**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial para a
produção de cervejas especiais**

Marcelle Balduino de Almeida

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2021**

Marcelle Balduino de Almeida
Bacharel em Biotecnologia

**Caracterização de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial para a produção de
cervejas especiais**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

Coorientador:

Prof. Dr. **CAURÉ BARBOSA PORTUGAL**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2021

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

Almeida, Marcelle Balduino de

Caracterização de leveduras não-Saccharomyces com potencial para a produção de cervejas especiais / Marcelle Balduino de Almeida - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021. 80 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Caracterização 2. Leveduras não-convencionais 3. Fermentação 4. Inovação 5. Biotecnologia I. Título

*Ao meu irmão Leonardo e
a minha sobrinha Beatriz,
por tanto carinho,
companheirismo e amor*
Ofereço

*Aos meus pais Beto e Rita,
pela oportunidade de estudo,
confiança, incentivo e valores
transmitidos durante toda minha vida*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Beto e Rita, por estarem ao meu lado desde sempre, me guiando com amor e compreensão. Obrigada pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

Ao meu irmão Leonardo pelo ombro amigo, companheirismo, carinho e amor em todos os momentos.

Às minhas antigas, queridas e eternas amigas, Amanda Correia, Camila Justino, Camila Pescaroli, Francielle Moraes, Juliana Sartorelli e Mariana Sartorelli, pelos conselhos e irmandade. Obrigada por sempre me incentivarem e apoiarem, mesmo distantes.

Às minhas amigas da pós-graduação, Carol Correa, Luisa Carvalho, Mariana Castro e Mariane Raposo, que se tornaram uma família durante esse período; em especial à Lethicia Corniani, que é minha companheira, confidente e apoio diário. Obrigada pelas conversas, ajudas e risadas, levarei vocês sempre no meu coração.

Às minhas amigas Brenda Callazans, Karollyny Roger e Vanessa Alves por sempre me ouvirem e acolherem minhas vivências. Obrigada por, mesmo distantes, permanecerem me incentivando e encorajando diante de cada experiência.

À prof.^a Dr.^a Sandra Helena da Cruz, pela oportunidade, confiança e orientação ao longo desse período.

Ao Dr. Cauré Barbosa Portugal, pela coorientação, paciência, disponibilidade e colaboração para o meu desenvolvimento acadêmico.

À Dr.^a Renata Maria C. Furlan, pela paciência, ensinamentos e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do departamento (LAN/ESALQ), Luciana, Pedrinho, Rose e Silvino pela simpatia e auxílio concedido.

Aos amigos da cervejaria A Tutta Birra, pela parceria, troca de experiências e colaboração ao cederem o mosto utilizado nos experimentos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida – processo 88882.378322/2019-01.

Fermentation may have been a greater discovery than fire.

David Rains Wallace

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Mercado Cervejeiro	20
3.2 Leveduras Cervejeiras	21
3.3 Leveduras Não-Convencionais.....	23
3.3.1 Bioaromatização	25
3.3.2 Cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool	27
3.3.3 Cervejas de baixa caloria.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Linhagens de leveduras	32
4.2 Resgate, reativação e preservação	34
4.3 Caracterização das linhagens de leveduras.....	35
4.3.1 Crescimento em diferentes fontes de açúcares	35
4.3.2 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio.....	35
4.3.3 Teste de capacidade fermentativa.....	36
4.3.4 Avaliação de sensibilidade ao etanol.....	36
4.3.5 Caracterização aromática.....	36
4.4 Ensaio de Microfermentação	37
4.5 Análises físico-químicas.....	38
4.5.1 Viabilidade celular.....	38
4.5.2 Determinação de pH	39
4.5.3 Acidez total titulável.....	39
4.5.4 Fermentabilidade do mosto	39
4.5.5 Teor alcoólico	40
4.6 Análises Estatísticas	40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Caracterização das linhagens	41
5.1.1 Crescimento em diferentes fontes de açúcares	41
5.1.2 Teste de capacidade fermentativa	46
5.1.3 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio	49
5.1.4 Avaliação de sensibilidade ao etanol	51
5.1.5 Caracterização aromática	53
5.1.6 Linhagens selecionadas	56
5.2 Ensaios de Microfermentação	57
5.2.1 Microfermentações com inóculos puros	57
5.2.2 Microfermentações com inoculação sequencial	62
5.2.3 Dinâmica populacional	66
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	80

RESUMO

Caracterização de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial para a produção de cervejas especiais

A busca por diversificação no mercado de bebidas alcoólicas e a crescente demanda dos consumidores por bebidas de alta qualidade tem sido uma constante, impulsionando inovações, levando à revisão das propostas produtivas e personalização de produtos. Leveduras não-*Saccharomyces* podem fornecer uma série de perspectivas e aplicações para o desenvolvimento de cervejas especiais, como o aprimoramento do perfil organoléptico e aplicação na produção de cervejas de baixo teor alcoólico e calórico. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar características físico-tecnológicas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de diferentes bioprocessos, visando sua aplicação na produção de cervejas especiais. Para isso, 12 linhagens pertencentes às espécies *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora vineae*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis colliculosa* e *Torulopsis utilis* foram caracterizadas levando em consideração o crescimento em diferentes fontes de açúcar, capacidade fermentativa, tolerância ao etanol, capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio e caracterização aromática. Diante do comportamento das linhagens nas etapas de caracterização, as cepas *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA77, *H. vineae* SYL-54 e *T. delbrueckii* SYL-48 foram selecionadas para aplicação como inóculos em ensaios de microfermentação em mosto cervejeiro, conduzidos com inoculações puras e em sistemas de inoculação sequencial com linhagem cervejeira *S. cerevisiae*. Os produtos das fermentações foram avaliados quanto a atenuação aparente do mosto, teor alcoólico, acidez total titulável, pH e dinâmica populacional. Foi observado que apenas as cepas pertencentes ao gênero *Pichia* não apresentam capacidade fermentativa. As cepas de *D. bruxellensis* foram capazes de metabolizar todas as fontes de açúcar. Enquanto *P. membranifaciens* e *P. kluyveri* não metabolizaram de forma eficiente nenhuma das fontes de açúcar avaliadas. *T. delbrueckii* não foi capaz de crescer apenas em maltose, apontando sua potencial aplicação na produção de cervejas com baixo teor alcoólico ou seu uso em inoculações com outras leveduras. Diferenças nos perfis aromáticos foram observadas entre todas as cepas. As cepas *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii*, *T. colliculosa* e *T. utilis* não desenvolveram o off-flavor 4-vinil-fenol. As cepas *D. bruxellensis*, bem como *H. guilliermondii*, *H. vineae*, *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii* e *T. colliculosa* foram tolerantes em meio contendo entre 10-12% (v/v) de etanol. Levando em consideração as taxas de etanol produzidas nas microfermentações com inoculações puras a cepa *H. vineae* pode ser direcionada para a produção de cervejas sem álcool, enquanto as cepas de *D. bruxellensis* e *T. delbrueckii* podem ser empregadas na produção de cervejas com baixo teor alcoólico. Por outro lado, as microfermentações com inoculações sequenciais se mostraram uma estratégia adequada para a produção de cervejas com níveis mais altos de álcool. Os resultados demonstraram que as leveduras *D. bruxellensis* (SYL-1 e CCA77), *H. vineae* e *T. delbrueckii* possuem potencial para a produção de cervejas especiais, desde que observadas suas características fisiológicas, estratégias de inoculação e qual resultado se deseja obter acerca das características da cerveja a ser produzida.

Palavras-chave: Caracterização, Leveduras não-convencionais, Fermentação, Inovação, Biotecnologia

ABSTRACT

Screening of non-*Saccharomyces* yeasts with potential for special beer brewing

Nowadays the search for diversification in the alcoholic beverage market and the increasing consumers demand for high-quality beverages has been a constant, driving innovations, leading to revision of its production proposals and product customization. Non-*Saccharomyces* yeasts can provide a range of perspectives and applications for the development of differentiated specialty beers, such as the improvement of organoleptic profile and application in the production of low-alcohol and low-calorie beers. Thus, this study aimed to assess physiological and technological traits for novel non-conventional yeast strains isolated from different bioprocesses to be applied in specialty beer brewing. For that, 12 strains of 9 distinct species (*Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora vineae*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis colliculosa*, and *Torulopsis utilis*) were put through a screening system, which included ethanol resistance test, hydrogen sulfide (H₂S) production, sugar utilization test, fermentative capacity, phenolic off-flavor, and aromatic tests. After passing these steps, trial beer wort microfermentation were performed, under controlled conditions, using *D. bruxellensis* SYL-1, *D. bruxellensis* CCA77, *H. vineae* SYL-54, and *T. delbrueckii* SYL-48 with single- and co-culture with a commercial brewing yeast, *S. cerevisiae* US-05. The fermentations were analyzed for pH drop, titratable acidity, extract reduction, ethanol content, and population dynamics. It was observed that only *Pichia* strains exhibited no fermentative capacity in wort. The *D. bruxellensis* strains were able to metabolize all carbon sources. While *P. membranifaciens* and *P. kluyveri* were not able to efficiently metabolize any carbon sources assessed. *T. delbrueckii* strain was not able to grow only in maltose, pointing its potential application for low-alcohol beer brewing, as well as its use in inoculations with other yeasts. Differences in the aromatic profiles were observed among all the strains. The strains *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii*, *T. colliculosa* e *T. utilis* were not up to develop the Phenolic Off-Flavor (4-vinyl-phenol) on medium with the precursor *p*-Coumaric acid. *D. bruxellensis* strains, as well as *H. guilliermondii*, *H. vineae*, *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii* e *T. colliculosa* showed satisfying growth under alcohol contents of 10-12% (v/v). Considering the ethanol rates produced in microfermentation with pure inoculations, the *H. vineae* strain can be pointing to brewing non-alcoholic beers, while *D. bruxellensis* and *T. delbrueckii* can be used to brewing low-alcohol beers. On the other hand, microfermentation with sequential inoculations proved to be an appropriate strategy for brewing beers with more alcohol content. The results demonstrated that the yeasts *D. bruxellensis* (SYL-1 and CCA77), *H. vineae* and *T. delbrueckii* can be explored for brewing special beers, as long as their physiological traits, inoculation strategies and the expectations around the beer characteristics are observed.

Keywords: Characterization, Non-conventional yeasts, Brewing, Innovation, Biotechnology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curvas de crescimento em microcultivo (27 °C, 60h) em meio YNB com fontes de carbono isoladas. *D. bruxellensis* SYL-1 (A), *D. bruxellensis* CCA059 (B), *D. bruxellensis* CCA077 (C), *D. bruxellensis* CCA155 (D), *H. guilliermondii* (E), *H. vineae* (F).....42
- Figura 2. Curvas de crescimento em microcultivo (27 °C, 60h) em meio YNB com fontes de carbono isoladas. *P. kluyveri* IZ-288 (A), *P. kudriavzevii* SYL-1.13 (B), *P. membranifaciens* IZ-379 (C), *T. delbrueckii* SYL-48 (D), *T. colliculosa* IZ-1966 (E), *T. utilis* IZ-300 (F). 43
- Figura 3. Fotografia do tubo utilizado na avaliação de capacidade fermentativa com a cepa comercial *S. cerevisiae* US-05 no início (A) e ao final (B) do ensaio (24 h, 30 °C). 48
- Figura 4. Padrão de crescimento das colônias das diferentes leveduras em meio sintético LA. 50
- Figura 5. Conversão enzimática do ácido *p*-cumárico em 2 etapas: (PAD) Hidroxinamato Descarboxilase (A), seguida por (VPR) Vinilfenol Redutase (B), resultando nos compostos fenólicos de aroma 4-vinilfenol e 4-etilfenol.....54
- Figura 6. Evolução da perda de massa (g/L) do sistema, para as diferentes linhagens, estimada por monitoramento da liberação de CO₂ durante microfermentação conduzida com inóculos puros. 58
- Figura 7. (A) Taxa de fermentabilidade (%) calculada e (B) Teor alcoólico (% , v/v) após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA077, *H. vineae* SYL-54, *T. delbrueckii* SYL-48 e a linhagem comercial US-05.....59
- Figura 8. Parâmetros de acidez total titulável (■ g ácido acético/L) e pH (■) obtidos após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens *D. bruxellensis* SYL-1, CCA077, *H. vineae* SYL-54, *T. delbrueckii* SYL-48 e *S. cerevisiae* US-05. Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente (p > 0,05). 61
- Figura 9. Evolução da perda de massa (g/L) do sistema, estimada por monitoramento da liberação de CO₂ durante microfermentação inoculada sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*. As setas indicam o tempo em que a inoculação da levedura *S. cerevisiae* foi realizada. 62

Figura 10. (A) Fermentabilidade (%) calculada e (B) Teor de etanol (% v/v) após microfermentação conduzida sequencialmente com as linhagens não- <i>Saccharomyces</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	64
Figura 11. Parâmetros de acidez total titulável (■ g ácido acético/L) e pH (■) após microfermentação conduzida sequencialmente com as linhagens não- <i>Saccharomyces</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	65
Figura 12. Cinética de crescimento determinada por UFC/mL durante as microfermentações conduzidas com inóculos puros.	66
Figura 13. Cinética de crescimento determinada por UFC/mL durante as microfermentações conduzidas sequencialmente com as linhagens não- <i>Saccharomyces</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de leveduras utilizadas no trabalho e descrição taxonômica.....	33
Tabela 2. Padrões de crescimento das linhagens de leveduras em meio quimicamente definido com diferentes fontes de carbono.....	45
Tabela 3. Capacidade fermentativa (CF) observada em tubos de fermentação <i>Einhorn</i> com mosto primário (11,6°P).....	47
Tabela 4. Tendência de formação de sulfeto de hidrogênio das leveduras em meio sintético LA	49
Tabela 5. Capacidade de crescimento observada em meio sintético acrescido de etanol	51
Tabela 6. Tendência de produção de aroma fenólico alterante (<i>POF</i>) das diferentes linhagens em meio sintético YM+ ácido <i>p</i> -cumárico.....	53
Tabela 7. Aromas e intensidade atribuídos após cultivo das linhagens em meio mosto primário 11,6 °P.....	56

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos que exercem grande influência em bioprocessos desde os tempos mais remotos, desempenhando papéis essenciais para a biotecnologia de alimentos e bebidas. Os avanços científicos e a maior compreensão da biodiversidade, fisiologia e genética das leveduras envolvidas nos processos fermentativos permitiram a ampliação sobre a importância e aplicação desses microrganismos no desenvolvimento de novos processos e produtos (HITTINGER; STEELE; RYDER, 2018).

No que se refere à produção de bebidas alcoólicas é durante a etapa de fermentação que os açúcares disponíveis em determinado mosto são metabolizados por estes microrganismos e convertidos em etanol, dióxido de carbono e diversos metabólitos que exercem influência no sabor, aroma e características físico-químicas do produto. Além do tipo de mosto empregado e das condições do processo, o perfil químico e organoléptico da bebida produzida é dependente do metabolismo exercido pela espécie e linhagem de levedura utilizada (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010). Portanto, no processo cervejeiro as leveduras que são inoculadas, não são escolhidas apenas por apresentarem boa eficiência e rendimento fermentativo, mas também por conta do impacto que exercem sobre o perfil organoléptico da bebida (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

O uso de linhagens selecionadas e devidamente caracterizadas se tornou uma prática comum como estratégia de consistência e padronização das cervejas, sendo as linhagens do gênero *Saccharomyces* as mais difundidas (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). No entanto, antes do desenvolvimento de algumas tecnologias, as cervejas apresentavam características diferentes das que conhecemos atualmente. As fermentações eram conduzidas espontaneamente, sem reprodutibilidade entre suas produções, com a microbiota presente no ambiente, matéria-prima e utensílios atuando no processo fermentativo (BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016).

O avanço científico e o aprimoramento de técnicas relacionadas à ciência da fermentação, isolamento e uso de inóculos puros, direcionaram a indústria cervejeira para produções uniformes e controladas (LODOLO et al., 2008). Apesar dos avanços positivos, da confiabilidade e eficiência adquiridas, observa-se que a ausência de diversidade microbiana pode limitar a grande variedade de compostos químicos e, conseqüentemente, as características sensoriais e complexidade que poderiam ser alcançadas com o uso de outras leveduras não-*Saccharomyces* (DOMIZIO et al., 2007).

Um número considerável de estudos já demonstrou a contribuição de linhagens não-*Saccharomyces* principalmente em vinificação, mas sua aplicação em bebidas como cerveja,

fermentados de frutas e outras bebidas fermento-destiladas tem sido cada vez mais discutida (VARELA, 2016). Existe uma grande diversidade nos padrões de assimilação de açúcares e regulação da fermentação entre espécies de leveduras não-convencionais que pode ser aproveitada e explorada para o desenvolvimento de cervejas especiais (DJIKEN 2002).

O que se denomina hoje como cervejas especiais passa por uma gama de produtos sem limites ou definições claras, podendo abranger desde cervejas de um determinado estilo clássico, porém com a adição de algum sabor novo, como cervejas resultantes de processos fermentativos não-convencionais. Algumas dessas cervejas conferem apelo especial aos atuais consumidores. Cervejas de baixo teor alcoólico ou sem álcool, com calorias reduzidas e aquelas com características organolépticas diferenciadas são as que despertam maior interesse (YEO; LIU, 2014).

O setor de bebidas alcoólicas está em expansão e, sendo direcionado, principalmente, por fatores como preço e diferenciação de produtos, o que suscita a necessidade de inovação contínua e o lançamento de novos produtos com uma frequência cada vez maior. Neste sentido, a fermentação alcoólica pode ser vista como um ponto chave para impulsionar um caráter inovador na produção de bebidas (CAPECE et al., 2018a; COLEN; SWINNEN, 2016). Com o objetivo de atender à crescente demanda por produtos diferenciados as cervejarias introduziram variedades de lúpulos e maltes especiais, assim como diversas combinações entre elas para gerar novas bebidas. No entanto, uma alternativa que também se apresenta viável para trazer inovação para o setor é o uso de leveduras não-convencionais. A utilização dessas leveduras de maneira controlada durante a fermentação, com otimização do processo e até mesmo o uso de uma linhagem *Saccharomyces* em conjunto pode ser uma estratégia interessante quando se deseja alcançar características inusitadas e específicas (HOLT et al., 2018; RAVASIO et al., 2018).

Existem várias estratégias que visam fornecer cepas de leveduras adequadas para objetivos industriais específicos, uma delas consiste em explorar a biodiversidade natural, selecionando cepas com desempenhos e características particulares (STEENSELS et al., 2014). As leveduras não-*Saccharomyces*, provenientes de diferentes fontes podem apresentar versatilidade fisiológica e metabólica, com grande potencial de aplicação na produção de cervejas. Para tanto, é necessário verificar algumas características tecnológicas, e investigar aspectos que influenciam suas atividades e comportamento fermentativo para que seja possível direcionar estratégias de aplicação no processo cervejeiro.

Desta forma, retomar o olhar para a exploração da biodiversidade de leveduras, com ênfase em novas abordagens biotecnológicas para desenvolvimento de cervejas especiais,

apresenta-se como uma oportunidade de expansão e diferenciação do mercado. Portanto, o presente trabalho se limitou na avaliação de linhagens não-convencionais, isoladas de diferentes ambientes, por meio da análise de diversos parâmetros físico-tecnológicos visando a aplicação no desenvolvimento de cervejas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial físico-tecnológico de leveduras não-convencionais (não-*Saccharomyces*) provenientes de diferentes ambientes, visando sua utilização como inóculo no desenvolvimento de cervejas especiais.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar o perfil físico-tecnológico individual de diferentes espécies/cepas de leveduras com vista a fermentação de mosto cervejeiro;
- 2) Caracterizar o perfil fermentativo de diferentes espécies/cepas de leveduras considerando fermentações com inóculos puros e sistemas com inoculação sequencial com linhagem cervejeira *S. cerevisiae*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado Cervejeiro

A elaboração de bebidas fermentadas é um dos bioprocessos mais antigos associados às civilizações humanas, vinculada a distintas tradições e culturas. O aperfeiçoamento desses processos de produção foi sendo estimulado graças à grande influência econômica e geração de capital que começou a exercer com o passar dos anos (DIAS; PANTOJA; SCHWAN, 2010; LEGRAS et al., 2007).

A cerveja, em particular, desponta como a bebida alcoólica mais consumida no mundo, com um mercado global que apresenta crescimento em torno de 2,4% entre 2017 e 2021, sendo que China, Estados Unidos e Brasil despontam como os maiores produtores (INFINITI RESEARCH LIMITED, 2017). Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil, 2017), esse segmento representa 1,6% do PIB nacional, com volume de produção de 14,1 bilhões de litros. No Brasil, o movimento cervejeiro tem apresentado constante avanço nos últimos anos, com crescimento de mais de 19,6% por ano. Em 2019, foram registradas 320 novas cervejarias em diferentes municípios, sendo que a cerveja figura como o produto mais registrado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, com uma média de 22 registros de produto por cervejaria (MAPA, 2019).

Diante dessa expansão e dinamização do setor é possível observar modificações no perfil de consumo. Os atuais consumidores estão procurando por experiências sensoriais diferentes e inovadoras, a demanda por cervejas ‘artesaniais’ e marcas *premium* catalisaram o crescimento do mercado global. Nesse sentido, cervejas sem álcool ou com baixo teor alcoólico também vem ganhando destaque entre um público preocupado com um estilo de vida mais saudável (MORDOR INTELLIGENCE, 2019).

À medida que o mercado global de cervejas se expande, torna-se necessária a compreensão de valor agregado em detrimento do volume. Entender as mudanças nas preferências dos consumidores, cada vez mais diversificados e conscientes, é um ponto crítico para a permanência das empresas no setor. Trata-se de um período de reestruturação, gerando necessidade de inovações, revisão dos limites de atuação e personalização de produtos (CISION PR NEWSWIRE, 2019; MACHADO; TAKITANE, 2011).

Apesar do constante avanço, o Brasil ainda apresenta um mercado com grande potencial de exploração quando comparado com outros países; o lançamento de cervejas diferenciadas se apresenta como um nicho rentável e com forte potencial de expansão (ESPERANCINI, 2011).

3.2 Leveduras Cervejeiras

Evidências arqueológicas sugerem que um tipo de bebida semelhante a cerveja já era produzido desde o ano 5.000 a.C., demonstrando que sua história está intimamente ligada ao próprio desenvolvimento das civilizações humanas (MEUSSDOERFFER, 2009; WANG et al., 2016). Atualmente, o termo ‘cerveja’ se refere a qualquer bebida que seja produzida por meio da fermentação de açúcares derivados totalmente ou em maior parte de cereais maltados e aromatizada com lúpulo. No entanto, devido à existência de várias receitas e procedimentos, é possível encontrar uma grande variedade de estilos, sendo difícil enquadrar cerveja em uma única definição (BUGLASS, 2011; MEUSSDOERFFER, 2009).

As primeiras fermentações, associadas a um produto ancestral da cerveja eram iniciadas de forma ‘espontânea’ por microrganismos naturalmente presentes no ambiente, em frutas, grãos, na superfície de potes ou mesmo introduzidos por alguma ação humana. Apesar dessas fermentações envolverem um complexo de diferentes microrganismos, as espécies de leveduras com maior potencial fermentativo dominavam os processos e eram as principais responsáveis pela transformação observada (VARELA, 2016). Embora fermentações não controladas tenham sido usadas por milhares de anos, no decorrer do tempo produtores observaram que a qualidade e estabilidade do processo eram melhores quando a matéria-prima era inoculada com uma amostra resultante de uma fermentação já acabada e, assim, as linhagens que se impunham e apareciam em maior quantidade passaram a ser selecionadas intuitivamente a partir das mais variadas fontes. Com o tempo e o aperfeiçoamento das técnicas de produção, culturas iniciadoras pré-definidas, compostas por uma ou algumas cepas de microrganismos de melhor desempenho fermentativo, prontamente tomaram o lugar da microflora nativa (SICARD; LEGRAS, 2011; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Nesse sentido, espécies pertencentes ao complexo *Saccharomyces* sensu stricto se tornaram os principais agentes dos processos fermentativos. Isto ocorreu devido a algumas características fisiológicas, como maior rendimento, tolerância ao etanol, crescimento rápido e uso da fermentação como principal via metabólica (PISKUR et al., 2006; WALTHER; HESSELBART; WENDLAND, 2014). As leveduras cervejeiras convencionais, normalmente utilizadas na produção, são pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Estas são divididas em duas categorias: *ale* e *lager*, também usadas como critério para definição do estilo da cerveja. As leveduras do tipo *ale*, são linhagens de *S. cerevisiae* e apresentam maior diversidade genética, descrito como o reflexo de seu isolamento em diversos locais. Enquanto as leveduras do tipo *lager*, pertencentes à espécie *S. pastorianus*, são exemplos de organismos que emergiram em localidades limitadas e oriundas de hibridações interespecíficas, formadas entre progenitores *S.*

cerevisiae e *S. eubayanus*. Essas espécies demonstram algumas diferenças relacionadas à tolerância a baixas temperaturas, metabolização de açúcares e tipos de ésteres produzidos (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; GIBSON; LITI, 2015).

Fermentações *ale* e *lager* também tendem a apresentar diferenças no comportamento de floculação e sedimentação das células de levedura. As *ales* são conhecidas como leveduras de alta fermentação (*top-fermenting*) devido à tendência de subirem à superfície dos tanques. Já as linhagens do tipo *lager* são denominadas leveduras de baixa fermentação (*bottom-fermenting*) graças à capacidade de flocularem e se sedimentarem no fundo do fermentador. No entanto, já foi observado que a utilização de fermentadores cilíndricos e centrífugas têm conduzido leveduras do tipo *ale* a também se depositarem no fundo dos tanques, tornando a diferenciação entre as linhagens baseadas nesses critérios menos usual (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010; VIDGREN; LONDESBOROUGH, 2011).

Existem algumas outras características que diferem os tipos de leveduras. As fermentações com linhagens *lager* são conduzidas a temperaturas mais baixas, entre 8°C a 15°C, são capazes de hidrolisar o dissacarídeo melibiose e fermentam mais eficientemente a maltotriose, originando cervejas com menos açúcares residuais, de caráter mais “limpo” e notas sensoriais mais neutras. Leveduras *ales*, por outro lado, trabalham entre 15°C e 26°C, não produzem a enzima α -galactosidase (responsável por hidrolisar a melibiose) e dão origem a cervejas com notas frutadas e florais mais acentuadas (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010; GIBSON; LITI, 2015).

Sabe-se que o sabor e aroma da cerveja são resultado dos muitos compostos gerados durante cada etapa de sua produção, porém, aqueles provenientes do metabolismo das leveduras definem majoritariamente as características organolépticas do produto, de modo que a qualidade da bebida está intimamente ligada aos processos bioquímicos da etapa de fermentação (PIRES et al., 2014). É evidente a importância das leveduras empregadas no processo cervejeiro, sendo imperativo considerar as relações existentes entre vários parâmetros que influenciam diretamente no processo. Além da seleção do gênero, espécie e cepa adequada ao estilo de cerveja, características como concentração do mosto e açúcares presentes, temperatura e taxa de inoculação devem ser cuidadosamente controladas para a obtenção de um produto equilibrado (BAMFORTH, 2003).

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, convencionalmente utilizadas na produção de cervejas, demonstram capacidade em consumir uma ampla variedade de fontes de carbono, com boa habilidade fermentativa, assim como tolerância ao etanol e compostos do lúpulo (RUSSELL, 2006). A aptidão e grande importância das cepas pertencentes ao complexo

Saccharomyces para a produção de cervejas é indiscutível, no entanto, a exploração de outros microrganismos, inclusive para serem empregados em sinergia com elas, em inoculação sequencial, ainda é pouco explorada. O que merece ser revisado por se tratar de uma abordagem com potencial para se alcançar estilos de cervejas diferenciados ou mesmo novos.

3.3 Leveduras Não-Convencionais

A categoria de leveduras não-convencionais pode englobar uma grande variedade de espécies que, apesar de poderem apresentar rendimento fermentativo inferior e maior sensibilidade ao etanol, por vezes também demonstram potencial para geração de uma diversidade maior de compostos, incluindo ésteres, álcoois superiores e ácidos graxos, que agregam características interessantes de aromas e sabores. Muitas dessas linhagens já foram consideradas contaminantes e deteriorantes de bebidas fermentadas, no entanto, com o decorrer do tempo passou-se a reconhecer o valor que podem agregar às bebidas quando usadas em processos monitorados (GSCHAEDLER, 2017).

A utilização de leveduras não-convencionais já ocorre na produção de algumas cervejas especiais, como no caso de cervejas do tipo *Sour* e do estilo alemão *Berliner Weiße*, que empregam *Dekkera bruxellensis*, e algumas cervejas africanas cuja fermentação envolve o uso de *Schizosaccharomyces pombe*. Produção de cervejas com baixo teor alcoólico também podem ser obtidas usando-se *Saccharomycodes ludwigii* no processo fermentativo, enquanto espécies de *Torulaspora delbrueckii* podem ser inoculadas durante a produção de cervejas de trigo para incorporação de aromas frutados (HUTZLER et al., 2015).

Em processos tradicionais e icônicos de fermentação espontânea, como é o caso da produção das *Lambics* belgas, sabe-se que uma diversidade de espécies pode estar envolvida, incluindo os seguintes atores: *Debaryomyces* spp., *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranefaciens*, *Candida friedrichii*, *Naumovia Castelli*, *Dekkera anomala* e *Priceomyces* spp. Já nas cervejas americanas do tipo *Coolship Ale*, já se documentou também a ocorrência de *Cryptococcus keulingii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida krusei*, *Pichia fermentans* e *Pichia opuntiae* (HUTZLER et al., 2015).

Uma vez que a grande maioria dessas leveduras não-*Saccharomyces* referem-se a cepas não domesticadas, parte-se da premissa que as características de fermentação apresentam maior variação de parâmetros do que as encontradas tradicionalmente. Por isso, nos últimos anos diversas pesquisas têm buscado um melhor entendimento a respeito da natureza e atividade fermentativa dessas linhagens (CAPECE et al., 2018a). Apesar de a indústria cervejeira ainda apresentar certa resistência quanto à utilização desse tipo de inóculo, alguns resultados já

demonstram o grande potencial desses microrganismos, inclusive quando considerados em inoculações mistas ou sequenciais com *S. cerevisiae*. Trata-se de uma alternativa de melhoria e inovação de bebidas, introduzindo diversidade e muitas oportunidades de exploração para a produção de cervejas (BELLUT et al., 2018; OSBURN et al., 2018; STEENSELS et al., 2015; TOH; CHUA; LIU, 2018).

Michel et al. (2016b) e Capece et al. (2018a) enfatizaram o grande potencial que leveduras não-*Saccharomyces* conseguem apresentar para o desenvolvimento de cervejas com diferentes teores alcoólicos, além da geração de uma ampla gama de compostos químicos de interesse. Eles destacaram as diversas habilidades que essas leveduras apresentam em relação a metabolização de carboidratos do mosto e produção de substâncias aromáticas ativas, como ésteres, monoterpênicos, álcoois superiores, fenóis e ácidos orgânicos. O fator mais importante relacionado a essas leveduras está ligado ao potencial de produção de uma variedade de compostos de importância organoléptica. Nesse sentido, a multiplicidade metabólica identificada em distintas espécies e cepas abre um leque de possibilidades de exploração, fazendo-se necessário desenvolver um método de caracterização para rastrear e selecionar cepas com perfis específicos e desejados (GSCHAEDLER, 2017).

Um sistema de triagem foi realizado por Methner et al. (2019) com 110 cepas pertencentes aos gêneros *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Nakazawaea*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Zygorulaspora* para determinar a habilidade de fermentação, produção de etanol e compostos aromáticos de interesse. Bellut et al. (2018) avaliou a capacidade de cinco cepas *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces kombuchaensis* com foco no desenvolvimento de cervejas com teor alcoólico reduzido. Enquanto um trabalho com vários isolados de cinco espécies *Hanseniaspora vineae*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces japonicus* e *Wickerhamomyces anomalus* teve resultados interessantes quanto a produção de ácido láctico, posicionando-as como alternativas viáveis para a acidificação primária de cervejas do estilo *sour*, chegando inclusive a substituir o uso de bactérias lácticas durante o processo (OSBURN et al., 2018).

Nesse sentido, fica evidente a importância da investigação dentre a grande variedade de leveduras não-convencionais existentes. A possibilidade de produção de bebidas com maior complexidade organoléptica por métodos de bioaromatização, assim como de baixo teor alcoólico e carboidratos reduzidos sem perda de aromas e sabores, incentiva estratégias para

utilização de linhagens não-*Saccharomyces* na produção de cervejas (CAPECE et al., 2018b; CUBILLOS et al., 2019; MICHEL et al., 2016a; VANDERHAEGEN et al., 2003).

3.3.1 Bioaromatização

A bioaromatização pode ser descrita como a utilização de métodos biológicos para síntese e/ou transformação de compostos aromáticos naturais. No que se refere à produção de cervejas, existem diversas possibilidades de modulação da fermentação por meio da manipulação das leveduras empregadas (VANDERHAEGEN et al., 2003). Sabe-se que o sabor e aroma da cerveja são derivados da soma de inúmeros compostos gerados durante as etapas de sua produção. No entanto, o nível de cada um dos compostos oriundos da fermentação e maturação (*e.g.* ácidos orgânicos, ésteres, álcoois superiores e aldeídos) definem o perfil organoléptico das bebidas, e são dependentes das condições fisiológicas das leveduras, podendo variar em função da linhagem utilizada (SAERENS et al., 2010).

Sendo assim, o uso controlado de leveduras não-*Saccharomyces* se apresenta como uma opção viável para aumentar as possibilidades de sabores e aromas nas cervejas. Estas leveduras apresentam diferenças nos padrões fermentativos e, dependendo das condições a que são expostas, podem produzir grande variedade de compostos sensorialmente importantes (ESTELA-ESCALANTE, 2018).

Dentre as leveduras não-convencionais, *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* é o exemplo de maior relevância associado a fermentações de cerveja. Desempenha papel importante no perfil organoléptico de cervejas do tipo *sour*, como as belgas *Lambics* e trapistas, as americanas *Coolship ales* e as alemãs *Berliner Weisse* (CRAUWELS et al., 2015; SPITAEELS et al., 2014). Essa espécie atrai atenção por sua natureza acidogênica, capacidade de produzir uma gama de álcoois superiores e diversos ésteres que contribuem para uma percepção sensorial mais complexa (DE BARROS PITA et al., 2019).

Em estudo investigando o potencial de bioaromatização de 17 linhagens não-convencionais, através de inoculações sequenciais com *S. cerevisiae*, foi possível observar o aumento de ésteres e compostos fenólicos. O uso de leveduras do gênero *Brettanomyces* promoveu aumento na concentração de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol nos produtos, compostos interessantes quando se deseja notas picantes na cerveja. Altas quantidades de acetato de isoamila foram obtidas a partir de fermentações com *Pichia kluyverii*, aumentando as notas frutadas da cerveja, enquanto *Torulaspora delbrueckii* potencializou a concentração de 4-vinil-guaiacol, responsável por notas de cravo (HOLT et al., 2018). Linhagens de *T. delbrueckii* também são mencionadas quanto à produção de maiores concentrações de álcool amílico (notas

frutadas), além de se mostrarem resilientes a diversas condições estressantes durante a fermentação (CANONICO et al., 2016; MICHEL et al., 2016b).

Realizando um sistema de triagem com espécies isoladas de diferentes substratos, a fim de avaliar a contribuição para o perfil sensorial de cervejas do tipo *lager*, Ravasio et al. (2018) identificaram grande variedade de compostos voláteis em todas as amostras. Ésteres e álcoois foram os grupos de compostos com maior fator de diferenciação entre as espécies de *H. guilliermondii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *P. kluyveri* e *T. delbrueckii*, com destaque para o álcool isoamílico (aroma de banana) e 2-feniletanol (aroma de rosa).

Em estudo conduzido com *Pichia* spp. em sistemas de fermentações sequenciais, Saerens e Swiegers (2013) notaram aumento considerável nos níveis de ésteres. Diante do resultado propuseram o uso destas linhagens para produção e aprimoramento no sabor de cervejas. Da mesma maneira, *Torulopsis utilis*, sinônimo de *Candida utilis* e frequentemente referida como levedura *Torula*, despertou o interesse quanto as possibilidades de sua utilização, propiciando boas propriedades nutritivas ao produto, assim como a produção de sabor agradável devido ao alto conteúdo de glutamato (sabor umami) que chega a liberar (BUERTH; TIELKER; ERNST, 2016).

Em estudo de bioprospecção de leveduras, Osburn et al. (2018) isolaram 284 cepas de um total de 54 espécies, coletadas da casca de diferentes espécies de árvores, amoreira e pimentão. Dentre elas, cinco espécies (*H. vineae*, *Lachancea fermentati*, *L. thermotolerans*, *Schizosaccharomyces japonis* e *Wickerhamomyces anomalus*) apresentaram perfis interessantes quanto a produção de ácido láctico e etanol, além de agregarem características organolépticas agradáveis ao produto, posicionando-as como alternativas para a produção de cervejas *sours*. Neste caso, a aplicação dessas leveduras também pode representar uma alternativa ao uso de bactérias lácticas, normalmente utilizadas para a produção desse estilo de cerveja.

Investigando o uso de *Lachancea thermotolerans*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Zygorhiza florentina* em fermentações conduzidas com seus inóculos puros e em fermentações mistas com cepa comercial de *S. cerevisiae*, Canonico et al. (2019) observaram melhorias significativas no perfil sensorial das cervejas provenientes das fermentações mistas, estabelecendo uma estratégia adequada para obtenção de produtos com compostos aromáticos diferenciados.

É possível observar em diversos estudos, como os acima citados, as inúmeras vantagens que o emprego de leveduras não-*Saccharomyces* podem fornecer para a modulação dos compostos aromáticos e o aprimoramento sensorial de cervejas. Além disso, mostra-se como uma alternativa de inovação interessante para a indústria a realização de investigações sobre a

utilização destas leveduras com o objetivo de introduzir novos sabores e produzir cervejas especiais de maior valor agregado (VANDERHAEGEN et al., 2003).

3.3.2 Cervejas com baixo teor alcoólico

Uma das tendências em destaque no mercado cervejeiro consiste na produção de cervejas com baixo teor alcoólico (*low-alcohol*) ou sem álcool (*alcohol-free*) que ainda permaneçam com qualidade e perfil organoléptico agradável. Essa tendência é reflexo do aumento no interesse dos consumidores por esse tipo de produto, decorrente da maior preocupação com saúde, possibilidade de menor ingestão calórica e conscientização sobre consumo responsável (MÜLLER et al., 2017).

As cervejas sem álcool e com baixo teor alcoólico são classificadas de acordo com a quantidade de álcool presente no produto, esses limites são definidos e regulamentados diferentemente por cada país. No Brasil, conforme art. 11, da Instrução Normativa nº 65, de 2019, cerveja sem álcool é aquela cujo conteúdo alcoólico é inferior ou igual a 0,5% (v/v), enquanto cerveja com baixo teor alcoólico apresenta conteúdo alcoólico entre 0,5% e 2% (v/v) (BRASIL, 2019). Essas cervejas podem ser produzidas por métodos físicos ou biológicos. Os processos físicos se baseiam na remoção do álcool de uma cerveja comum, após fermentação, por meio de técnicas térmicas (retificação e evaporação) ou por uso de membranas (diálise ou osmose reversa). As abordagens biológicas mais difundidas envolvem a limitação da formação de etanol durante a fermentação, no qual o metabolismo da levedura pode ser reprimido com aplicação de temperatura (resfriamento ou pasteurização) ou por meio da remoção rápida do fermento (centrifugação ou filtração) (BRÁNYIK et al., 2012).

No entanto, esses métodos tradicionalmente empregados para remoção de etanol podem gerar perdas significativas de componentes aromáticos e aumentar sabores desagradáveis do mosto. Nesse sentido, novos métodos são avaliados visando a produção de bebidas com menor teor alcoólico, mas que mantenham um bom perfil organoléptico (BRÁNYIK et al., 2012). A utilização de leveduras que apresentam capacidade limitada de metabolização de açúcares do mosto, como a maltose e maltotriose, mas que continuem produzindo composto aromáticos desejáveis se apresentam como uma estratégia viável para a produção deste tipo de cerveja (YEO; LIU, 2014).

Essa abordagem não exige grandes mudanças para a cervejaria, apenas ajustes no fermento empregado. Neste caso, a fermentação cessa naturalmente com a depleção dos açúcares, evitando a extração involuntária de compostos importantes, comum quando os processos físicos são aplicados (ERTEN; CAMPBELL, 2001). Estratégias de utilização de

leveduras não-convencionais selecionadas se mostram como alternativas nesse cenário (MICHEL et al., 2016a). O desafio está na seleção de linhagens que, além da incapacidade de metabolizar todos os açúcares, sejam também capazes de produzir compostos aromáticos interessantes que minimizem o sabor dos açúcares residuais que permanecem na cerveja (VARELA; VARELA, 2019). *Saccharomyces ludwigii* é um exemplo do uso de levedura não-*Saccharomyces* para esse fim que, devido à ineficiência em fermentar maltose e maltotriose do mosto, produz baixas concentrações de álcool, e ainda desenvolvem compostos aromáticos importantes, como ésteres e álcoois superiores. (BELLUT; ARENDT, 2019). No entanto, como demonstrado por De Francesco et al. (2015) a produção de ésteres e etanol parece ser uma característica cepa-dependente. Apesar da espécie *S. ludwigii* ser utilizada comercialmente o uso de outras leveduras não-*Saccharomyces* podem ser potencialmente interessantes para a produção de bebidas sem álcool ou com baixo teor alcoólico (GSCHAEDLER, 2017; MICHEL et al., 2016b).

Saerens e Swiegers (2014), conseguiram desenvolver cervejas com baixo teor alcoólico usando cepas de *Pichia kluyveri* incapazes de fermentar maltose, sem comprometer a concentração de compostos aromáticos. Em comparação direta com linhagem de *S. ludwigii*, a *P. kluyveri* se apresentou mais adequada, devido a menor quantidade de álcool gerado e maior produção de ésteres desejáveis.

Em triagem realizada por Vanrijswijck et al. (2017) com 24 cepas de *Pichia kudriavzevii*, constatou-se o consumo limitado de maltose e maltotriose, com a obtenção de cervejas com concentrações finais de etanol variando entre 0,5% a 0,8% (v/v), além da grande quantidade de ésteres voláteis em comparação com isolados de *S. cerevisiae*. No mesmo estudo, um isolado de *P. kudriavzevii* foi utilizado em co-cultivo com uma linhagem cervejeira de *S. cerevisiae* e comparado com a mesma linhagem em monocultura. Quantidades menores de maltose e maltotriose foram consumidas em sistema de co-cultivo, induzindo a menor formação de etanol e mesma quantidade de ésteres e álcoois voláteis, quando comparado a condição de monocultura.

O uso da levedura *Torulaspora delbrueckii* para produção de cervejas de trigo foi proposto por Tataridis et al. (2013), apresentado consumo mais lento de maltose, em relação a uma linhagem comercial de *S. cerevisiae*, mas resultando em uma bebida com perfil sensorial mais intenso e complexo. Outras investigações mostraram que diferentes cepas dessa espécie podem apresentar divergências quanto à habilidade em fermentar os açúcares do mosto, apesar de ainda manterem a característica intrínseca de produção de aromas frutados agradáveis. Portanto, ajustes na composição do mosto ou na quantidade de seus açúcares, assim como na

maneira de inoculação (pura ou mista) pode ser uma estratégia interessante para utilização dessa espécie na produção de cervejas com baixo teor alcoólico mas com perfil aromático mais complexo que uma cerveja convencional (CANONICO et al., 2016; MICHEL et al., 2016b).

Em investigação com cinco cepas não-*Saccharomyces* isoladas de kombucha (chá fermentado), *Hanseniaspora valbyensis*, *H. vineae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, Bellut et al. (2018) analisaram a aplicação na produção de cervejas sem álcool em comparação com cepas comerciais de *Saccharomyces ludwigii* e *S. cerevisiae*. As linhagens mostraram incapacidade em fermentar maltose e maltotriose, apresentaram comportamento negativo para aromas fenólicos alterantes (*Phenolic Off-Flavors*) e cresceram em mosto com alta concentração de lúpulo. Cervejas fermentadas com essas linhagens não puderam ser discriminadas daquelas produzidas com o controle comercial (*Saccharomyces ludwigii*), indicando grande potencial para esse tipo de aplicação.

O uso de *Lachancea fermentati* também foi considerado para a produção de cerveja com baixo teor alcoólico em mosto de baixa gravidade. Bellut et al. (2019) comprovaram que essa levedura mostrou ser incapaz de metabolizar maltotriose, não exibiu produção de aromas alterantes, não apresentou sensibilidade ao lúpulo, teve bom desempenho de propagação e produção significativa de ácido láctico, com grande potencial para produção de cervejas tipo *sour* com baixo teor alcoólico.

Os diversos estudos já desenvolvidos comprovam como a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* para a produção de cervejas com teor alcoólico reduzido pode ser uma estratégia para expansão da indústria cervejeira. Além da baixa produção de etanol, essas linhagens podem contribuir para a obtenção de sabores peculiares nas cervejas, agregando valor e maior interesse dos consumidores pelos produtos (BELLUT; ARENDT, 2019).

3.3.3 Cervejas de baixa caloria

Em função das novas tendências de alimentação e busca por saúde e bem-estar por parte dos consumidores, outro ponto que tem surgido na mira da indústria cervejeira é a pesquisa e desenvolvimento em cervejas com menor teor calórico (YEO; LIU, 2014). Essas cervejas podem ser obtidas por meio de duas estratégias: a primeira envolve a preparação do mosto com ajustes de seus açúcares, aumentando a fração dos açúcares simples e diretamente fermentescíveis; a segunda se baseia na condução da fermentação em condições específicas e com uso de enzimas exógenas para hidrólise dos açúcares complexos, não metabolizados facilmente pela levedura (MATTHEWS; BYRNE; HENNIGAN, 2001).

O mosto cervejeiro é composto por açúcares fermentescíveis e açúcares complexos que não são facilmente fermentáveis, como dextrinas. Esses açúcares permanecem na cerveja como resultado da hidrólise incompleta do amido pelas leveduras e representam cerca de 75% dos sólidos residuais da cerveja, tornando-a mais calórica (GUERRA et al., 2009). Diante disso, o mosto pode ser preparado por meio de alguns métodos, como adição de adjuntos altamente fermentescíveis (xarope de sacarose ou glicose) durante a brassagem ou fervura, glucoamilases durante brassagem ou pré-fervura, maltes especiais que aumentem a fermentabilidade, ou por combinação de um ou mais desses métodos. As fermentações com mosto convencional em condições específicas podem ser conduzidas com adição direta de carboidratos com alta fermentabilidade ou adição de enzimas para conversão das dextrinas residuais (MATTHEWS; BYRNE; HENNIGAN, 2001).

No entanto, com maior quantidade de açúcares fermentescíveis presentes no mosto, mais álcool também será produzido durante a fermentação, visto que o etanol fornece maior valor energético (kcal/g) em comparação com os carboidratos, a produção de cervejas de baixa calorias só é possível com remoção posterior de parte do álcool (YEO; LIU, 2014). Cervejas deste estilo tendem a apresentar aspectos desfavoráveis de sabor, cor e aroma, além de serem frequentemente consideradas aguadas (*flat*), motivo pelo qual produzir essas cervejas sem perder o sabor equilibrado representa um grande desafio para a indústria cervejeira (MALFLIET et al., 2009).

Além dos métodos tradicionais, abordagens biológicas com a introdução de leveduras com maior atividade amilolítica emergem como uma oportunidade interessante para esse fim (YEO; LIU, 2014). Embora cepas industriais de *S. cerevisiae* não sejam capazes de fermentar açúcares complexos, algumas leveduras não-convencionais podem apresentar atividade amilase, produzindo essas enzimas que auxiliam na digestão dos açúcares e propiciando a obtenção de um produto com menos açúcar residual (OGATA; IWASHITA; KAWADA, 2017). Seria o caso de leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera* que apresentam capacidade de fermentar diversas fontes de carbono, incluindo açúcares complexos, graças a enzima α -glucosidase, reduzindo assim a concentração de açúcares residuais e permitindo a produção de cervejas “superatenuadas” (STEENSELS et al., 2015). O consumo superior dos açúcares gera níveis de etanol mais elevados, no entanto, apesar de baixas concentrações de açúcares residuais o valor energético do etanol é mais alto, sendo necessária a remoção de parte do álcool para obtenção de um produto de baixa caloria (CAPECE et al., 2018a).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP.

4.1 Linhagens de leveduras

As linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* avaliadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela empresa Smart Yeast (código SYL), pela Prof.^a Dr.^a Sandra R. Ceccato Antonini da coleção de culturas (código CCA) do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), UFSCar – *campus* Araras/SP e resgatadas da coleção do antigo Instituto Zimotécnico (código IZ) do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), ESALQ/USP. A linhagem cervejeira comercial tipo *ale* US-5 (Fermentis, Lesaffre, França) foi incluída a nível de comparação. Na Tabela 1 estão descritas suas características de origem.

Tabela 1. Linhagens de leveduras utilizadas no trabalho e descrição taxonômica

Código	Espécies	Origem	Fase Anamórfica	Sinonímia
SYL-1	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Cerveja envelhecida em barril	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> ; <i>Brettanomyces intermedius</i>	
CCA059	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Água de diluição Destilaria		<i>Dekkera intermedia</i> ;
CCA077	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Fermento Destilaria		<i>Dekkera abstinens</i> ;
CCA155	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Vinho Destilaria		<i>Dekkera lambica</i>
SYL-24	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Cachaça	<i>Kloeckera apiculata</i> ; <i>Kloeckera apis</i>	<i>Hanseniaspora apuliensis</i> ;
SYL-54	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Cachaça	<i>Kloeckera africana</i> ; <i>Pseudosaccharomyces africanus</i>	<i>Acaromyces laviae</i> <i>Vanderwalia vineae</i> ; <i>Kloeckeraspora vineae</i>
IZ-288	<i>Pichia klyveri</i>	ATCC9768		<i>Hansenula kluyveri</i>
SYL-1.13	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Cachaça	<i>Candida solicola</i> ; <i>Candida hinoensis</i> ; <i>Candida acidothermophilum</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> ; <i>Pichia orientalis</i>
IZ-379	<i>Pichia membranifaciens</i>	HANSEN (UVV41)		<i>Pichia chodatii</i> var. <i>fermentans</i> ; <i>Pichia membranifaciens</i> var. <i>sicereum</i>
SYL-48	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Cachaça	<i>Candida colliculosa</i> ; <i>Torulopsis taboadae</i>	<i>Saccharomyces florenzanoii</i> ; <i>Torulaspora benedictae</i>
IZ-1966	<i>Torulopsis colliculosa</i>	IMAP		<i>Torulopsis stellata</i> var. <i>cambresieri</i> ; <i>Torulopsis taboadae</i>
IZ-300	<i>Torulopsis utilis</i>	ATCC9255		<i>Candida utilis</i> ;
SafAle US-05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cepa comercial (Fermentis®)		<i>Candida amidovorans</i>

Registros taxonômicos de acordo com Mycobank database:

<http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home> (Acesso: julho de 2020).

4.2 Resgate, reativação e preservação

As linhagens SYL encontravam-se congeladas em solução de leite (Skim Milk 100g/L, Neogen, EUA) e foram reativadas diretamente em placas de Petri contendo meio sólido YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) com cloranfenicol (100 mg/L). Uma alíquota de 20 µL de cada cultura homogeneizada foi estriada em placa, incubada a 28 °C até crescimento visível das colônias. As linhagens CCA foram recebidas reativadas em meio YPD.

Tentativas de resgate foram realizadas com seis linhagens pertencentes à coleção IZ-ESALQ, no entanto, não houve sucesso com todos os isolados. Os isolados são antigos e sem registro de manutenção recente. As tentativas de reativação foram realizadas em meio YPD líquido, através da coleta de uma alçada, incubadas a 28°C até crescimento aparente; 20 µL foram então transferidos e estriados em placa de Petri contendo meio YPD para recuperação de colônias puras.

Todos os isolados puros recuperados foram posteriormente cultivados em meio YPD ágar inclinado (*slant*) e armazenados a 4°C. Adicionalmente, as linhagens foram acondicionadas em microtubos com solução de leite (Skim Milk 100g/L, Neogen, EUA) a partir de culturas frescas e conservadas a -20°C.

Ao final da reativação 12 linhagens foram utilizadas para este trabalho (Tabela 1).

4.3 Caracterização das linhagens de leveduras

A caracterização das leveduras avaliadas neste trabalho foram: assimilação de diferentes açúcares, capacidade fermentativa, capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio, tolerância ao etanol e potencial de geração de aromas.

4.3.1 Crescimento em diferentes fontes de açúcares

As linhagens foram avaliadas quanto a habilidade de crescimento em diferentes fontes de açúcares em meio mínimo por meio da metodologia de microcultivo; o monitoramento foi realizado por leitura de absorbância a 620nm em leitora de microplacas Sunrise (Tecan, RChisto).

Para isso, cada linhagem foi previamente reativada em meio sólido YPD (48 h, 30 °C) e a biomassa ressuspensa em 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%). As suspensões celulares foram ajustadas para 1 DO_{620nm} após leitura em espectrofotômetro (Micronal, modelo B382), correspondendo a aproximadamente 3×10^7 cél/mL (AUSUBEL et al., 1992). Os ensaios de cinética de crescimento foram realizados em triplicado em placas *microtiter* de 96 poços com fundo chato, contendo meio YNB (Yeast Nitrogen Base 13,4 g/L, Sigma-Aldrich, EUA) sem aminoácidos acrescido das seguintes fontes de carbono isoladamente: sacarose, glicose, frutose e maltose (20 g/L).

Em cada poço foram inoculados 50 µL da diluição $10^{-1} \times$ da suspensão celular obtida e 50 µL de meio YNB. Para o controle branco foi utilizado 50 µL de solução salina no lugar da suspensão celular. As microplacas foram incubadas a 27°C e as leituras realizadas automaticamente a intervalos de 1 hora, durante 60 horas.

A partir dos resultados obtidos, foi determinado a densidade máxima de crescimento (DO_{máx}) e a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$ (h⁻¹)) para cada linhagem. A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada por regressão linear a partir de gráficos de $\ln X$ vs. tempo (HISS, 2001).

4.3.2 Teste de capacidade fermentativa

Os ensaios para avaliação da capacidade fermentativa foram conduzidos em tubos de fermentação *Einhorn* graduados (escala volumétrica 5 mL) contendo mosto cervejeiro primário (89% malte Pilsen, 7% malte Vienna, 4% malte Munich Light), 11,6 °P e pH 5,02.

Cada tubo contendo 10 mL de mosto foi inoculado com uma alíquota de 1 mL (1 DO_{620nm}) de suspensão de células frescas (previamente crescidas a 30 °C por 48 horas) de cada

linhagem; os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas. A fermentação foi monitorada quanto ao deslocamento do líquido em cada sistema devido à liberação de dióxido de carbono.

4.3.3 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio

O potencial de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi determinado após crescimento em meio sólido LA (extrato de levedura 5 g/L, peptona 3 g/L, glicose 40 g/L, sulfato de amônio 0,2 g/L, acetato de chumbo neutro 1 g/L, ágar 20 g/L) (ONO et al., 1991).

Uma alíquota (10 µL) da suspensão celular de cada linhagem reativada foi inoculada em placas contendo meio LA, em triplicata. As placas incubadas a 30 °C por sete dias. Após o período de incubação, os resultados do potencial de produção de H₂S foram estimados pelo grau de pigmentação marrom das colônias, expressos como negativo (-) ou positivo na seguinte classificação: fraca (+), média (++) e alta (+++).

4.3.4 Avaliação de sensibilidade ao etanol

As linhagens foram avaliadas em relação a sua sensibilidade ao etanol em meio sintético acrescido de etanol (CHEMCO, Hortolândia, Brasil) nas seguintes concentrações: 7%, 10% e 12% (v/v).

Cada linhagem foi previamente reativada em meio sólido YPD (48 h, 28 °C); a biomassa ressuspendida teve a concentração ajustada para 1 DO_{620nm}. Após diluições sucessivas em série 1:10, foram inoculados 7 µL de diluição 10⁻²×, 10⁻³×, 10⁻⁴× e 10⁻⁵× de cada linhagem nas placas contendo meio YPD/etanol. As placas foram incubadas a 30°C por cinco dias (SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012).

4.3.5 Caracterização aromática

O potencial de geração do aroma alterante de perfil POF (*Phenolic Off-Flavor*), caracterizado por formação do composto 4-vinil-fenol e descrito sensorialmente como fenólico, medicinal e picante (LENTZ, 2018) foi estimado de acordo com Meier-Dörnberg et al. (2017).

Uma alçada de cada linhagem foi estriada em placas contendo meio sólido YM (extrato de malte 3 g/L, extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, glicose 11 g/L, ágar 20 g/L) acrescido do precursor ácido *p*-cumárico (10 mL/L) e incubadas por três dias a 24°C. Para a solução de ácido *p*-cumárico, foram dissolvidos 0,1 g em 10 mL de etanol 96% (v/v) e adicionados após autoclavagem do meio. Após o período de incubação as placas passaram por teste sensorial olfativo por um painel de cinco avaliadores previamente treinados.

A fim de acessar a possível formação de outros aromas, assim como sua intensidade, um volume de suspensão celular (500 µL) de cada linhagem reativada e com concentração ajustada para 1 DO_{620nm}, foi inoculado em frascos com tampa contendo mosto cervejeiro primário (11,6 °P), acrescido de ágar (20 g/L). Após o período de incubação de sete dias a 30°C os frascos passaram por testes olfativos para detecção de aromas.

4.4 Ensaios de Microfermentação

Os ensaios de microfermentações foram conduzidos em frascos Erlenmeyer estéreis, em duplicata, contendo 100 mL de mosto cervejeiro (estilo *Munich Helles* - 10,9 °P e pH 5,02), da seguinte maneira: com inóculos puros e com estratégia de inoculação sequencial usando cepa *S. cerevisiae*.

O mosto foi inoculado com as leveduras não-convencionais selecionadas na etapa anterior: *Dekkera bruxellensis* SYL-1; *D. bruxellensis* CCA077; *Hanseniaspora vineae* SYL-54; *Torulaspora delbrueckii* SYL-48 e com a linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* US-05. Cada frasco foi inoculado na razão estimada de 3×10^6 cél/mL e a fermentação conduzida por sete dias, na temperatura de 24°C, sem agitação. Nas fermentações conduzidas sequencialmente a segunda inoculação foi realizada com a linhagem de *S. cerevisiae* US-05 após 72 h do início para as espécies *H. vineae* SYL-54 e *T. delbrueckii* SYL-48, e após 96 h do início para as cepas *D. bruxellensis* SYL-1 e *D. bruxellensis* CCA077.

Para a suspensão celular cada linhagem foi previamente reativada em meio YPD líquido (30 °C, por 48 h, sem agitação). Após período de incubação, foram transferidas para meio fresco e cultivadas sob agitação (170 rpm, 30°C) durante 48 horas. Previamente à inoculação estimou-se a concentração de células viáveis da suspensão de cada linhagem por contagem ao microscópio e o volume necessário para que cada cepa fosse inoculada na razão de 3×10^6 cél/mL. O volume de suspensão para cada linhagem foi variável, portanto, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, 3 minutos em minicentrífuga (KASVI K14-1215), o sobrenadante descartado, as células ressuspendidas em 500 µL do próprio mosto e inoculadas.

As fermentações foram monitoradas em função da perda de massa do sistema (frasco + mosto inoculado) considerando-se a liberação de dióxido de carbono, partindo-se da pesagem no início da fermentação e seguindo com pesagens a cada 12 h.

Com o objetivo de acompanhar a dinâmica populacional nos sistemas, uma amostra de cada fermentação, após leve agitação, foi coletada a partir da posição central do frasco a cada 24 h para posterior cultura por meio do método de microplaqueamento em gotas (SILVA et al., 1996). Para isso, placas contendo meio YPD acrescidas de cloranfenicol foram utilizadas para

o plaqueamento das amostras provenientes das microfermentações puras, enquanto o meio seletivo WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar 80g/L, Neogen, EUA) foi utilizado para as amostras coletadas das microfermentações sequenciais. Após diluição seriada em solução salina (NaCl 0,9%), uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi inoculada com três repetições para cada diluição ($10^{-3}\times$, $10^{-4}\times$, $10^{-5}\times$, $10^{-6}\times$). As placas foram mantidas em repouso até absorção completa das gotas e incubadas a 30°C, até detecção visual do crescimento das microcolônias. Após o período de incubação foram realizadas as contagens do número de colônias nas diluições que apresentaram entre 4 e 40 colônias para cada gota depositada.

A concentração de células das amostras foi calculada em função do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por volume, conforme a equação apresentada a seguir:

$$UFC/mL = n \times \left(\frac{1}{0,010} \right) \times d$$

Onde:

n = média do número de colônias contadas em 3 repetições;

(1/0,010) = fator de correção para converter o volume para mL;

d = diluição escolhida para contagem de 4 a 40 colônias.

Após sete dias de incubação, os frascos foram armazenados por cinco dias a 4 °C para promover a decantação das células e facilitar a coleta. As amostras foram centrifugadas (4.000 rpm, 7 min) para separação da biomassa e do sobrenadante (“cerveja verde”), considerando-se este para análise do teor de etanol (% v/v), atenuação aparente do mosto (% de fermentabilidade), acidez total titulável (g ácido acético/L) e pH.

4.5 Análises físico-químicas

4.5.1 Viabilidade celular

A contagem para determinação da viabilidade celular e número de células por volume foi realizada mediante análise microscópica por coloração diferencial das células com solução corante azul de metileno/citrato. As células foram contadas em câmara de Neubauer, levando em consideração que as células não-viáveis apresentam coloração azulada e aquelas viáveis permanecem incolores (CECCATO-ANTONINI, 2012). A viabilidade foi expressa em porcentagem em razão do número de células vivas pelo total de células (vivas e mortas).

Os cálculos para determinação do número de células por volume foram realizados conforme a equação apresentada a seguir:

$$\text{Número de céls/mL} = (T/5) \times 25 \times d \times 10^4$$

Onde:

T = total de células viáveis nos 5 quadrículos, sendo um de cada canto e um central

d = diluição

4.5.2 Determinação de pH

O pH de cada amostra foi determinado com potenciômetro digital, após agitação para remoção de gases da amostra (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). 10^4

4.5.3 Acidez total titulável

As amostras fermentadas foram submetidas a análise da acidez total por meio de titulometria de neutralização. As amostras foram preparadas com adição de água destilada, seguidas de titulação com hidróxido de sódio 0,1N até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4), utilizando pHmetro. A acidez total pode ser calculada com base na quantidade de solução de NaOH gasto em relação ao volume da amostra (ZAGO et al., 1996).

Os cálculos da acidez total titulável, expressa em gramas de ácido acético por litro, foram realizados conforme equação apresentada a seguir:

$$\text{Acidez total titulável} = \frac{n \times f \times N \times 60}{V}$$

Onde:

n = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL)

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

60 = equivalente do ácido acético (CH_3COOH)

V = volume da amostra (mL)

4.5.4 Atenuação aparente do mosto

A proporção de sólidos dissolvidos no mosto que é consumido pelas leveduras durante fermentação é denominada de atenuação aparente ou fermentabilidade e foi calculada em função da gravidade original (GO) do mosto em relação à gravidade final (GF) do produto fermentado. A gravidade original de um mosto pode ser expressa em graus °Plato (°P) e mede

a concentração em termos de peso/peso, ou seja, uma solução contendo 1 °P tem a mesma gravidade específica que uma solução contendo 1 grama de sacarose em 100 gramas de solução (BRIGGS et al., 2004).

Os cálculos da atenuação aparente/fermentabilidade do mosto foram realizados conforme a equação apresentada a seguir:

$$\text{Atenuação aparente ou fermentabilidade (\%)} = \left(\frac{GO (^{\circ}P) - GF (^{\circ}P)}{GO (^{\circ}P)} \right) \times 100$$

Onde:

GO = gravidade original do mosto, expressa em °P

GF = gravidade final do fermentado, expressa em °P

4.5.5 Teor alcoólico

A concentração de etanol foi determinada por destilação prévia da amostra em microdestilador Kjeldahl e posterior leitura em densímetro digital (ZAGO et al., 1996).

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a fim de identificar ocorrência de diferenças significativas entre suas médias. As médias foram comparadas por teste de Tukey (teste de comparações múltiplas) com grau de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o software SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1996).

Para as curvas de crescimento em diferentes fontes de açúcares foi utilizado o software R Project for Statistical Computing por meio do pacote Growthcurver (SPROUFFSKE; WAGNER, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linhagens de leveduras não-*Saccharomyces*, previamente isoladas e resgatadas de diferentes ambientes, foram avaliadas fisiológica e tecnologicamente para determinação do potencial de utilização no processo cervejeiro. Inicialmente, as linhagens foram caracterizadas a fim de se conhecer suas capacidades e limitações fisiológicas diante de alguns parâmetros (crescimento em diferentes fontes de açúcares; capacidade fermentativa; sensibilidade ao etanol; caracterização aromática). Após seleção, quatro linhagens foram utilizadas como inóculos em ensaios de fermentação com mosto cervejeiro, considerando fermentações com inóculos puros e sistemas com inoculação sequencial com uma linhagem cervejeira comercial *S. cerevisiae*.

5.1 Caracterização das linhagens

Visando selecionar leveduras não-*Saccharomyces* com potencial para a produção de cervejas especiais, foram avaliadas linhagens provenientes da coleção do antigo Instituto Zimotécnico (Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP), linhagens cedidas pela empresa Smart Yeast e linhagens da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (UFSCar, Araras/SP), conforme indicado na Tabela 1.

Após tentativas de resgate com seis linhagens pertencentes à coleção IZ-ESALQ, apenas quatro foram reativas com sucesso, visto que as amostras são antigas e sem manutenção recente. Um total de 12 linhagens de leveduras não-*Saccharomyces*, além da linhagem cervejeira comercial US-05 (Fermentis) foram avaliadas e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1.1 Crescimento em diferentes fontes de açúcares

O perfil de açúcares em um mosto depende dos ingredientes e do método de seu preparo. Em um mosto padrão, maltose é o açúcar com maior concentração, seguido de maltotriose e outras dextrinas. Menos de 15% da fração de açúcares consiste em glicose, frutose e sacarose, preexistentes no malte (LEWIS; YOUNG, 2002). A composição do mosto e a maneira como esses carboidratos são metabolizados pelas leveduras têm influência direta no perfil organoléptico e na concentração de etanol da bebida. Portanto, conhecer a capacidade das leveduras em utilizar diferentes fontes de açúcares é interessante para se estabelecer qual será o tipo de cerveja produzida (MICHEL et al., 2016a).

Sabendo-se que a utilização de carboidratos pode variar não só entre espécies, mas também entre as cepas de leveduras, as linhagens foram avaliadas quanto ao crescimento em

meio quimicamente definido contendo glicose, frutose, sacarose e maltose como única fonte de carbono por microcultivo e monitoramento da absorbância (DO_{620nm}). Os resultados do crescimento estão apresentados sequencialmente nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Curvas de crescimento em microcultivo (27 °C, 60h) em meio YNB com fontes de carbono isoladas.

D. bruxellensis SYL-1 (A), *D. bruxellensis* CCA059 (B), *D. bruxellensis* CCA077 (C), *D. bruxellensis* CCA155 (D), *H. guilliermondii* (E), *H. vineae* (F).

Figura 2. Curvas de crescimento em microcultivo (27 °C, 60h) em meio YNB com fontes de carbono isoladas.

P. kluyveri IZ-288 (A), *P. kudriavzevii* SYL-1.13 (B), *P. membranifaciens* IZ-379 (C), *T. delbrueckii* SYL-48 (D), *T. colliculosa* IZ-1966 (E), *T. utilis* IZ-300 (F).

Apesar das cepas apresentarem diferentes perfis de crescimento, os resultados mostram que quando o meio de cultivo contém apenas glicose ou frutose como fonte de açúcar, todas as cepas têm capacidade de crescimento, diferente do que é observado para sacarose e maltose. Sendo que as cepas *H. guilliermondii* SYL-24 (Fig. 1E), *H. vineae* SYL-54 (Fig. 1F) e *P.*

kluyveri IZ-288 (Fig. 2A) tiveram bom desenvolvimento apenas nos meios contendo esses açúcares, com crescimento ínfimo em sacarose e maltose ($DO_{m\acute{a}x} < 0,1$).

As cepas da espécie *D. bruxellensis* SYL-1, CCA059, CCA077 e CCA155 (Fig. 1A, B, C, D) apresentaram crescimento em todos os açúcares, porém o período de 60 h foi insuficiente para verificar o final da fase exponencial da linhagem CCA155 (Fig. 1D) em sacarose e maltose; o mesmo foi verificado para a linhagem IZ-379 em maltose (Fig. 2C). As linhagens *T. delbrueckii* SYL-48 (Fig. 2D), *T. colliculosa* IZ-1966 (Fig. 2E) e *T. utilis* IZ-300 (Fig. 2F) não apresentaram assimilação em maltose, exibindo crescimento muito baixo apenas nesse meio, $DO_{m\acute{a}x}$ 0,09; 0,1 e 0,15 respectivamente.

A cepa *T. delbrueckii* SYL-48 apresentou curvas de crescimento similares para frutose e sacarose, durante a fase exponencial (Figura 2D). Apesar da incapacidade dessa cepa de crescer em meio contendo maltose ($DO_{m\acute{a}x} < 0,1$), já foi observado que cepas pertencentes a *T. delbrueckii* são capazes de consumir diversas fontes de carbono, desde os mais simples, até açúcares mais complexos como, maltotriose, galactose, rafinose, entre outros. No entanto, também foi descrito que essa capacidade de consumo pode variar de acordo com a cepa, com algumas sendo incapazes de metabolizar até mesmo a maltose presente no mosto cervejeiro. Nestes casos, elas são apontadas com potencial para aplicação no desenvolvimento de cervejas com teor alcoólico reduzido (CANONICO et al., 2016; MICHEL et al., 2016b). Essa informação é de grande valia para a aplicação prática, visto que a cepa em estudo não apresentou crescimento significativo em maltose, permite a aplicação de algumas estratégias como inoculação sequencial com uma levedura cervejeira ou o direcionamento para cervejas com teor alcoólico reduzido.

A maioria das cepas de *Dekkera/Brettanomyces* são capazes de metabolizar uma ampla gama de fontes de carbono, incluindo carboidratos incomuns, além de conseguirem crescer em diversos substratos e meios pobres em nutrientes (COLOMER; FUNCH; FORSTER, 2019; WOOLFIT et al., 2007). As cepas de *D. bruxellensis* avaliadas neste trabalho, apresentaram boa assimilação em todas as fontes de açúcares, o que comprova boa capacidade de crescimento nas diferentes fontes de açúcares.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 1 e 2 foi possível obter a densidade óptima máxima ($DO_{m\acute{a}x}$) e calcular a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})) para cada linhagem estudada; na Tabela 2 estão apresentados esses resultados.

Tabela 2. Padrões de crescimento das linhagens de leveduras em meio quimicamente definido com diferentes fontes de carbono

Linhagem	Glicose		Frutose		Sacarose		Maltose	
	DO _{máx}	μ _{máx}	DO _{máx}	μ _{máx}	DO _{máx}	μ _{máx}	DO _{máx}	μ _{máx}
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)	1,01 ^{ab}	0,23 ^a	1,07 ^a	0,25 ^a	0,94 ^{bc}	0,23 ^a	0,91 ^c	0,29 ^a
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	0,98 ^a	0,22 ^b	0,91 ^{bc}	0,22 ^b	0,96 ^{ab}	0,28 ^a	0,89 ^c	0,19 ^b
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	0,95 ^a	0,31 ^a	1,02 ^a	0,23 ^a	0,96 ^a	0,30 ^a	0,91 ^a	0,19 ^a
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	0,98 ^a	0,29 ^b	1,03 ^a	0,31 ^b	0,61 ^b	0,50 ^a	0,52 ^c	0,48 ^a
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)	0,67 ^a	0,46 ^b	0,77 ^a	0,47 ^b	0,02 ^b	0,00 ^c	0,07 ^b	0,65 ^a
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	0,80 ^a	0,51 ^b	0,71 ^b	0,46 ^b	0,03 ^c	0,00 ^c	0,07 ^c	0,73 ^a
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	0,49 ^a	0,60 ^a	0,49 ^a	0,61 ^a	0,09 ^b	0,47 ^a	0,08 ^b	0,44 ^a
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	0,90 ^a	0,39 ^b	0,85 ^a	0,48 ^{ab}	0,13 ^b	0,53 ^{ab}	0,12 ^b	0,66 ^a
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	0,75 ^a	0,44 ^a	0,70 ^a	0,42 ^a	0,38 ^b	0,31 ^b	0,35 ^b	0,30 ^b
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)	1,08 ^a	0,48 ^a	1,02 ^b	0,51 ^a	1,01 ^b	0,39 ^a	0,09 ^c	0,62 ^a
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	0,68 ^a	0,41 ^a	0,68 ^a	0,41 ^a	0,66 ^a	0,40 ^a	0,10 ^b	0,46 ^a
<i>T. utilis</i> (IZ-300)	0,71 ^{ab}	0,36 ^a	0,68 ^b	0,35 ^a	0,75 ^a	0,35 ^a	0,15 ^c	0,43 ^a

Valores de densidade óptica máxima (DO_{máx}) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{máx}(h⁻¹)) em meio quimicamente definido (YNB_{2x}) contendo glicose, frutose, sacarose e maltose a 2%, como única fonte de carbono. Taxa de inoculação: ajustada para 1 DO_{620nm}. Condições de incubação: 27 °C, durante 60 h. Letras iguais na linha, para o mesmo parâmetro, indicam que não houve diferença significativa (p > 0,05) para o cultivo da levedura nos diferentes açúcares.

Dentre as 12 linhagens investigadas a maioria demonstrou formação de biomassa (DO_{máx}) inferior em meio contendo maltose. O passo inicial para a utilização de açúcares pela levedura é sua passagem através da membrana celular ou sua hidrólise fora da membrana, seguida da entrada na célula dos produtos gerados com essa quebra. A maltose (duas unidades de glicose) passa intacta pela célula por meio de um processo ativo, mediado por uma ou mais permeases, com sua posterior hidrólise realizada por enzimas maltase. Enquanto a sacarose é hidrolisada externamente pela enzima invertase e seus produtos, glicose e frutose, são absorvidos para o interior das células por difusão facilitada através de permeases, hexoses específicas (STEWART; HILL; RUSSELL, 2013).

Pode-se inferir que o desenvolvimento em sacarose encontrado nas cepas *D. bruxellensis* SYL-1, CCA059, CCA077, CCA155, *T. delbrueckii* SYL-48, *T. colliculosa* IZ-1966, *P. membranifaciens* IZ-379 e *T. utilis* IZ-300 está relacionada a capacidade de produzirem a enzima invertase, responsável pela hidrólise desse dissacarídeo em glicose e frutose. Além disso, podemos pressupor que o desempenho inferior observado para *P. membranifaciens* IZ-379 pode estar relacionado a deficiência de hexoses específicas que

facilitam a passagem dos monossacarídeos para o interior das células. Já a ineficiência de desenvolvimento encontrada por algumas linhagens no meio contendo maltose como única fonte, pode estar ligada a ausência de expressão da enzima maltase e/ou deficiência de proteínas transportadoras.

Os resultados obtidos indicam que a capacidade e eficiência de assimilação das cepas avaliadas dependem do açúcar que está sendo disponibilizado. No entanto, é importante ressaltar que a combinação de diferentes açúcares pode alterar essa assimilação e a eficiência de crescimento entre as linhagens, divergindo dos resultados encontrados quando o cultivo ocorre com uma única fonte de carbono isolado. A repressão do metabolismo da maltose por altas concentrações de glicose é um exemplo disso, assim como a redução da captação de frutose em presença de glicose, uma vez que compartilham dos mesmos transportadores e estes apresentam maior afinidade por glicose (LODOLO et al., 2008). Além disso, o grau e a cinética de utilização da glicose, frutose e sacarose apresentam influência determinante na utilização da maltose e isso pode refletir consideravelmente no desempenho geral das fermentações (MENESES; HENSCHKE; JIRANEK, 2002).

Sendo assim, a ineficiência da levedura em assimilar algum açúcar isolado não é fator totalmente excludente, visto que o mosto cervejeiro é um meio nutricionalmente complexo. Investigar essas características é interessante para traçar um perfil das linhagens e identificar possíveis estratégias para sua aplicação. Leveduras com capacidade limitada em metabolizar açúcares do mosto, mas que continuem produzindo compostos aromáticos agradáveis podem ser usadas na produção de cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool, assim como em fermentações sequenciais com linhagens de *S. cerevisiae* para melhorar o perfil organoléptico do produto (GIBSON et al., 2017; MICHEL et al., 2016a). Ajustes na quantidade e composição dos açúcares do mosto também podem conduzir as fermentações de maneiras diferenciadas, permitindo a produção de cervejas mais frutadas e menos alcoólicas, como sugerido por Meier-Dörnber et al. (2017).

5.1.2 Teste de capacidade fermentativa

O teste para avaliação da capacidade fermentativa de cada linhagem foi realizado em tubos de fermentação graduados contendo mosto cervejeiro primário (11,6 °P). Os indícios de fermentação foram observados quanto ao desprendimento de dióxido de carbono (aferimento de deslocamento de líquido do sistema) e estão apresentados na Tabela 3. A Figura 3 ilustra o ensaio realizado no início e após fermentação.

Tabela 3. Capacidade fermentativa (CF) observada em tubos de fermentação *Einhorn* com mosto primário (11,6°P)

Linhagem	Capacidade fermentativa		
	24 h	48 h	CO ₂ (escala volumétrica - 5 mL)
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)		+	Maior que 5
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	+		1,7
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	+		1,5
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	+		1,8
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)		+	1,6
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	+		4,4
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	-	-	-
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)		+	0,6
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	+		Maior que 5
<i>T. utilis</i> (IZ-300)		+	1,1
<i>S. cerevisiae</i> (US-05)	+		Maior que 5

Valores atribuídos: apresentou CF (+); não apresentou CF (-). CO₂: altura do desprendimento de CO₂ (escala volumétrica de 5 mL) observado no interior dos tubos em 24 h e 48 h de incubação a 30 °C.

Com exceção das linhagens pertencentes ao gênero *Pichia* todas as linhagens apresentaram alguma atividade fermentativa em mosto cervejeiro primário, embora com diferenças em termos de tempo e quantidade de líquido deslocado. Essas cepas também mostraram pouco desenvolvimento em maltose como única fonte de açúcar (Item 5.1.1; Figuras 2A, 2B, 2C), com DO_{máx} variando de 0,08 a 0,35, o que pode explicar a ausência de atividade fermentativa em mosto, no qual a maltose é o açúcar mais abundante.

As cepas de *D. bruxellensis* CCA059, CCA077 e CCA155, assim como *H. vineae* SYL-54 e *T. colliculosa* IZ-1966 apresentaram deslocamento do mosto em 24 h de incubação, semelhante ao observado com a linhagem cervejeira *S. cerevisiae* US-05. A linhagem com menor desempenho, levando em consideração o deslocamento do líquido e o tempo de incubação foi a *T. delbrueckii* SYL-48, seguida de *T. utilis* IZ-300. Esse menor desempenho fermentativo pode estar ligado a incapacidade de assimilação de maltose, o que corrobora com os resultados que ambas apresentaram quando essa única fonte de carbono estava disponível (Item 5.1.1; Figuras 2E, 2F).

Figura 3. Fotografia do tubo utilizado na avaliação de capacidade fermentativa com a cepa comercial *S. cerevisiae* US-05 no início (A) e ao final (B) do ensaio (24 h, 30 °C).

Apesar das linhagens *H. guilliermondii* SYL-24 e *H. vineae* SYL-54 não apresentarem assimilação em sacarose e maltose como únicas fontes de carbono (Item 5.1.1, Figuras 1E, 1F), elas mostraram bom desempenho no ensaio com mosto, o que pode ser explicado pela presença de outros açúcares e nutrientes presentes que não são encontrados no meio sintético com uma única fonte de carbono isolada. Além dos açúcares, as proteínas solúveis (polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos) constituem os principais componentes encontrados no mosto. Sendo os aminoácidos essenciais para síntese de proteínas, absorção de carboidratos, viabilidade e vitalidade celular das leveduras (RUSSELL, 2006).

Diversos fatores podem influenciar a taxa e a extensão da metabolização dos açúcares presentes no mosto, incluindo a própria linhagem de levedura empregada, taxa de inoculação, temperatura, capacidade de tolerância ao etanol, quantidade de açúcares presentes no mosto, entre outros (RUSSELL, 2006). Desta forma, é possível pressupor que a ineficiência de algumas linhagens em fermentar o mosto cervejeiro pode estar associada a ausência de algumas enzimas, à incapacidade de transportar os açúcares para o interior das células ou a uma combinação de diferentes fatores.

Sabe-se que linhagens não-*Saccharomyces* muitas vezes necessitam de um tempo maior para crescimento e fermentação, como também podem apresentar capacidade reduzida na metabolização da maltose e maltotriose, o que não exclui sua aplicação no processo e sim o emprego de diferentes estratégias para a condução das fermentações, como inoculações

sequenciais ou utilização na produção de cervejas com menor teor alcoólico (MICHEL et al., 2016b).

5.1.3 Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio

A fim de identificar a capacidade de produção desse composto, as linhagens foram cultivadas em meio sintético diferencial e avaliadas quanto à intensidade da cor marrom. Quando ocorre reação do chumbo, presente no meio, com o sulfeto de hidrogênio é formado sulfato de chumbo provocando o escurecimento das colônias (ONO et al., 1991). A Tabela 4 apresenta os valores atribuídos a cada linhagem, com padrões variados para diferentes espécies ou mesmo entre diferentes cepas da mesma espécie.

Tabela 4. Tendência de formação de sulfeto de hidrogênio das leveduras em meio sintético LA

Linhagem	Grau de pigmentação das colônias
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)	+++
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	++
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	-
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)	n/c
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	+++
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	+++
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	+++
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	++
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)	+++
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	++
<i>T. utilis</i> (IZ-300)	+++
<i>S. cerevisiae</i> (US-05)	+

Tendência à produção de H₂S em meio sintético LA: negativo (-); fraca (+); média (++) e alta (+++); não apresentou crescimento (n/c).

A levedura cervejeira comercial *S. cerevisiae* US-05 apresentou baixa produção de H₂S, enquanto as linhagens não-*Saccharomyces* demonstraram capacidades variadas de produção desse composto. Os resultados mostram que a maioria das linhagens não-*Saccharomyces* apresentam uma tendencia relativa de produção de H₂S entre média e alta, segundo as condições do ensaio. Com exceção de *H. guilliermondii* SYL-24, que não apresentou crescimento, apenas a *D. bruxellensis* CCA077 apresentou baixa produção. Linhagens com ausência de produção desse composto permanecem com as colônias brancas, o que foi verificado somente na

linhagem *D. bruxellensis* CCA155. A aparência das colônias está apresentada na Figura 4 e ilustra o padrão de escurecimento diferencial de cada linhagem.

Figura 4. Padrão de crescimento das colônias das diferentes leveduras em meio sintético LA.

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um dos principais compostos sulfurados voláteis produzidos pelas leveduras, com limite de percepção sensorial muito baixo, em torno de 5-10 ppb. Quando produzido em excesso durante a fermentação pode prejudicar a qualidade organoléptica da cerveja e conferir odores alterantes com descritores de ‘ovo podre’ (OKA et al., 2008; LANDAUD; HELINCK; BONNARME, 2008).

A formação de compostos de enxofre, como o sulfeto de hidrogênio, está relacionada ao metabolismo de aminoácidos contendo enxofre e íons sulfato presentes no mosto. A quantidade desses metabólitos produzidos depende principalmente da cepa de levedura empregada no processo. No entanto, a mesma levedura em diferentes mostos ou no mesmo mosto sob diferentes condições de fermentação pode produzir produtos diferentes. Os fatores que mais influenciam a produção desses metabólitos pelas leveduras são: composição do mosto (conteúdo e quantidade de aminoácidos), disponibilidade de oxigênio molecular, temperatura (temperaturas mais altas favorecem a produção de metabólitos), fermentação conduzida com ou sem agitação, e velocidade com o que o fermento é separado da cerveja (LEWIS; YOUNG, 2002).

5.1.4 Avaliação de sensibilidade ao etanol

A Tabela 5 apresenta os resultados para avaliação da sensibilidade de cada cepa cultivada em meio sintético contendo etanol em diferentes concentrações.

Tabela 5. Capacidade de crescimento observada em meio sintético acrescido de etanol

Linhagem	Concentração de etanol (v/v)		
	7%	10%	12%
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)	+	+	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	+	+	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	+	+	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	+	+	+
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)	+	+	-
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	+	+	-
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	+	-	-
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	+	+	+
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	+	-	-
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)	+	+	+
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	+	+	-
<i>T. utilis</i> (IZ-300)	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (US-05)	+	-	-

Valores atribuídos: crescimento (+); ausência de crescimento (-)

Nas condições do ensaio, nenhuma linhagem teve seu crescimento afetado com a presença de etanol a 7% no meio. As linhagens *P. kluyveri* IZ-288, *P. membranifaciens* IZ-379, *T. utilis* IZ-300 e *S. cerevisiae* US-05 apresentaram crescimento debilitado a concentrações a partir de 10% etanol. Enquanto as linhagens *H. guilliermondii* SYL-24, *H. vineae* SYL-54 e *T. colliculosa* IZ-1966 não apresentaram crescimento apenas na presença de etanol a 12% no meio.

Durante a fermentação a conversão de açúcares em etanol está entre uma das principais funções das leveduras, à medida que a fermentação ocorre a concentração de etanol no mosto aumenta, deixando as células expostas a níveis cada vez mais altos deste composto. As taxas de etanol presentes no meio, muitas vezes, impõem um ambiente estressante para as leveduras envolvidas, sendo assim, a capacidade de tolerância as mudanças do meio são fundamentais para eficiência da produção, assim como para consistência e qualidade do produto (GIBSON et al., 2007, 2008).

As cepas de leveduras cervejeiras, de maneira geral, são expostas a concentrações de 3% a 6%, v/v de etanol, em cervejas de alta densidade essa concentração pode ultrapassar 10%, v/v. A exposição das leveduras a concentrações muito altas de etanol podem resultar em mudanças morfológicas, inibição do crescimento e por fim, morte celular. A capacidade de

tolerar o etanol gerado durante a fermentação é considerada uma característica genética, portanto, algumas cepas podem ser mais capazes do que outras em suportar os efeitos deletérios desse composto (BRIGGS et al., 2004).

A maioria das cepas testadas conseguiram crescer em concentrações maiores que 7% v/v de etanol, mostrando maior tolerância do que a encontrada para a cepa *S. cerevisiae*. Podemos inferir que o aparato genético dessas cepas favorece a tolerância a condições mais estressantes. É possível observar maior resistência das linhagens pertencentes as coleções SYL e CCA, essas cepas foram isoladas de bioprocessos que apresentam concentrações de etanol mais elevadas, o que pode ter impacto direto na capacidade de tolerarem condições mais estressantes, visto que alguns fenótipos podem estar associados ao ambiente de origem das cepas.

Mukherjee et al. (2017) identificaram bons limites de tolerância ao etanol em diversas linhagens não-convencionais. Dentre as leveduras *T. delbrueckii* e *P. kudriavzevii* conseguiram tolerar 13% v/v de álcool, enquanto *D. bruxellensis* cresceram quando expostas a 12% v/v. Eles concluíram que espécies/cepas de leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar eficiência igual ou superior a *S. cerevisiae* na presença de certas condições estressantes.

5.1.5 Caracterização aromática

A fim de identificar a capacidade de geração do composto fenólico alterante (*POF*) pela formação de 4-vinil-fenol e 4-etilfenol, as linhagens foram cultivadas em meio sintético acrescido do seu precursor ácido *p*-cumárico e avaliadas por percepção olfativa. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 6. Tendência de produção de aroma fenólico alterante (*POF*) das diferentes linhagens em meio sintético YM+ ácido *p*-cumárico

Teste de aroma alterante (<i>POF</i>)/Percepção olfativa	
Linhagem	Produção de aroma alterante
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	+
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	+
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)	+
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	+
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	-
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	-
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	+
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)	-
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	-
<i>T. utilis</i> (IZ-300)	-
<i>S. cerevisiae</i> (US-05)	+

Valores atribuídos: produção (+); ausência de produção (-).

O aroma foi perceptível para sete linhagens não-*Saccharomyces*, incluindo as espécies *D. bruxellensis* SYL-1, CCA059, CCA077 e CCA155, *H. guilliermondii* SYL-24, *H. vineae* SYL-54 e *P. membranifaciens* SYL-379, assim como para a linhagem *S. cerevisiae* US-05.

A cerveja é uma bebida complexa, constituída por uma imensa diversidade de compostos ativos, orgânicos e inorgânicos, responsáveis por construir seus sabores, aromas e palatabilidade em graus variados. Dentre esses compostos é encontrado uma multiplicidade de fenóis, extraídos das matérias-primas empregadas e transformados durante o processo de fermentação, que podem gerar impacto tanto positivo como negativo no perfil organoléptico da cerveja (LENTZ, 2018).

A grande maioria dos fenóis simples e voláteis da cerveja são extraídos das matérias-primas, principalmente maltes e lúpulos, durante o processo de fabricação. O ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico são os ácidos hidroxicinâmicos (HCA) predominantes no mosto, podem ser convertidos em seus derivados de vinil e possivelmente, em derivados de etil, gerando

mudanças no perfil de aroma e sabor da cerveja. Algumas leveduras podem codificar uma enzima descarboxilase (PAD) capaz de catalisar a descarboxilação de HCAs em seus derivados de vinil. Da mesma forma, apesar de menos frequente, alguns microrganismos codificam uma enzima vinilfenol redutase (VPR) capaz de utilizar os intermediários de vinil como substrato, originando derivados de etila, esses compostos tem propriedades organolépticas semelhantes aos substratos de vinil, no entanto, com limiares de aroma e sabor um pouco mais baixos (LENTZ, 2018).

A Figura 5 ilustra a conversão enzimática do ácido *p*-cumárico em seus derivados de vinil e etil.

Figura 5. Conversão enzimática do ácido *p*-cumárico em 2 etapas: (PAD) Hidroxinamato Descarboxilase (A), seguida por (VPR) Vinilfenol Redutase (B), resultando nos compostos fenólicos de aroma 4-vinilfenol e 4-etilfenol.

Fonte: CRAUWELS, S. et al. (2015).

Apesar do gênero *Dekkera* ser reconhecido como deteriorante de vinhos, contribuem com qualidades organolépticas essenciais para determinados estilos de cervejas especiais e são cada vez mais buscados pelas cervejarias artesanais (LENTZ, 2018). Essas leveduras apresentam a capacidade de converter ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido *p*-cumárico e ferúlico, em fenóis voláteis que causam impacto sensorial nas bebidas, conhecido como “Caráter de *Brett*” e com descritores aromáticos “fenólico”, “suor de cavalo”, “couro”, “medicinal”, entre outros (KHEIR et al., 2013; SUÁREZ et al., 2007). Todas as cepas de *D. bruxellensis* avaliadas foram positivas para o aroma, comprovando essa característica.

A atividade de enzimas descarboxilase e redutase foi avaliada por Silva et al. (2018), nas três cepas de *D. bruxellensis* CCA059, CCA077 e CCA155, sendo observada concentrações elevadas com conversão molar de ácido *p*-cumárico em 4-etilfenol variando de 45% a 85%.

Meier-Dörnberg et al. (2017) detectaram a formação de compostos fenólicos alterantes por teste olfativo em quatro cepas de *S. cerevisiae*. Algumas linhagens de *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, bem como de *Brettanomyces/Dekkera* também já foram descritas como *POF*⁺ por Shinohara et al. (2000) o que vem de acordo com os resultados observados nesse estudo. Pode-se inferir que as linhagens que não apresentaram formação do aroma não possuem enzima ativa para realizar a descarboxilação do ácido *p*-cumárico (SHENG; LIND; HIMO, 2015).

Outros estudos avaliaram a atividade *POF* em diferentes linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* em mosto cervejeiro e mostraram grande variabilidade entre elas (METHNER et al., 2019; VANBENEDEN et al., 2008). O caráter fenólico é desejável dependendo do estilo de cerveja e desperta cada vez mais o interesse de cervejarias artesanais para produção de novos estilos chamados de “*wild ales*”. Essa característica pode ser moldada durante a produção, com alterações de matérias-primas e condições em que o mosto é preparado, assim como, com a escolha da levedura a ser inoculada (LENTZ, 2018).

Adicionalmente a avaliação de *POF*, foram realizados testes para identificação de aromas a fim de distinguir a variedade e características interessantes no perfil sensorial das linhagens. Para isso, as linhagens foram cultivadas em frascos contendo mosto primário (11,6 °P) e avaliadas por percepção olfativa. Os resultados podem ser observados na Tabela 7. É possível verificar uma correlação entre os aromas descritos para as espécies do gênero *Pichia*, com diferença da linhagem *P. kudriavzevii* SYL-1.13 (detecção de aroma desagradável, notas de ‘estábulo’). As linhagens *D. bruxellensis* SYL-1, CCA059; CCA077 e CCA155 revelaram descritores aromáticos fenólicos, o que reflete os resultados encontrados nos testes de *POF*. Em geral, os resultados mostram aromas frutados e fenólicos, com exceção da linhagem *H. guilliermondii* SYL-24 que teve o aroma descrito apenas como ‘microbiológico’, impressão praticamente neutra quando comparado aos outros aromas detectados nas demais linhagens. As linhagens *T. delbrueckii* SYL-48, *T. colliculosa* IZ-1966 e *T. utilis* IZ-300 produziram os aromas frutados mais puros e percebidos com média e alta intensidade, o que também pode ser sustentando pela ausência da capacidade *POF* observada nos testes.

Tabela 7. Aromas e intensidade atribuídos após cultivo das linhagens em meio mosto primário 11,6 °P

Linhagem	Descritor aromático	Intensidade
<i>D. bruxellensis</i> (SYL-1)	Acético; Fenólico	Alta
<i>D. bruxellensis</i> (CCA059)	Cítrico; Fenólico	Alta
<i>D. bruxellensis</i> (CCA077)	Fenólico; Microbiológico	Baixa
<i>D. bruxellensis</i> (CCA155)	Acético; Frutado	Média
<i>H. guilliermondii</i> (SYL-24)	Microbiológico	Baixa
<i>H. vineae</i> (SYL-54)	Acético; Especiarias; Fenólico	Alta
<i>P. kluyveri</i> (IZ-288)	Frutado; Queijo maturado	Média
<i>P. kudriavzevii</i> (SYL-1.13)	Estábulo; Queijo maturado	Média
<i>P. membranifaciens</i> (IZ-379)	Frutas tropicais; Queijo maturado	Média
<i>T. delbrueckii</i> (SYL-48)	Frutado	Média
<i>T. colliculosa</i> (IZ-1966)	Frutado	Média
<i>T. utilis</i> (IZ-300)	Maça assada	Alta

5.1.6 Linhagens selecionadas

A avaliação e seleção das leveduras para aplicação em ensaios de fermentação fundamentou-se nos perfis previamente obtidos para assimilação de diferentes açúcares, capacidade fermentativa, capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio, tolerância ao etanol e potencial de geração de aromas. Diante dos resultados obtidos quatro cepas foram selecionadas para dar prosseguimento aos ensaios: *D. bruxellensis* SYL-1, *D. bruxellensis* CCA077, *H. vineae* SYL-54 e *T. delbrueckii* SYL-48.

- a) *D. bruxellensis* SYL-1: isolada a partir de processo de envelhecimento de cerveja. Apresentou boa assimilação em todas as fontes de açúcar e bom desempenho em mosto cervejeiro primário (48 h de incubação), com tolerância a todas as concentrações de etanol testadas. A alta capacidade para produção de H₂S, avaliação positiva para *POF* e aromas com descritores fenólico e acético comprovam perfil já conhecido para linhagens de *Dekkera/Brettanomyces*, tratando-se de características desejáveis em alguns estilos de cerveja.
- b) *D. bruxellensis* CCA077: isolada de usina de bioetanol. Apresentou boa assimilação em todas as fontes de açúcares, assim como em mosto cervejeiro primário (24 h de incubação). Tolerância a todas as concentrações de etanol testadas e baixa produção de H₂S. Apesar de avaliação positiva para *POF*, foi descrita com aroma fenólico de baixa intensidade. O desenvolvimento mais acelerado em mosto e perfil aromático mais neutro se mostraram atrativos.

- c) *H. vineae* SYL-54: isolada de fermentações de caldo-de-cana em produção de cachaça. Apesar de ter apresentado boa assimilação apenas em glicose e frutose, como fontes de carbono, teve desempenho satisfatório em mosto cervejeiro primário, com tolerância a até 10% de etanol. Apesar de alta produção de H₂S, apresentou formação de aromas com descritores acético, fenólico, e a especiarias.
- d) *T. delbrueckii* SYL-48: isolada de fermentações de caldo-de-cana em produção de cachaça. Apresentou bom desempenho em mosto cervejeiro primário, porém no ensaio de açúcares apresentou deficiência de assimilação em maltose. Tolerância a todas as concentrações de etanol testadas. Apesar de alta produção de H₂S, foi negativa para *POF* e geração de aromas com descritores frutados. Perfil cotado para aplicação em cervejas com teor alcoólico reduzido ou em estratégia de inoculação sequencial para bioaromatização.

5.2 Ensaio de Microfermentação

As linhagens selecionadas após caracterização foram submetidas a ensaios de microfermentação em mosto cervejeiro (10,9 °P) utilizando inóculo único, assim como em estratégia de inoculação sequencial com linhagem comercial de *S. cerevisiae* (US-05). A partir do monitoramento das microfermentações foi possível traçar o perfil das linhagens quanto ao desprendimento de gás carbônico, atenuação aparente do mosto, pH, acidez total titulável e teor de etanol (Anexo A).

5.2.1 Microfermentações com inóculos puros

As curvas obtidas mediante perda de massa de CO₂ (g/L), permitiram observar o comportamento das diferentes linhagens em mosto cervejeiro. Diante das condições utilizadas na condução do experimento, as microfermentações com culturas puras apresentaram pouca quantidade de CO₂ total liberado (Figura 6), confirmando os resultados de baixa atenuação aparente do mosto e baixa produção de etanol.

Figura 6. Evolução da perda de massa (g/L) do sistema, para as diferentes linhagens, estimada por monitoramento da liberação de CO₂ durante microfermentação conduzida com inóculos puros.

Observando as curvas de evolução das fermentações é possível verificar a grande diferença entre as leveduras não-convencionais e a levedura convencional utilizada, assim como a semelhança de desempenho entre as cepas *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA077 pertencentes a mesma espécie. Estas cepas apresentaram curvas menos inclinadas, evidenciando um padrão mais lento no consumo de substratos do mosto quando comparado as outras linhagens. Apesar de cepas da espécie *D. bruxellensis* serem frequentemente apresentadas com rendimentos semelhantes a *S. cerevisiae* o seu principal problema está associado à maior lentidão no consumo dos açúcares, fato relatado mesmo em ensaios de fermentação mais longos (BLOMQVIST et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

A maior evolução foi verificada para a linhagem *T. delbrueckii* SYL-48, seguida por *H. vineae* SYL-54, com quantidades de CO₂ total liberado de 30,5 g/L e 22,8 g/L, respectivamente. As cepas de *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA077 exibiram menor desprendimento de CO₂, 13,5 g/L e 10,8 g/L, respectivamente. Verificou-se menor liberação de CO₂ entre as linhagens não-*Saccharomyces*, com menor perda de massa, quando comparadas a cepa cervejeira US-05 (42,4 g/L de CO₂ total), indicando maior lentidão na evolução da fermentação, atenuação aparente do mosto baixa (Figura 7A) e pouca produção de etanol, variando de 0,82% (v/v) a 1,11% (v/v) (Figura 7B).

A atenuação aparente ou fermentabilidade do mosto indica a proporção de sólidos dissolvidos que foram fermentados em um mosto. Durante a fermentação os açúcares são

convertidos principalmente em etanol e CO₂, e a gravidade específica diminui progressivamente ao longo do tempo, até um limite de atenuação. Nas cervejarias esse limite é definido dependendo da cerveja que se deseja produzir, tenta-se alcançar a atenuação em um tempo e temperatura de fermentação predefinidos (BRIGGS et al., 2014).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre as cepas não-*Saccharomyces* para a atenuação aparente do mosto, no entanto, a produção de etanol apresentou diferenças significativas entre elas, sendo a maior quantidade determinada na microfermentação conduzida com a cepa *D. bruxellensis* SYL-1, enquanto a menor foi vista para *H. vineae* SYL-54.

Figura 7. (A) Taxa de fermentabilidade (%) calculada e (B) Teor alcoólico (% v/v) após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA077, *H. vineae* SYL-54, *T. delbrueckii* SYL-48 e a linhagem comercial US-05.

Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

Sabe-se que a maioria das cepas de *Dekkera/Brettanomyces* tem a capacidade de metabolizar uma ampla gama de monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos e dextrinas (COLOMER; FUNCH; FORSTER, 2019). Além de conseguirem produzir ácido acético por transformação direta da glicose, dependendo da condição de cultivo (USCANGA et al., 2006). Uma característica metabólica importante que as diferenciam das leveduras convencionais é o efeito *Custer* (BARNETT; ENTIAN, 2005), observado em leveduras que conseguem conduzir fermentações em presença de oxigênio, podendo interromper ou aumentar a fase lag da fermentação em anaerobiose. Isto ocorre em cepas deste gênero devido a um desbalanço redox nas células, gerado por supressão de NAD^+ conforme a produção de compostos oxidados, como ácido acético, e a incapacidade de reestabelecer o balanço por meio de metabólitos reduzidos, como o glicerol (USCANGA; DÉLIA; STREHAIANO, 2003).

Apesar de *T. delbrueckii* não apresentar o efeito *Custer*, cepas dessa espécie tendem a aumentar a taxa de fermentação em presença de oxigênio (HANL; SOMMER; ARNEBORG, 2005). *T. delbrueckii* já demonstrou efeito *Crabtree* menos pronunciado, com menor taxa de produção de etanol e maior rendimento em biomassa, situação semelhante já foi detectada em *H. vineae* (MÉRICO et al., 2007). Nissen et al. (2004) mostraram que *S. cerevisiae* consegue captar glicose mais eficientemente sob condições de oxigênio limitado do que outras leveduras não-*Saccharomyces*, além de indicarem que o oxigênio pode aumentar a eficiência no consumo de açúcares das leveduras não-*Saccharomyces* em comparação com *S. cerevisiae*. O baixo desempenho dessas linhagens nas microfermentações pode estar associado a estas características. Além do fato de não terem apresentado boa assimilação em maltose, como observado no ensaio de crescimento nas diferentes fontes de carbono (Item 5.1.1).

Com relação ao pH e acidez total titulável, foram observadas diferenças entre as linhagens, variando de 3,77 a 4,48 e de 1,12 a 1,45 g/L (Figura 8), respectivamente. O pH da cerveja é altamente dependente da fermentação, situando-se na faixa de 3,8 a 4,6 (BAMFORTH, 2003). A acidez tem grande importância na percepção sensorial da cerveja, sendo os ácidos orgânicos metabolizados pelas leveduras os grandes contribuintes para a queda do pH, a acidez total final e o sabor ácido da cerveja (MICHEL et al., 2016a). Durante a fermentação primária a diminuição da gravidade específica (atenuação do mosto) é acompanhada não só pelo consumo de açúcares com a liberação de etanol e CO_2 , mas também pela diminuição dos valores de pH, ocorre à medida que os íons de amônio e aminoácidos são consumidos e a levedura secreta ácidos orgânicos (LEWIS; YOUNG, 2002).

Os valores de pH resultantes das microfermentações com as linhagens não-*Saccharomyces* não apresentaram diferenças significativas entre si, no entanto, todas diferiram

do resultado observado com a linhagem *S. cerevisiae*, que apresentou o menor valor. Em termos de acidez total foi possível observar distinção no perfil da linhagem *D. bruxellensis* SYL-1, que teve diferença em relação a todas as linhagens com exceção apenas da outra cepa de *D. bruxellensis*. Ambas as linhagens de *D. bruxellensis* apresentaram os menores valores de pH e as maiores quantidades de acidez total titulável, comprovando a natureza acidogênica já atribuída a essa espécie (DE BARROS PITA et al., 2019).

Figura 8. Parâmetros de acidez total titulável (■ g ácido acético/L) e pH (■) obtidos após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens *D. bruxellensis* SYL-1, CCA077, *H. vineae* SYL-54, *T. delbrueckii* SYL-48 e *S. cerevisiae* US-05. Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

Em ambientes fermentativos os índices de acidez e pH são influenciados principalmente pela presença de ácidos orgânicos fracos sintetizados pela levedura. O pH está relacionado apenas com a forma dissociada dos ácidos, enquanto a acidez titulável mede toda a concentração de H^+ do meio, tanto na forma dissociada como na não dissociada (STEWART; RUSSELL, 2009). É possível notar que, apesar da linhagem US-05 ter apresentado menor valor de pH em comparação as linhagens não-*Saccharomyces*, a quantidade de acidez não foi significativamente maior, o que pode indicar a maior produção e presença de ácidos no estado dissociado no produto proveniente dessa levedura.

O desempenho fermentativo inferior, encontrado nos ensaios utilizando inóculos puros das cepas não-*Saccharomyces*, pode estar associado a algum fator isolado ou a um conjunto de diferentes fatores, como temperatura empregada, período insuficiente de fermentação, impacto de componentes do lúpulo, baixa eficiência na metabolização dos açúcares disponíveis no

mosto, entre outros. Levando em consideração os teores alcoólicos produzidos elas poderiam ser empregadas para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico, no entanto, com baixa atenuação do mosto, a produção de compostos aromáticos seria importante para compensar possíveis sabores provenientes de açúcares residuais.

Os resultados não comprometem a aplicação dessas leveduras para a produção de cerveja, apenas apresentam informações para o direcionamento e adoção de diferentes estratégias que possam ser utilizadas em fermentações conduzidas com elas.

5.2.2 Microfermentações com inoculação sequencial

As curvas obtidas mediante perda de massa de CO₂ (g/L), permitiram observar o comportamento das diferentes linhagens não-*Saccharomyces* em mosto cervejeiro mediante estratégia de inoculação sequencial com *S. cerevisiae*. Observando as curvas de evolução das fermentações é possível verificar o aumento do desprendimento de CO₂ após a inoculação da cepa *S. cerevisiae* (Figura 9).

Figura 9. Evolução da perda de massa (g/L) do sistema, estimada por monitoramento da liberação de CO₂ durante microfermentação inoculada sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*. As setas indicam o tempo em que a inoculação da levedura *S. cerevisiae* foi realizada.

As microfermentações conduzidas com culturas únicas exibiram o perfil mais lento e menores quantidade de CO₂ liberado, em comparação com os ensaios conduzidos sequencialmente. Verifica-se que as taxas de fermentação aumentaram consideravelmente após

a inoculação com *S. cerevisiae*. Sendo a inoculação sequencial uma estratégia interessante quando se deseja elevar o teor alcoólico nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Como esperado, a concentração de etanol produzido foi maior nas fermentações onde a cepa de *S. cerevisiae* US-05 participou, simples ou sequencial (3,28% a 4,61%, v/v). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as microfermentações conduzidas com *H. vineae* SYL-54/US-05, *T. delbrueckii* SYL-48/US-05 e o controle *S. cerevisiae* US-05 para atenuação aparente do mosto (Figura 11A) e produção de etanol (Figura 10B). O mesmo comportamento não foi observado quando foram usadas como culturas únicas, revelando que as taxas de fermentação aumentaram por consequência da inoculação com a cepa *S. cerevisiae*, que provavelmente, consumiu parte dos açúcares ainda presentes no mosto.

Apesar do ensaio conduzido com *H. vineae* SYL-54 ter sido o que apresentou as menores taxas em cultura única, em estratégia sequencial foi o sistema com o melhor desempenho. Bourbon-Melo et al. (2020) descreveu comportamento parecido para duas cepas pertencentes ao gênero *Hanseniaspora*; em fermentações com inóculos puros a concentração de etanol não passou de 0,49% (v/v) e a atenuação aparente ficou em torno de 12,3%. No entanto, em sistema de inoculação sequencial com a cepa *S. cerevisiae* US-05 a atenuação aparente ficou em torno de 77% e o teor alcoólico chegou a 4,42% (v/v).

Figura 10. (A) Fermentabilidade (%) calculada e (B) Teor de etanol (% v/v) após microfermentação conduzida sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*.

Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

As menores taxas de fermentação foram encontradas com as linhagens de *D. bruxellensis* e podem estar associadas à menor capacidade de assimilação de açúcares e/ou a período insuficiente na condução da fermentação. Como já citado, leveduras do gênero *Dekkera*, frequentemente, apresentam maior lentidão e necessidade de períodos mais longos de fermentação. No entanto, os resultados observados para o ensaio conduzido com a linhagem *D. bruxellensis* CCA077, comprovam o que já foi descrito por Pereira et al. (2012); em estudo

analisando as características dessa mesma cepa encontraram deficiência na capacidade fermentativa quando presentes em ensaios com *S. cerevisiae*, com diminuição da produção de etanol decorrente do desvio de açúcares para a produção de biomassa.

Os perfis encontrados nas microfermentações conduzidas sequencialmente com as cepas *H. vineae* SYL-54/US-05 e *T. delbrueckii* SYL-48/US-05 foram os que mais se assemelharam ao encontrado na microfermentação conduzida com cultura pura de *S. cerevisiae* US-05. O mesmo comportamento não foi observado quando essas cepas foram usadas como culturas únicas, revelando que as taxas de fermentação aumentaram por consequência da inoculação com a cepa *S. cerevisiae*, que provavelmente, consumiu parte dos açúcares ainda presentes no mosto.

Com relação ao pH e acidez total titulável (Figura 11), não foram observadas diferenças significativas entre as microfermentações conduzidas sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae* e o controle *S. cerevisiae*. É possível observar queda de pH e aumento da acidez quando comparadas as microfermentações puras, pode ser uma consequência da sinergia entre as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*. Diante do valor de pH apresentado pela cepa *S. cerevisiae* pode-se inferir que ela contribuiu para a queda do pH do sistema sequencial.

Figura 11. Parâmetros de acidez total titulável (■ g ácido acético/L) e pH (■) após microfermentação conduzida sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*.

Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

Apesar de não se verificarem diferenças significativas para os resultados de acidez, podemos notar que o produto fermentado pela cepa *D. bruxellensis* SYL-1 apresentou a maior quantidade de acidez total (Anexo A), similar ao encontrado em inoculação única, além de ter finalizado a fermentação com mais biomassa que a linhagem *S. cerevisiae* (item 5.2.3). Podemos especular que o menor teor alcoólico nesse sistema é decorrente do desvio de açúcares para a produção de biomassa, como o observado para a cepa *D. bruxellensis* CCA077 em estudo realizado por Pereira et al. (2012) ou mesmo em decorrência da produção de maior quantidade de ácidos no sistema.

5.2.3 Dinâmica populacional

A contagem em placas permite a visualização das colônias de microrganismos, de modo a estabelecer o número de células viáveis em determinada população. Assume-se que cada colônia provém de uma única célula viável, no entanto, como já se sabe algumas colônias podem originar-se de células não separadas, por isso considera-se o número de Unidades Formadoras de Colônias por volume (UFC/mL). A fim de observar as variações no número de células viáveis durante as microfermentações, a dinâmica populacional foi avaliada por meio do método de microplaqueamento em gotas e os resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 12. Cinética de crescimento determinada por UFC/mL durante as microfermentações conduzidas com inóculos puros.

Condições de cultivo: meio YPD acrescido de cloranfenicol, a 30°C, até aparecimento de colônias.

Nas microfermentações conduzidas com cultura puras o número populacional aumentou de maneira praticamente constante durante os sete dias para a linhagem cervejeira US-05 e *D. bruxellensis* SYL-1, atingindo a maior concentração no final do período de fermentação. A linhagem *D. bruxellensis* CCA77 teve aumento considerável no número de colônias e a maior concentração entre as linhagens, atingiu 10^8 UFC/mL em quatro dias, com manutenção dessa taxa até o final da fermentação. A população de *T. delbrueckii* SYL-48 também se manteve constante por praticamente todo o período, no entanto, atingiu a concentração de 10^8 UFC/mL em cinco dias, com posterior queda, apresentando uma contagem de 10^7 UFC/mL até o final da fermentação.

O menor desenvolvimento populacional foi observado pra *H. vineae* SYL-54 que manteve uma taxa populacional da ordem de 10^6 UFC/mL durante todo o período de fermentação. Isso pode ter ocorrido devido à tendência de floculação observada durante o processo (resultados não apresentados), ocasionando isolamento deficiente das células presentes nas amostras diluídas.

O uso de meio de culturas seletivos permite a diferenciação entre os perfis de colônias e por consequência, a contagem de microrganismos diferentes em uma população mista. Com base nisso, as amostras retiradas das microfermentações conduzidas sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio seletivo WLN, a fim de verificar a população das duas linhagens presentes (Figura 13).

Figura 13. Cinética de crescimento determinada por UFC/mL durante as microfermentações conduzidas sequencialmente com as linhagens não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*.

Condições de cultivo: meio seletivo WLN, a 30 °C, até aparecimento de colônias.

A inoculação da *S. cerevisiae* marcou o início no aumento populacional da cepa *S. bruxellensis* SYL-1, apesar de ambas terem finalizado a fermentação com 10^8 UFC/mL. No ensaio sequencial conduzido com *D. bruxellensis* CCA077 as concentrações celulares também atingiram e finalizaram com 10^8 UFC/mL, no entanto, a cepa não-*Saccharomyces* teve um considerável aumento da sua população antes mesmo da inoculação com *S. cerevisiae*. O desvio de açúcares para produção de biomassa realizado por essa cepa em co-cultivo com *S. cerevisiae* já foi elucidado por Pereira et al. (2012).

Outro fator que pode ser levado em consideração sobre o menor desenvolvimento populacional de *S. cerevisiae* em comparação com *D. bruxellensis*, encontrado nas fermentações sequenciais, é o efeito de toxicidade de compostos fenólicos para a levedura *S. cerevisiae*. Os compostos fenólicos produzidos por *D. bruxellensis* podem ser a causa da menor viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Bassi et al., 2018). Silva et al. (2018) demonstrou alto

consumo de ácido *p*-cumárico e formação de 4-etilfenol em fermentações conduzidas com a cepa *D. bruxellensis* CCA077, mesmo no início da fermentação.

Ambas as cepas de *D. bruxellensis* SYL-1 e CCA077 se mostraram positivas para descarboxilação do ácido *p*-cumárico em mosto cervejeiro em etapa de caracterização realizada previamente (Item 5.1.5).

É possível observar que a cepa *S. cerevisiae* US-05 foi dominante por todo o período após sua inoculação apenas na fermentação sequencial conduzida com a linhagem *H. vineae* SYL-54, que permaneceu com concentrações celulares de 10^6 UFC/mL durante todo o período de fermentação, assim como o observado na fermentação com seu inóculo puro.

No ensaio com *T. delbrueckii* SYL-48 após inoculação de *S. cerevisiae* comprovou-se um aumento de ambas as linhagens atingindo 10^8 UFC/mL, porém, com uma taxa maior para SYL-48. Apesar de ambas encerrarem com 10^7 UFC/mL, os dados demonstraram um crescimento mais lento da *S. cerevisiae*, podendo pressupor uma certa competição entre as linhagens. Taillandier et al. (2014) relataram que em fermentação sequencial conduzida com linhagem de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*, a cepa de *S. cerevisiae* não foi capaz de se desenvolver devido à exaustão de nitrogênio causada pelo crescimento de *T. delbrueckii*, levando a uma fermentação lenta.

A limitação de nutrientes, quantidade de etanol, ácidos orgânicos, pH e temperatura exercem papel importante na viabilidade das leveduras. Além disso, evidências sugerem que *S. cerevisiae* pode utilizar estratégias defensivas para promover a morte de linhagens não-*Saccharomyces*, como a secreção de peptídeos antimicrobianos e morte mediada por mecanismo de contato célula a célula. Este tipo de mecanismo de defesa já foi observado para algumas espécies pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* (ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016). Apesar de pouca concentração de células viáveis também ter sido verificado na fermentação com cultura única de *H. vineae*, provável consequência de sua capacidade em formar mais agregados, algum tipo de mecanismo de defesa pode ter influenciado na concentração de células desta linhagem durante a fermentação sequencial.

Considerando que o mosto cervejeiro é um meio nutricionalmente complexo, além de poder conter concentrações consideráveis de componentes limitantes provenientes do lúpulo, o desenvolvimento das leveduras pode ser impactado por algum inibidor produzido por seu próprio metabolismo ou alguma deficiência nutricional, visto que diferentes açúcares e fontes de nitrogênio podem alterar os padrões de crescimento (DA CRUZ; CILLI; ERNANDES, 2002).

6. CONCLUSÃO

A capacidade de atuação das linhagens de leveduras é o que dita como as condições de um determinado processo fermentativo devem ser direcionadas para se obter o máximo desempenho. Encontrar uma combinação de condições adequadas para a produção de uma cerveja diferenciada e equilibrada é possível acessando os requisitos da cepa que será inoculada no processo. Assim, a caracterização do perfil físico-tecnológico individual das diferentes leveduras não-*Saccharomyces* desenvolvida neste estudo demonstra como é importante conhecer as diversas particularidades que elas podem expressar.

As linhagens não-*Saccharomyces* apresentaram diversas diferenças quanto ao perfil fisiológico, assim como em sua atuação fermentativa em comparação a levedura *S. cerevisiae*. Os perfis fermentativos acessados com as inoculações puras apresentaram potencial para a produção de cervejas com teor alcoólico reduzido. Levando em consideração as taxas de etanol produzidas a cepa *H. vineae* SYL-54 pode ser direcionada a produção de cervejas sem álcool, enquanto as cepas *D. bruxellensis* SYL-1, CCA077 e *T. delbrueckii* SYL-48 podem ser empregadas para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico. Além disso, nas condições empregadas, a inoculação sequencial dessas cepas com uma linhagem cervejeira *S. cerevisiae* se mostrou uma estratégia viável para a produção de cervejas com teores alcoólicos mais altos.

Estudos futuros devem investigar outras faixas de temperatura, níveis de oxigênio, períodos diferentes de fermentação e maiores volumes de produção, bem como avaliar os componentes aromáticos voláteis dos produtos, para que seja possível conhecer todo o potencial dessas linhagens. Os resultados permitem concluir que as leveduras *D. bruxellensis* (SYL-1 e CCA77), *H. vineae* e *T. delbrueckii* possuem potencial para a produção de cervejas especiais, desde que seja observada a compatibilidade de suas características fisiológicas, estratégias de inoculação e qual resultado se deseja obter acerca das características da cerveja a ser produzida.

O presente trabalho contribuiu para uma melhor compreensão sobre o comportamento de diferentes linhagens de leveduras não-*Saccharomyces*, reforçando como os perfis entre elas são diversos e podem ser explorados para a produção de cervejas especiais.

REFERÊNCIAS

- ABRACERVA. Associação Brasileira da Cerveja Artesanal - **Brasil chega a mil fábricas de cerveja**. 2019. Disponível em: <<https://abracerva.com.br/2019/06/07/brasil-chega-a-mil-fabricas-de-cerveja/>>. Acesso em: março de 2020.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation process: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035-2046, 2016.
- AUSUBEL et al. **Short protocols in molecular biology**. 2nd. San Francisco: John Wiley & Sons, 1992. 88 p.
- BAMFORTH, C. W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. 2nd. New York: Oxford University Press, 2003. 246 p.
- BARNETT, J. A.; ENTIAN, K.-D. A history of research on yeast 9: regulation of sugar metabolism. **Yeast**, v. 22, n. 11, p. 835-894, 2005.
- BASSI, A. P. G. et al. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* - *Lactobacillus fermentum* - *Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 9, p. 1661-1672, 2018.
- BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112–120, 2016.
- BELLUT, K. et al. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 66, 2018.
- BELLUT, K. et al. Investigation into the potential of *Lachancea fermentati* strain KBI 12.1 for low alcohol beer brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 3, p. 157–169, 2019.
- BELLUT, K.; ARENDT, E. K. Chance and challenge: non-*Saccharomyces* yeasts in nonalcoholic and low alcohol beer brewing – a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 2, p. 77–91, 2019.
- BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157–172, 2013.
- BOURBON-MELO, N. et al. Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. xxx, n. xxxx, p. xxx, 2020.
- BLOMQUIST, J. et al. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-274, 2012.
- BRÁNYIK, T. et al. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 4, p. 493–506, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 65, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da União**. Brasília, 11 dez. 2019.
- BRIGGS, D.E. et al. Fermentation technologies. In: _____. **Brewing: science and practice**. Cambridge,

England: Woodhead Publishing Limite, 2004. chap. 14, p. 509-542.

BUERTH, C.; TIELKER, D.; ERNST, J. F. *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 6981–6990, 2016.

BUGLASS, A. J. **Handbook of Alcoholic Beverages**: technical, analytical and nutritional aspects. Chichester: John Wiley & Sons, 2011. 627 p.

CANONICO, L. et al. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 11, 2019.

CANONICO, L. et al. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**, v. 56, p. 45–51, 2016.

CAPECE, A. et al. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018a.

CAPECE, A. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22–30, 2018b.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**: a importância do monitoramento microbiológico em destilaria. São Carlos: EdUFSCAR, 2012. 107 p.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - **Dados do setor cervejeiro nacional**. 2017. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/>. Acesso em: abril de 2020.

CISION PR NEWSWIRE. **Analyzing the \$500 billion global beer industry 2019**. 2019. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/analyzing-the-500-billion-global-beer-industry-2019-300916262.html>>. Acesso em: março de 2020.

COLEN, L.; SWINNEN, J. Economic growth, globalisation and beer consumption. **Journal of Agricultural Economics**, v. 67, n. 1, p. 186–207, 2016.

COLOMER, M. S.; FUNCH, B.; FORSTER, J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 30-35, 2019.

CRAUWELS, S. et al. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **BrewingScience**, v. 68, p. 110–121, 2015.

CUBILLOS, F. A. et al. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 383–398, 2019.

DA CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 1, p. 54–61, 2002.

DE BARROS PITA, W. et al. The biotechnological potential of the yeast *Dekkera bruxellensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 103, 2019.

DE FRANCESCO, G. et al. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121,

n. 1, p. 113–121, 2015.

DE FRANCESCO, G. et al. *Mrakia gelida* in brewing process: an innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. **Food Microbiology**, v. 76, p. 354–362, 2018.

DIAS, D. R.; PANTOJA, L.; SCHWAN, R. F. Fermentados de frutas. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v. 1, cap. 5, p. 85–111.

DOMIZIO, P. et al. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 281–289, 2007.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v. 1, cap. 2, p. 15–50.

ERTEN, H.; CAMPBELL, L. The production of low-alcohol wines by aerobic yeasts. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 107, n. 4, p. 207–215, 2001.

ESPERANCINI, M. S. T. Mercado brasileiro de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.) **Indústria de Bebidas: inovação, gestão e produção**. São Paulo: Edgard Blucher, 2011. v. 3, cap. 14, p. 293–322.

ESTELA-ESCALANTE, W. D. Perspectives and uses for non-*Saccharomyces* yeasts in fermented beverages. In: SOLÍS-OVIEDO, R. L. (Ed.). **Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages**. IntechOpen, 2018. p. 1–19.

GAMERO, A. et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. **Food Microbiology**, v. 60, p. 147–159, 2016.

GIBSON, B. et al. New yeasts — new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 4, p. 1–13, 2017.

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

GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 535–569, 2007.

GIBSON, B. R. et al. Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation. **Yeast**, v. 25, n. 8, p. 549–562, 2008.

GSCHAEDLER, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 73–77, 2017.

HANL, L.; SOMMER, P.; ARNEBORG, N. The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 113–118, 2005.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2, cap. 6, p. 93–121.

HITTINGER, C. T.; STEELE, J. L.; RYDER, D. S. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 199–206, 2018.

HOLT, S. et al. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.

HUTZLER, M. et al. Yeast identification and characterization. In: HILL, A. E. (ed.). **Brewing microbiology**: managing microbes, ensuring quality and valorising waste. Oxford: Elsevier, 2015. chap. 5, p. 65-104.

INFINITI RESEARCH LIMITED. **Global beer market 2017-2021**. 2017. Disponível em: <<https://www.reportbuyer.com/product/4046948/global-beer-market-2017-2021.html/>>. Acesso em: março de 2020.

KHEIR, J. et al. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of Brettanomyces/Dekkera yeasts. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 5, p. 655-671, 2013.

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**, v. 77, n. 6, p. 1191-1205.

LEGRAS, J.-L. et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2091–2102, 2007.

LENTZ, M. The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 20, 2018.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. 2nd. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 398 p.

LIU, S.-Q.; QUEK, A. Y. H. Evaluation of beer fermentation with a novel yeast *Williopsis saturnus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 403–412, 2016.

LODOLO, E. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. **FEMS Yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1018-1036, 2008.

MACHADO, J. G. C. F.; TAKITANE, I. Z. 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. 256-291.

MALFLIET, S. et al. Analytical-sensory determination of potential flavour deficiencies of light beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 1, p. 49–63, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Anuário da Cerveja**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-2019/view>>. Acesso em: março de 2020.

MATTHEWS, S. L.; BYRNE, H.; HENNIGAN, G. P. Preparation of a low carbohydrate beer by mashing at high temperature with glucoamylase. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, n. 3, p. 185–194, 2001.

MEIER-DÖRNBERG, T. et al. The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 41, 2017.

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

MERICO, A. et al. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces complex*. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 976-989, 2007.

METHNER, Y. et al. Screening for the brewing ability of different non-*Saccharomyces* yeasts. **Fermentation**, v. 5, n. 4, p. 101, 2019.

MEUSSDOERFFER, F. G. A comprehensive history of beer brewing. In: EßLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of brewing**: processes, technology, markets. Weinheim: WILEY-VCH, 2009. chap. 1, p. 1-42.

MICHEL, M. et al. Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. v. 122, n. 4, p. 569–587, 2016a.

MICHEL, M. et al. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 129–144, 2016b.

MORDOR INTELLIGENCE. **Global beer market (2020-2025)**. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/beer-market>>. Acesso em: março de 2020.

MUKHERJEE, V. et al. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 2016, 2017.

MÜLLER, M. et al. Physical methods for dealcoholization of beverage matrices and their impact on quality attributes. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 5, p. 310–326, 2017.

NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 543-550, 2004.

OGATA, T.; IWASHITA, Y.; KAWADA, T. Construction of a brewing yeast expressing the glucoamylase gene STA1 by mating. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 66–69, 2017.

OKA, K. et al. Decrease in hydrogen sulfide content during the final stage of beer fermentation due to involvement of yeast and not carbon dioxide gas purging. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 3, p. 253–257, 2008.

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.-I. et al. Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3183–3186, 1991.

OSBURN, K. et al. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76–84, 2018.

PEREIRA, L. et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.

PIRES, E. J. et al. Yeast: the soul of beer's aroma — a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 2014.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v.

22, n. 4, p. 183–186, 2006.

RAVASIO, D. et al. Adding flavor to beverages with non-conventional yeasts. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 15, 2018.

RUSSEL, 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. et al. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 165–177, 2010.

SAERENS, S.; SWIEGERS, J. H. **Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties**. Depositante: Chr. Hansen A/S. WO2013/030398 A1. Depósito: 03 set. 2012. Concessão: 07 mar. 2013.

SAERENS, S.; SWIEGERS, J. H. **Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains**. Depositante: Chr. Hansen A/S. WO2014/135673 A2. Depósito: 07 mar. 2014. Concessão: 12 set. 2014.

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

SHENG, X.; LIND, M. E. S.; HIMO, F. Theoretical study of the reaction mechanism of phenolic acid decarboxylase. **FEBS Journal**, v. 282, n. 24, p. 4703–4713, 2015.

SHINOHARA, T.; KUBODERA, S.; YANAGIDA, F. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 90–97, 2000.

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

SILVA, L. et al. Volatile phenols are produced by strains of *Dekkera bruxellensis* under Brazilian fuel ethanol industry-like conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 21, 2018.

SILVA, N.; NAKASATO, L. T.; MIYAGUSHU, L. Avaliação do método de plaqueamento em gotas para contagem de microrganismos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 49–54, jan./jun. 1996.

SOHRABVANDI, S. et al. Application of *Saccharomyces rouxii* for the production of non-alcoholic beer. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 1132–1137, 2009.

SPITAEELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014.

SPITAEELS, F. et al. Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition. **Food Microbiology**, v. 47, p. 1–11, 2015.

SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 172, 2016.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. Sas/Qc software: usage and reference. 2 ed. Cary, 1996. (2 v).

STEENSELS, J. et al. *Brettanomyces* yeasts - from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 24–38, 2015.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 61–80, 2014.

STEWART, G. G.; HILL, A. E.; RUSSELL, I. 125th Anniversary review: developments in brewing and distilling yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 4, p. 202–220, 2013.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. Yeast excretion products. In:____. **An introduction to brewing science & technology**. Series 3: brewer's yeast. Londres: The Institute of Brewing and Distilling. 2009. p. 46-57.

SUÁREZ, R. et al. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 10-21, 2007.

TAILLANDIER et al. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 1959-1967, 2014.

TATARIDIS et al. Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. **Journal of Natural Science**, v. 124, p. 415-426, 2013.

TOH, D. W. K.; CHUA, J. Y.; LIU, S. Q. Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 26–33, 2018.

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**, v. 38, n. 3, p. 423–429, 2011.

USCANGA, M. G. A.; DÉLIA, M.-L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.

VANBENEDEN, N. et al. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 221–230, 2008.

VANDERHAEGEN, B. et al. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 2–3, p. 140–150, 2003.

VAN DIJKEN, H. The 21st international specialized symposium in yeast (ISSY 2001) - biochemistry, genetics, biotechnology, and ecology of non-conventional yeasts (NCY). **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 337-338, 2002.

VAN RIJSWIJCK, I. M. H. et al. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1591–1602, 2017.

VARELA, C. The impact of non- *Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 9861–9874, 2016.

VARELA, J.; VARELA, C. Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol

concentration. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 88–96, 2019.

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

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. **G3 (Bethesda)**, v. 4, n. 5, p. 783–793, 2014.

WANG, J. et al. Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 23, p. 6444–6448, 2016.

WOOLFIT M. et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 4, p. 721–733, 2007.

YEO, H. Q.; LIU, S. Q. An overview of selected specialty beers: developments, challenges and prospects. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 1607–1618, 2014.

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.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ANEXOS

Anexo A

Parâmetros determinados nos ensaios de microfermentação com 100 mL de mosto cervejeiro (10,9 °P) para as diferentes linhagens, com inóculos únicos e estratégia de inoculação sequencial (não-*Saccharomyces* seguida de *S. cerevisiae*): Peso total de CO₂ liberado (g) ao longo da fermentação; Atenuação aparente do mosto (%); Extrato aparente do mosto (°P); Teor de etanol (% v/v); Acidez total titulável (g/L) e pH.

Linhagem	Total CO ₂ (g)	Atenuação Aparente (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (% v/v)	Acidez Total (g/L)	pH
US-05	4,48	57,79	4,60	4,583	1,245	3,85
	4,00	56,88	4,70	4,573	1,233	3,70
Média	4,24	57,33	4,65	4,578	1,239	3,77
Desvio Padrão	0,33	0,64	0,07	0,007	0,008	0,10
SYL-1	1,69	16,51	9,10	1,183	1,507	4,07
	1,01	14,67	9,30	1,050	1,410	4,22
Média	1,35	15,59	9,20	1,116	1,458	4,14
Desvio Padrão	0,48	1,29	0,14	0,094	0,069	0,10
CCA077	1,30	15,59	9,20	0,900	1,275	4,34
	0,87	15,59	9,20	0,900	1,323	4,30
Média	1,08	15,59	9,20	0,900	1,299	4,32
Desvio Padrão	0,30	0,00	0,00	0,000	0,033	0,02
SYL-54	1,87	12,84	9,50	0,470	1,140	4,53
	2,70	12,84	9,50	0,486	1,248	4,43
Média	2,28	12,84	9,50	0,478	1,194	4,48
Desvio Padrão	0,58	0,00	0,00	0,011	0,076	0,07
SYL-48	3,02	13,76	9,40	0,810	1,107	4,42
	3,08	14,67	9,30	0,826	1,146	4,55
Média	3,05	14,22	9,35	0,818	1,127	4,48
Desvio Padrão	0,04	0,64	0,07	0,011	0,027	0,09
SYL-1/US-05	3,23	49,54	5,50	3,60	2,323	3,54
	3,42	48,62	5,60	3,58	2,317	3,53
Média	3,32	49,08	5,55	3,59	2,320	3,53
Desvio Padrão	0,13	0,64	0,07	0,01	0,004	0,00
CCA077/US-05	2,21	49,54	5,50	3,06	2,440	3,55
	2,24	50,45	5,40	3,50	1,522	3,66
Média	2,22	50,00	5,45	3,28	1,981	3,60
Desvio Padrão	0,02	0,64	0,07	0,30	0,648	0,07
SYL-54/US-05	3,86	55,96	4,80	4,70	1,482	3,76
	4,03	55,96	4,80	4,53	1,197	3,85
Média	3,94	55,96	4,80	4,61	1,339	3,80
Desvio Padrão	0,12	0,00	0,00	0,11	0,201	0,06
SYL-48/US-05	3,41	55,96	4,80	4,31	1,811	3,82
	3,59	55,04	4,90	4,53	1,507	3,75
Média	3,50	55,50	4,85	4,42	1,659	3,78
Desvio Padrão	0,12	0,64	0,07	0,15	0,214	0,04