,65	4,68	4,85	4,68	4,93	71,45	71,29	70,22	71,29	69,76
PE-2	6,35	6,25	6,35	6,20	6,35	4,63	4,80	4,80	4,85	4,88	71,60	70,52	70,52	70,22	70,06
	6,25	6,25	6,20	6,15	6,25	4,73	4,80	4,85	4,88	4,93	70,99	70,52	70,22	70,06	69,76
Média	**6,30**	**6,23**	**6,27**	**6,15**	**6,25**	**4,67**	**4,76**	**4,84**	**4,80**	**4,91**	**71,34**	**70,78**	**70,32**	**70,52**	**69,86**
Desvio Padrão	**0,05**	**0,03**	**0,08**	**0,05**	**0,10**	**0,05**	**0,07**	**0,03**	**0,11**	**0,03**	**0,32**	**0,44**	**0,18**	**0,67**	**0,18**
	6,40	6,30	6,25	6,20	6,25	4,65	4,78	4,85	4,85	4,90	71,45	70,68	70,22	70,22	69,91
LBTL390	6,40	6,30	6,30	6,25	6,30	4,68	4,83	4,80	4,85	4,90	71,29	70,37	70,52	70,22	69,91
	6,50	6,25	6,35	6,25	6,10	4,68	4,83	4,83	4,85	4,93	71,29	70,37	70,37	70,22	69,76
Média	**6,43**	**6,28**	**6,30**	**6,23**	**6,22**	**4,67**	**4,81**	**4,83**	**4,85**	**4,91**	**71,34**	**70,47**	**70,37**	**70,22**	**69,86**
Desvio Padrão	**0,06**	**0,03**	**0,05**	**0,03**	**0,10**	**0,01**	**0,03**	**0,03**	**0,00**	**0,01**	**0,09**	**0,18**	**0,15**	**0,00**	**0,09**
	6,30	6,20	6,35	6,15	6,20	4,65	4,85	4,83	4,85	4,95	71,45	70,22	70,37	70,22	69,60
LBTL438	6,30	6,35	6,40	6,20	6,30	4,70	4,78	4,80	4,88	4,93	71,14	70,68	70,52	70,06	69,76
	6,40	6,25	6,30	6,20	5,90	4,65	4,80	4,85	4,85	5,90	71,45	70,52	70,22	70,22	63,80
Média	**6,33**	**6,27**	**6,35**	**6,18**	**6,13**	**4,67**	**4,81**	**4,83**	**4,86**	**5,26**	**71,34**	**70,47**	**70,37**	**70,17**	**67,72**
Desvio Padrão	**0,06**	**0,08**	**0,05**	**0,03**	**0,21**	**0,03**	**0,04**	**0,03**	**0,01**	**0,55**	**0,18**	**0,23**	**0,15**	**0,09**	**3,40**
	6,30	6,30	6,30	6,30	6,25	4,60	4,73	4,70	4,73	4,95	71,75	70,99	71,14	70,99	69,60
LBTL179	6,50	6,25	6,40	6,25	6,20	4,48	4,73	4,65	4,70	4,90	72,52	70,99	71,45	71,14	69,91
	6,40	6,30	6,35	6,20	6,25	4,58	4,70	4,68	4,65	4,85	71,91	71,14	71,29	71,45	70,22
Média	**6,40**	**6,28**	**6,35**	**6,25**	**6,23**	**4,55**	**4,72**	**4,68**	**4,70**	**4,90**	**72,06**	**71,04**	**71,29**	**71,19**	**69,91**
Desvio Padrão	**0,10**	**0,03**	**0,05**	**0,05**	**0,03**	**0,07**	**0,01**	**0,03**	**0,04**	**0,05**	**0,41**	**0,09**	**0,15**	**0,23**	**0,31**
	7,30	7,35	7,40	7,30	6,80	2,64	2,69	2,66	2,66	4,08	83,82	83,50	83,66	83,66	74,99
LBTL521	7,35	7,40	7,45	7,35	6,60	2,61	2,64	2,56	2,61	3,95	83,97	83,82	84,28	83,97	75,76
	7,45	7,30	7,40	7,40	6,70	2,59	2,69	2,54	2,59	4,10	84,13	83,50	84,44	84,13	74,83
Média	**7,37**	**7,35**	**7,42**	**7,35**	**6,70**	**2,61**	**2,67**	**2,59**	**2,62**	**4,04**	**83,97**	**83,61**	**84,13**	**83,92**	**75,19**
Desvio Padrão	**0,08**	**0,05**	**0,03**	**0,05**	**0,10**	**0,03**	**0,03**	**0,07**	**0,04**	**0,08**	**0,16**	**0,18**	**0,41**	**0,24**	**0,50**

Anexo E

Parâmetros determinados no experimento de fermentação de mosto HG (16,3°P) com reciclo celular para as diferentes linhagens. Biomassa úmida centrifugada (g); pH; Viabilidade celular (%); Trealose (%, mg/100 mg massa seca); Glicogênio (%, mg/100 mg massa seca)

(continua)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)					pH					VIABILIDADE (%)					TREAL (%)	GLICOG (%)
	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	5°C	5°C
	0,77	0,82	0,77	0,78	0,72	4,22	4,19	4,21	4,17	4,17	94,71	93,58	91,44	91,72	90,16	2,26	4,47
S-33	0,77	0,83	0,78	0,80	0,71	4,23	4,18	4,22	4,18	4,20	93,32	92,04	91,08	91,01	92,18	2,05	4,65
	0,79	0,82	0,79	0,79	0,74	4,24	4,21	4,22	4,19	4,21	95,81	92,89	91,91	92,42	89,93	1,93	4,10
Média	**0,78**	**0,82**	**0,78**	**0,79**	**0,72**	**4,23**	**4,19**	**4,22**	**4,18**	**4,19**	**94,61**	**92,84**	**91,48**	**91,72**	**90,76**	**2,08**	**4,41**
Desvio Padrão	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**1,25**	**0,77**	**0,42**	**0,71**	**1,24**	**0,17**	**0,28**
	0,62	0,61	0,62	0,61	0,58	4,20	4,23	4,17	4,16	4,08	95,97	93,03	93,73	93,40	91,28	1,93	2,84
CAT-1	0,61	0,65	0,61	0,63	0,57	4,19	4,19	4,20	4,17	4,10	96,75	91,10	92,33	93,94	89,96	2,02	4,10
	0,62	0,62	0,62	0,63	0,58	4,23	4,24	4,18	4,15	4,14	93,88	94,68	93,53	93,41	93,78	2,42	4,36
Média	**0,62**	**0,63**	**0,62**	**0,62**	**0,58**	**4,21**	**4,22**	**4,18**	**4,16**	**4,11**	**95,53**	**92,94**	**93,20**	**93,58**	**91,67**	**2,12**	**3,77**
Desvio Padrão	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,03**	**0,02**	**0,01**	**0,03**	**1,48**	**1,79**	**0,76**	**0,31**	**1,94**	**0,26**	**0,81**
	0,79	0,81	0,77	0,77	0,72	4,18	4,22	4,17	4,17	4,21	96,21	98,42	98,15	97,19	89,27	3,38	10,46
LBTL419	0,83	0,84	0,77	0,79	0,74	4,19	4,21	4,17	4,17	4,23	93,69	98,55	97,93	97,25	92,06	3,80	9,42
	0,83	0,84	0,77	0,79	0,72	4,20	4,20	4,16	4,17	4,22	96,72	97,06	97,60	98,43	90,37	3,99	9,79
Média	**0,82**	**0,83**	**0,77**	**0,78**	**0,73**	**4,19**	**4,21**	**4,17**	**4,17**	**4,22**	**95,54**	**98,01**	**97,89**	**97,62**	**90,57**	**3,72**	**9,89**
Desvio Padrão	**0,02**	**0,02**	**0,00**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,00**	**0,01**	**1,62**	**0,83**	**0,28**	**0,70**	**1,41**	**0,31**	**0,53**
	0,71	0,76	0,70	0,70	0,65	4,16	4,17	4,17	4,17	4,26	95,79	97,79	97,00	96,02	93,00	2,99	8,19
LBTL207	0,71	0,76	0,72	0,73	0,64	4,18	4,20	4,16	4,17	4,28	97,38	95,92	97,24	97,58	92,99	3,01	9,23
	0,73	0,79	0,72	0,73	0,65	4,18	4,18	4,18	4,15	4,27	96,63	95,02	96,56	97,97	94,97	3,14	11,17
Média	**0,72**	**0,77**	**0,71**	**0,72**	**0,65**	**4,17**	**4,18**	**4,17**	**4,16**	**4,27**	**96,60**	**96,24**	**96,93**	**97,19**	**93,65**	**3,05**	**9,53**
Desvio Padrão	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,80**	**1,41**	**0,34**	**1,03**	**1,14**	**0,08**	**1,51**
	0,64	0,70	0,66	0,68	0,57	4,19	4,23	4,18	4,21	4,12	95,10	94,95	94,33	94,43	89,38	2,20	3,25
LBTL150	0,67	0,70	0,68	0,68	0,55	4,19	4,22	4,18	4,20	4,15	95,54	93,35	94,21	93,57	88,50	2,26	4,16
	0,66	0,69	0,69	0,68	0,55	4,22	4,25	4,23	4,20	4,15	94,13	93,92	94,49	95,51	88,84	2,34	3,74
Média	**0,66**	**0,70**	**0,68**	**0,68**	**0,56**	**4,20**	**4,23**	**4,20**	**4,20**	**4,14**	**94,92**	**94,07**	**94,34**	**94,50**	**88,91**	**2,27**	**3,72**
Desvio Padrão	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,00**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,03**	**0,01**	**0,02**	**0,72**	**0,81**	**0,14**	**0,97**	**0,44**	**0,07**	**0,45**

Anexo E

Parâmetros determinados no experimento de fermentação de mosto HG (16,3°P) com reciclo celular para as diferentes linhagens. Biomassa úmida centrifugada (g); pH; Viabilidade celular (%); Trealose (%, mg/100 mg massa seca); Glicogênio (%, mg/100 mg massa seca)

(conclusão)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)					pH					VIABILIDADE (%)					TREAL (%)	GLICOG (%)
	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	5°C	5°C
	0,69	0,71	0,71	0,72	0,54	4,16	4,15	4,14	4,16	4,21	94,75	92,50	93,10	93,31	78,00	3,27	5,03
PE-2	0,70	0,73	0,73	0,72	0,52	4,19	4,15	4,11	4,17	4,19	96,10	93,55	93,51	92,55	73,38	3,46	5,03
	0,72	0,75	0,73	0,74	0,53	4,18	4,16	4,11	4,17	4,17	95,35	92,55	93,29	92,86	76,17	3,41	6,02
Média	**0,70**	**0,73**	**0,72**	**0,73**	**0,53**	**4,18**	**4,15**	**4,12**	**4,17**	**4,19**	**95,40**	**92,87**	**93,30**	**92,91**	**75,85**	**3,38**	**5,36**
Desvio Padrão	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,68**	**0,59**	**0,21**	**0,38**	**2,33**	**0,10**	**0,57**
	0,63	0,69	0,67	0,70	0,52	4,24	4,23	4,18	4,20	4,24	91,05	91,09	89,64	89,84	76,51	1,09	1,37
LBTL390	0,67	0,71	0,67	0,72	0,53	4,25	4,21	4,20	4,19	4,23	90,78	91,13	89,08	89,37	75,67	1,06	1,39
	0,69	0,73	0,69	0,74	0,50	4,22	4,22	4,16	4,19	4,21	91,69	90,07	91,45	89,81	68,23	1,44	1,64
Média	**0,66**	**0,71**	**0,68**	**0,72**	**0,52**	**4,24**	**4,22**	**4,18**	**4,19**	**4,23**	**91,17**	**90,76**	**90,06**	**89,67**	**73,47**	**1,19**	**1,47**
Desvio Padrão	**0,03**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,47**	**0,60**	**1,24**	**0,26**	**4,56**	**0,21**	**0,15**
	0,68	0,70	0,69	0,72	0,51	4,22	4,16	4,18	4,16	4,16	95,53	94,84	93,10	92,94	76,96	2,78	5,46
LBTL438	0,71	0,68	0,71	0,73	0,54	4,21	4,17	4,21	4,18	4,17	95,01	94,84	93,02	91,84	79,94	2,74	5,35
	0,70	0,71	0,74	0,73	0,50	4,24	4,16	4,20	4,16	4,18	92,18	95,03	93,19	91,34	75,31	1,47	2,82
Média	**0,70**	**0,70**	**0,71**	**0,73**	**0,52**	**4,22**	**4,16**	**4,20**	**4,17**	**4,17**	**94,24**	**94,90**	**93,10**	**92,04**	**77,40**	**2,33**	**4,54**
Desvio Padrão	**0,02**	**0,02**	**0,03**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**1,80**	**0,11**	**0,09**	**0,82**	**2,35**	**0,75**	**1,49**
	0,69	0,69	0,71	0,71	0,62	4,22	4,14	4,14	4,12	4,15	95,07	95,23	93,18	96,48	90,12	2,31	6,24
LBTL179	0,64	0,69	0,73	0,72	0,63	4,21	4,13	4,18	4,10	4,15	92,24	94,39	94,47	92,96	88,94	2,25	6,66
	0,68	0,70	0,72	0,73	0,62	4,20	4,15	4,17	4,09	4,15	93,64	94,35	95,36	94,00	90,96	2,39	6,61
Média	**0,67**	**0,69**	**0,72**	**0,72**	**0,62**	**4,21**	**4,14**	**4,16**	**4,10**	**4,15**	**93,65**	**94,66**	**94,34**	**94,48**	**90,01**	**2,32**	**6,50**
Desvio Padrão	**0,03**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,00**	**1,42**	**0,50**	**1,10**	**1,81**	**1,01**	**0,07**	**0,23**
	0,77	0,79	0,77	0,82	0,57	4,00	3,94	3,99	3,93	4,11	98,57	97,20	97,98	98,24	95,85	1,93	2,74
LBTL521	0,81	0,79	0,76	0,84	0,58	4,01	3,96	4,00	3,94	4,11	98,74	98,79	98,33	97,72	95,92	1,72	2,74
	0,79	0,80	0,78	0,83	0,57	4,03	3,97	4,02	3,93	4,13	98,35	98,31	97,64	96,68	96,43	1,82	2,68
Média	**0,79**	**0,79**	**0,77**	**0,83**	**0,57**	**4,01**	**3,96**	**4,00**	**3,93**	**4,12**	**98,55**	**98,10**	**97,98**	**97,55**	**96,07**	**1,82**	**2,72**
Desvio Padrão	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,01**	**0,20**	**0,82**	**0,35**	**0,79**	**0,32**	**0,10**	**0,03**

Anexo F

Parâmetros físico-químicos determinados nas amostras de cervejas elaboradas com as diferentes leveduras

AMOSTRA	TB (NTU)	C (EBC)	pH	AT (g $_2SO_4$/L)	EA (°P)	ET (%)	ACD (ppm)	ACE (ppm)	PR (ppm)	IB (ppm)	IA (ppm)	AC (ppm)
	49,30	11,91	4,56	1,51	5,05	6,80	13,10	18,50	27,44	3,60	54,90	84,70
S-33	48,50	11,15	4,57	1,48	5,08	6,60	11,57	20,20	27,44	2,10	60,10	74,25
	45,50	10,06	4,54	1,56	5,08	6,70	10,50	16,60	27,44	5,40	58,90	69,30
Média	**47,77**	**11,04**	**4,56**	**1,51**	**5,07**	**6,70**	**11,72**	**18,43**	**27,44**	**3,70**	**57,97**	**76,08**
Desvio padrão	**2,00**	**0,93**	**0,02**	**0,04**	**0,01**	**0,10**	**1,31**	**1,80**	**0,00**	**1,65**	**2,72**	**7,86**
	93,90	12,65	4,63	1,51	5,10	6,70	7,30	15,40	36,04	5,80	67,29	73,47
LBTL419	87,80	11,65	4,64	1,45	5,10	6,75	8,00	10,60	33,98	10,50	62,13	64,05
	96,30	12,20	4,60	1,51	5,13	6,80	11,12	9,63	41,00	4,13	86,11	62,51
Média	**92,67**	**12,17**	**4,62**	**1,48**	**5,11**	**6,75**	**8,81**	**11,88**	**37,01**	**6,81**	**71,84**	**66,68**
Desvio padrão	**4,38**	**0,50**	**0,02**	**0,04**	**0,01**	**0,05**	**2,03**	**3,09**	**3,61**	**3,30**	**12,62**	**5,93**
	78,30	11,65	4,65	1,56	5,10	6,65	8,93	21,90	35,31	1,59	69,55	59,70
LBTL207	72,90	11,87	4,63	1,61	5,08	6,80	9,92	20,16	43,25	6,57	90,30	61,80
	76,00	12,14	4,61	1,53	5,10	6,70	9,29	11,71	40,01	4,11	81,74	57,60
Média	**75,73**	**11,89**	**4,63**	**1,57**	**5,09**	**6,72**	**9,38**	**17,92**	**39,52**	**4,09**	**80,53**	**59,70**
Desvio padrão	**2,71**	**0,24**	**0,02**	**0,04**	**0,01**	**0,08**	**0,50**	**5,45**	**3,99**	**2,49**	**10,43**	**2,10**
	87,60	12,82	4,62	1,72	5,13	6,70	12,25	12,60	31,14	3,95	71,80	69,59
LBTL150	79,00	12,54	4,60	1,67	5,13	6,50	11,83	19,30	31,99	5,88	78,78	60,40
	81,80	12,30	4,59	1,61	5,13	6,75	13,19	20,50	32,15	7,00	82,99	59,60
Média	**82,80**	**12,56**	**4,60**	**1,67**	**5,13**	**6,65**	**12,42**	**17,47**	**31,76**	**5,61**	**77,86**	**63,20**
Desvio padrão	**4,39**	**0,26**	**0,02**	**0,05**	**0,00**	**0,13**	**0,70**	**4,26**	**0,54**	**1,54**	**5,65**	**5,55**
	102,00	13,22	4,59	1,67	5,10	6,70	9,24	19,02	39,80	46,59	108,63	56,80
LBTL438	108,00	13,14	4,58	1,61	5,15	6,55	8,50	15,43	40,51	46,90	108,71	62,79
	106,00	12,47	4,57	1,61	5,10	6,60	9,48	16,61	39,63	46,55	108,50	69,52
Média	**105,33**	**12,95**	**4,58**	**1,63**	**5,12**	**6,62**	**9,07**	**17,02**	**39,98**	**46,68**	**108,61**	**63,04**
Desvio padrão	**3,06**	**0,41**	**0,01**	**0,03**	**0,03**	**0,08**	**0,51**	**1,83**	**0,47**	**0,19**	**0,11**	**6,36**
	72,70	14,75	4,58	1,61	4,63	7,10	8,89	7,38	30,93	9,12	86,12	72,61
LBTL521	74,50	13,40	4,55	1,59	4,65	7,00	6,80	1,46	30,35	6,16	78,74	82,85
	76,80	13,90	4,54	1,67	4,68	7,05	10,42	3,66	30,41	8,10	84,21	85,35
Média	**74,67**	**14,02**	**4,56**	**1,62**	**4,65**	**7,05**	**8,70**	**4,17**	**30,56**	**7,79**	**83,02**	**80,27**
Desvio padrão	**2,06**	**0,68**	**0,02**	**0,04**	**0,03**	**0,05**	**1,82**	**2,99**	**0,32**	**1,50**	**3,83**	**6,75**

Turbidez (**TB**); Cor (**C**); pH; Acidez total (**AT**); Extrato aparente (**EA**); Etanol (**ET**); Acetaldeído (**ACD**); Acetato de etila (**ACE**); 1-propanol (**PR**); Isobutílico (**IB**); Isoamílico (**IA**); Ácido acético (**AC**)

Anexo G

Análise de componentes principais para a fase visual da análise sensorial

Componente	Autovalor	Porcentagem de variância	Porcentagem acumulada
Amarelo	2,93423	58,685	58,685
Castanho	1,51226	30,245	88,930
Turbidez	0,389599	7,792	96,722
Espuma (persistência)	0,156658	3,133	99,855
Espuma (formação)	0,00725582	0,145	100,000

Análise de componentes principais para a fase olfativa da análise sensorial

Componente	Autovalor	Porcentagem de variância	Porcentagem acumulada
Especiarias	5,64466	56,447	56,447
Levedura	2,51738	25,174	81,620
Cítrico	1,33246	13,325	94,945
Frutas frescas	0,34859	3,486	98,431
Banana	0,156912	1,569	100,000
Frutas passas	1,88641E-16	0,000	100,000
Caramelo	6,15033E-17	0,000	100,000
Lácteos	4,0843E-17	0,000	100,000
Floral	0,0	0,000	100,000
Herbáceo	0,0	0,000	100,000

Análise de componentes principais para a fase gustativa da análise sensorial

Componente	Autovalor	Porcentagem de variância	Porcentagem acumulada
Acidez	3,99306	49,913	49,913
Dulçor	1,91935	23,992	73,905
Amargor	1,25381	15,673	89,578
Levedura	0,711125	8,889	98,467
Cítrico	0,122658	1,533	100,000
Especiarias	6,85286E-17	0,000	100,000
Frutas frescas	0,0	0,000	100,000
Frutas passas	0,0	0,000	100,000