

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

**Bioprospecção de leveduras nativas em fermentações de cachaça: avaliação
de aplicação no desenvolvimento de cervejas especiais**

Lethicia Suzigan Corniani

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2023**

Lethicia Suzigan Corniani
Cientista de Alimentos

**Bioprospecção de leveduras nativas em fermentações de cachaça: avaliação de aplicação
no desenvolvimento de cervejas especiais**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2023

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

Corniani, Lethicia Suzigan

Bioprospecção de leveduras nativas em fermentações de cachaça: avaliação de aplicação no desenvolvimento de cervejas especiais / Lethicia Suzigan Corniani. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

109 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Bebidas alcoólicas 2. Leveduras 3. Isolamento 4. Identificação 5. Inovação I. Título

**Dedico aos meus queridos pais, Luiz e Luzia;
e ao meu irmão Lucas.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Luzia, e ao meu irmão Lucas, por serem meu alicerce e minha inspiração em tudo, pelo incentivo, compreensão, apoio e amor incondicional.

Ao meu companheiro, namorado, amigo e marido Aníbal, pela ajuda incondicional, por toda paciência e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho e por todo companheirismo e amor.

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

Ao Dr. Cauré B. Portugal e à Dr.^a Renata Maria C. Furlan, meus sócios na Smart Yeast, pela parceria, paciência, ensinamentos, valiosa colaboração junto ao meu desenvolvimento científico e profissional e por todo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Às Bárbaras, que além de amigas são minhas sócias, Carol, Luisa, Mariana e Mariane, em especial à Marcelle, que foi minha companheira, confidente e meu apoio diário. Obrigada pela paciência no trabalho, pelas conversas, ajudas e risadas, levarei vocês sempre no meu coração.

À minha família em Piracicaba/SP que levo guardada com muito carinho no coração: República Forfé. Em especial à Rokutã, Rasterinha, Torq e Larapia pelo apoio diário, conversas, conselhos, risadas, broncas e histórias vividas. Levarei sempre vocês no meu coração.

Aos meus amigos de Rio Preto, aos colegas de graduação (Moska, Projac e Karrim) e ao pessoal da Mastocasa, em especial ao Jeronymo, pela força, risadas e momentos de distração.

À cervejaria A Tutta Birra, por cederem a infraestrutura e apoio para produção das cervejas, em especial ao meu amigo e cervejeiro Moska pela parceria, troca de experiências e colaboração ao longo deste projeto.

À Biomade Soluções Biotecnológicas, e ao Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica da Universidade Júlio de Mesquita – Unesp/Ibilce, por todo auxílio nas análises cromatográficas, especialmente à Janaina pela paciência, apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima, pela generosidade e por todos os ensinamentos.

Aos funcionários do Setor de Açúcar e Álcool (LAN/ESALQ), Rose, Silvino, Pedrinho e Luciana por todo auxílio concedido.

Aos provadores da análise sensorial das cervejas.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

À Universidade de São Paulo e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pelos investimentos e oportunidades concedidos a mim durante todos esses.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
CONTEXTO E JUSTIFICATIVA	13
Mercado cervejeiro	13
Leveduras e estilos cervejeiros	14
Seleção de leveduras: diferentes fontes e bioprocessos.....	16
Fermentação de caldo de cana na produção de cachaça: bioprospecção de linhagens com potencial de aplicação.....	18
Referências	20
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	25
Objetivos específicos:.....	25
1. CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA PRODUÇÃO DE CACHAÇA PARA USO NO DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS ESPECIAIS	27
Resumo	27
Abstract.....	27
1.1 Introdução.....	28
1.2 Metodologia.....	31
1.2.1 Coletas das amostras.....	31
1.2.2 Isolamento e seleção das amostras	31
1.2.3 Análise molecular dos isolados	32
Extração do DNA	32
Identificação dos isolados de <i>S. cerevisiae</i>	33
Tipificação de linhagens <i>S. cerevisiae</i>	34
1.2.4 Caracterização fisiológica dos isolados.....	34
Produção de sulfeto de hidrogênio	34
Assimilação de açúcares	35
Tolerância ao etanol.....	36
Produção de espuma	36
Capacidade de floculação	36
1.2.5 Ensaio de mini-fermentação em mosto cervejeiro.....	37
1.2.6 Análise estatística dos resultados	38

1.3 Resultados e Discussão	38
1.3.1 Isolamento e seleção das amostras	39
1.3.2 Análise molecular dos isolados	41
Avaliação de método de extração de DNA genômico	41
Identificação dos isolados <i>S. cerevisiae</i>	42
Tipificação e diferenciação de linhagens <i>S. cerevisiae</i>	43
1.3.3. Caracterização fisiológica dos isolados	45
1.3.3.1. Produção de sulfeto de hidrogênio	45
1.3.3.2. Assimilação de açúcares	47
1.3.3.3. Tolerância ao Etanol	51
1.3.3.4. Produção de espuma.....	53
1.3.3.5. Capacidade de floculação.....	54
1.3.4. Ensaio de fermentação.....	56
1.4 Considerações finais	61
Referências	62
ANEXO.....	67
2. PERFIL SENSORIAL DE CERVEJAS ESPECIAIS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTAÇÃO ESPOTÂNEA DE CACHAÇA	69
Resumo.....	69
Abstract	69
2.1 Introdução	70
2.2 Metodologia	72
2.2.1 Leveduras utilizadas.....	72
2.2.2 Propagação das linhagens	72
2.2.3 Produção da cerveja com linhagens de leveduras isoladas de cachaça.....	72
2.2.4 Análises físico-químicas das cervejas	74
2.2.5 Descrição dos métodos analíticos	75
Álcoois	75
Ésteres	76
Aldeídos e cetonas	76
2.2.6 Análise sensorial das cervejas.....	76
Amostras	77
Painel de provadores	77
Metodologia para a Análise sensorial	77

2.2.7 Análise de dados	79
2.3 Resultados e Discussão.....	80
2.3.1 Análise físico-química da cerveja	80
2.3.2 Caracterização das cervejas por cromatografia	84
2.3.3 Análise sensorial das cervejas	92
2.4 Conclusões.....	96
Referências	97
CONCLUSÕES GERAIS	101
ANEXOS.....	103

RESUMO

Bioprospecção de leveduras nativas em fermentações de cachaça: avaliação da aplicação no desenvolvimento de cervejas especiais

A expansão do segmento de microcervejarias vem ocorrendo em paralelo ao aumento da preocupação com a qualidade da cerveja, impulsionada por um mercado consumidor cada vez mais exigente. O setor cervejeiro tem se apresentado como um dos mais promissores, com ampla capilaridade em segmentos em crescimento, com ênfase em produtos diferenciados e de maior valor agregado, com os investimentos em tecnologia e desenvolvimento cada vez mais pautados por novas abordagens. A escolha das linhagens de leveduras é uma etapa crucial para a obtenção de diferentes perfis de cerveja. Desta forma, a utilização de leveduras alternativas isoladas de diversos nichos ambientais para serem aplicadas no processo cervejeiro, surge como parte das novas estratégias de processos. No entanto, ainda existem muitas possibilidades de exploração da biodiversidade de leveduras para a produção de cervejas especiais, de forma a agregar diversificação e inovação aos produtos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi selecionar e prospectar leveduras isoladas de processos tradicionais de cachaça, obtidas a partir do caldo de cana fermentado com fermento natural (“fermento caipira”) e avaliar sua aplicação na produção de cervejas especiais. As amostras de leveduras foram coletadas em pequenas destilarias de cachaça por meio de um consórcio com os produtores, a fim de gerar conhecimento científico para que eles também pudessem investir na melhoria de seus processos. As leveduras isoladas foram avaliadas do ponto de vista genético, fisiológico e tecnológico. Após caracterização fisiológica e tecnológica, as linhagens L-308, L-319, L-145 e L-242 foram selecionadas para aplicação como inóculos em ensaios de microfermentação em mosto cervejeiro. Os produtos das fermentações foram avaliados e comparados com uma linhagem comercial quanto à atenuação aparente do mosto, teor alcoólico, acidez total titulável e pH. As mesmas linhagens foram utilizadas na produção de cervejas do estilo *American Blond Ale* e comparada com uma linhagem comercial *Safbrew-S-33* (Fermentis) quanto aos parâmetros: teor alcoólico, acidez volátil, pH, cor, amargor e compostos orgânicos voláteis (álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas) e análise sensorial. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente para validação e comparação dos dados, mostrando que é possível selecionar leveduras com características e perfis sensoriais adequados para a produção de cerveja artesanal brasileira.

Palavras-chave: Bebidas alcoólicas, Leveduras, Isolamento, Identificação, Inovação

ABSTRACT

Bioprospection of native yeasts in cachaça fermentations: evaluation of application in the development of special beers

The expansion of the microbrewery segment has been taking place in parallel with the increase in the concern about beer quality, driven by a progressively demanding consumer market. The brewing sector has presented itself as one of the most promising, with wide capillarity in growing segments, emphasizing differentiated products with greater added value, with the investments in technology and development increasingly guided by new approaches. The choice of yeast strains is a crucial step for obtaining different beer profiles. In this way, the use of alternative yeasts isolated from different environmental niches to be applied in the brewing process emerges as part of the new process strategies. However, there are still many possibilities for exploring yeast biodiversity to produce specialty beers, to add diversification and product innovation. In this context, the aim of the present research work was to select and prospect yeasts isolated from traditional cachaça processes, obtained from the fermented sugar cane juice with natural starter ferment ("fermento caipira") and evaluate its application in special beer production. The yeasts samples were collected in small cachaça distilleries through a consortium with producers, to generate scientific knowledge so that they could also invest in improving their processes. The isolated yeasts were evaluated from genetic, physiological, and technological point of view. After physiological and technological characterization, the strains L-308, L-319, L-145, and L-242 were selected for application as inoculum in micro-fermentation trials in beer wort. The fermentation products were evaluated and compared with a commercial strain regarding the apparent must attenuation, alcohol content, total titratable acidity, and pH. The same strains were tested in the production of American Blond Ale style beers and compared with the commercial strain Safbrew-S-33 (Fermentis) regarding the parameters: alcohol content, volatile acidity, pH, color, bitterness, and volatile organic compounds (alcohols, esters, aldehydes, and ketones) and sensory analysis. The results obtained were statistically treated for data validation and comparison, showing that it is possible to select yeasts with suitable characteristics and sensorial profiles to produce Brazilian craft beer.

Keywords: Alcoholic beverages, Yeasts, Isolation, Identification, Innovation

ESTRUTURA DA TESE

A indústria cervejeira brasileira experimentou uma significativa evolução nos últimos anos, em grande parte, impulsionada pela crescente demanda dos consumidores por cervejas de qualidade e com perfis cada vez mais sofisticados. Essa tendência vem de encontro com o aumento de pesquisas sobre o papel das leveduras no processo produtivo e sua influência na determinação do caráter da cerveja. Alinhado a esse cenário, este trabalho pretendeu investigar a utilização de linhagens de leveduras não convencionais para a produção de cervejas especiais a partir do isolamento, identificação e caracterização fisiológica e tecnológica. Desta forma, isolaram-se e selecionaram-se linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a partir de processos de fermentação espontânea (“fermento caipira”) de caldo de cana para a produção de cachaça. Os resultados desta etapa são apresentados no capítulo 1, intitulado “Caracterização de cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos de fermentação espontânea de cachaça para elaboração de cervejas especiais”.

A partir das caracterizações fisiológicas e tecnológicas das leveduras previamente identificadas, algumas cepas foram selecionadas e avaliadas para a produção de cerveja do estilo *American Blond Ale*, cujos produtos utilizaram-se para posterior estudo comparativo, envolvendo análises físicoquímicas e sensorial. Estes resultados estão descritos no capítulo 2, intitulado “Perfil de cervejas especiais produzidas a partir de leveduras *S. cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaça”.

Em suma, esta tese busca avaliar, fomentar resultados práticos e destacar a relevância e o potencial de leveduras nativas para a aplicação em bioprocessos e obtenção de produtos diferenciados e inovadores.

CONTEXTO E JUSTIFICATIVA

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada obtida pela ação de leveduras sobre os açúcares presentes no mosto composto por malte de cevada ou outros grãos. Segundo a Lei da Pureza Alemã de 1516, os únicos ingredientes para a produção de cerveja eram água, malte de cevada e lúpulo. Apesar da importância intrínseca das leveduras no processo cervejeiro, elas foram negligenciadas por anos, sendo reconhecidas a partir de desenvolvimentos microbiológicos iniciados no século XIX (MORADO, 2009). Por outro lado, os cervejeiros contemporâneos tendem a usar novos ingredientes, incluindo especiarias, ervas e frutas, para realçar o sabor e diversificar os produtos, mas as leveduras ainda têm o papel principal na definição das características organolépticas da cerveja (MICHEL et al., 2016).

Antes da industrialização da produção de cervejas e do aperfeiçoamento de técnicas relacionadas à ciência da fermentação, o processo era conduzido sem reprodutibilidade, com uma vasta diversidade de espécies e linhagens de leveduras atuando durante o processo fermentativo (BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016). Um marco considerável foi o início do uso de culturas de leveduras puras na década de 1880, visando a melhoria da consistência e padronização da qualidade das cervejas (CUBILLOS et al., 2019). Desde então, a utilização de leveduras selecionadas e devidamente caracterizadas passou a ser uma prática comum, sendo as linhagens do gênero *Saccharomyces* as mais difundidas nesses processos (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

As leveduras selecionadas trouxeram avanços positivos, otimização dos processos de produção e melhoria da qualidade, no entanto, isso contribuiu para a redução da exploração da diversidade fisiológica e metabólica que linhagens de leveduras provenientes de diferentes ambientes podem oferecer. No entanto, é possível observar esforços recentes sendo direcionados para a retomada da exploração dessa diversidade disponível. O sucesso contínuo do mercado de cervejas artesanais, a demanda por cervejas especiais e o interesse dos consumidores por estilos variados têm contribuído para o aumento de estudos visando o isolamento de novas cepas e espécies de *Saccharomyces* encontradas naturalmente em diferentes ambientes (CUBILLOS et al., 2019; HITTINGER; STEELE; RYDER, 2018).

Mercado cervejeiro

As cervejas representam a maior fatia de mercado no segmento de bebidas alcoólicas no Brasil; em 2018 o setor foi responsável pela produção de 14,2 bilhões de litros, representando um aumento de 1% e um incremento de *market share* global de 7,4% em

relação ao ano anterior, o que mantém o país como o terceiro maior produtor mundial de cerveja. O Brasil também ocupa o terceiro lugar em consumo total anual, depois da China e Estados Unidos. No entanto, mesmo ocupando altas posições no *ranking* global, ao pensar em consumo per-capita, o Brasil ocupa a 28ª posição, com um consumo de 60 L/per-capita (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2019a; KIRIN BEER UNIVERSITY, 2019b).

Neste contexto, as cervejas consideradas “especiais” têm ganho cada vez mais popularidade, sendo que em 2018 representavam até 2,7% do volume de produção total, o que equivale a quase 380 milhões de litros por ano, produzidos principalmente por pequenas cervejarias. Isso denota o grande fortalecimento do setor e a necessidade de inovações e melhorias no processo (ABRACERVA, 2018). Com a expansão do setor de microcervejarias, havia no Brasil cerca de 1.400 cervejarias registradas e em operação em 2020. Adicionalmente, se forem consideradas as cervejarias popularmente designadas como “ciganas” (que usam instalações de terceiros), o número total de registros de produto se aproxima de 34 mil. Esses números fazem parte do Anuário da Cerveja no Brasil 2020, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021).

Estes dados de consumo nacional, que outrora foram considerados discretos quando comparados aos de outros países, hoje comprovam a esperada tendência de aumento, em decorrência da qualificação da produção e da difusão do conhecimento sobre bebidas no país (SILVELLO, 2019). As cervejas artesanais vêm ganhando mercado em nosso país e esse avanço pode ser explicado pelo aumento do interesse do consumidor em diversos estilos de cervejas. Tal cenário corrobora com a trajetória de inovação experimentada por esse setor que utiliza diversos mecanismos para atrair novos consumidores, como o emprego de diferentes matérias-primas (adição de ingredientes regionais, café, mel, frutos, ervas etc.), além do malte de cevada, dos lúpulos nacionais e leveduras, estimulando assim, o interesse do setor na descoberta e aplicação de novas linhagens de leveduras para a fabricação de cervejas artesanais (AQUILANI et al., 2014; GIBSON et al., 2017; HITTINGER et al. , 2018).

Leveduras e estilos cervejeiros

Muitos estilos de cerveja se desenvolveram ao longo do tempo, todos com seu caráter e sabor únicos influenciados, principalmente, por seu país de origem (PROTZ, 1995; GLOVER, 2001).

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais sensíveis e instáveis do ponto de vista sensorial. O sabor e aroma da cerveja variam devido a diversos aspectos e influências que

ocorrem durante o processo de produção (REITENBACH, 2016), sendo a fermentação uma etapa crítica para a definição desses parâmetros (KUCK, 2008). Concentração e composição do mosto, temperatura e duração da fermentação, são fatores que influenciam diretamente no crescimento das células de leveduras e, conseqüentemente, na quantidade dos compostos aromáticos gerados. Esses compostos são provenientes da síntese metabólica das leveduras e influenciam diretamente no sabor e aroma da cerveja (REITENBACH, 2016).

No que diz respeito à produção de bebidas alcoólicas, a etapa de fermentação é a principal determinante dos aspectos que exercem influência no sabor, aroma e características físico-químicas do produto. É através da metabolização dos açúcares, disponíveis no mosto que as leveduras sintetizam etanol, dióxido de carbono e diversos metabólitos. Essencialmente, a atividade metabólica da levedura sobre o processo, em paralelo com o tipo de mosto e condições empregadas, irá influenciar diretamente o perfil químico e organoléptico do produto (DRAGONE; ALMEIDA-SILVA, 2010; POSTIGO et al., 2021).

As leveduras *Saccharomyces*, envolvidas nos processos de fermentação alcoólica, desempenham um papel decisivo na caracterização organoléptica dos produtos (ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016). Para a fermentação de bebidas em larga escala, como na produção de cerveja, vinificação e produção de bebidas destiladas, são utilizadas, geralmente, culturas puras de cepas selecionadas de *Saccharomyces spp.*, enquanto em processos de menor escala (artesanal), alguns fabricantes optam pela fermentação espontânea ou desenvolvida pela microflora nativa encontrada na matéria-prima (WALKER; STEWART, 2016).

S. cerevisiae é a espécie mais comum nos processos cervejeiros, mas novas alternativas de inóculos têm ganho popularidade, principalmente, pela possibilidade da aplicação de leveduras não-convencionais (não-*Saccharomyces*) com diferentes propósitos. Na maioria dos casos, trata-se de leveduras pouco caracterizadas e consideradas “selvagens”, mas que podem ser inseridas durante a fermentação ou maturação e contribuir para o desenvolvimento de produtos diferenciados e inovadores (LEA; PIGGOTT, 2003). Apesar de apresentarem baixo rendimento fermentativo em geral e de serem mais sensíveis ao etanol, muitas dessas leveduras parecem ter capacidade de imprimir características distintas de sabor e aroma. Embora muitas delas já tenham sido caracterizadas como contaminantes de processos fermentativos, algumas espécies despontam como valiosas produtoras de ésteres aromáticos em processos monitorados e bem controlados (BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016).

Um dos critérios utilizados para a classificação e produção de cervejas é baseado no tipo de fermentação e nos próprios microrganismos utilizados. Os dois tipos principais de leveduras foram classificados a partir das características de floculação e temperaturas de processo: as de alta fermentação (*ales*) e as de baixa fermentação (*lagers*). Os dois principais estilos são ainda fundamentados nestas características, sendo as leveduras de alta fermentação geneticamente mais diversificadas e utilizadas em temperaturas que variam entre 18°C e 24°C. Quanto às leveduras de baixa fermentação, elas são mais conservadas geneticamente e atuam em temperaturas inferiores (8°C a 14°C) (LODOLO et al., 2008). Outra categoria muito particular é a das cervejas *lambics*, que são elaboradas a partir da ação de leveduras ditas ‘selvagens’, sendo fermentações espontâneas, não totalmente controladas e iniciadas por uma microbiota autóctona (MARTENS; DAWOUD; VERACHTERT, 1992). Cepas selecionadas do gênero *Saccharomyces* são utilizadas com os mais diversos propósitos devido à plasticidade e capacidade que apresentam para assimilar diferentes substratos (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA-SILVA, 2006). No entanto, com o aumento da demanda por produtos diferenciados e com mais expressão, novas cepas de leveduras estão sendo isoladas e caracterizadas com a proposta de elaboração de cervejas especiais com componentes aromáticos e gustativos particulares (VANDERHAEGEN et al., 2003).

De um ponto de vista mais técnico, as cervejas são agrupadas por estilos, sendo o *Beer Judge Certification Program* uma das classificações mais aceitas mundialmente. Dentre as cervejas de alta fermentação, uma das categorias compreende as cervejas do estilo denominado *Blond Ale*, um estilo americano considerado fácil de beber, acessível e com leve presença de sabor e aroma de malte, muitas vezes caracterizada por notas frutadas e ressaltando o lúpulo utilizado. Bem equilibrada e com baixa turbidez, é uma cerveja que tende a ser refrescante e sem sabores muito pronunciados (BJCP, 2015).

Seleção de leveduras: diferentes fontes e bioprocessos

No processo cervejeiro, as leveduras que são utilizadas não são definidas apenas por apresentarem boa eficiência e rendimento fermentativo, mas também por conta do perfil organoléptico que imprimem na bebida final (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). A procura por cervejas especiais é crescente e vem estimulando o setor a buscar inovações no processo de produção (GARAVAGLIA; SWINNEN, 2018). No que diz respeito à fermentação, as leveduras representam o ponto principal, tanto no que se refere à eficiência e qualidade do processo quanto no que diz respeito à diversidade e produção de compostos aromáticos (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). A indústria cervejeira está passando por um

período de mudança e experimentação, em grande parte impulsionadas pelas crescentes demandas por maior diversidade e sofisticação de produtos. Isso coincidiu com uma maior análise do papel da levedura na determinação do caráter da cerveja e a ampla disponibilidade de ferramentas para pesquisas relacionadas.

A domesticação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* revolucionou a fermentação comercial, permitindo que vinicultores e cervejeiros obtivessem um produto replicável e com maior qualidade. O isolamento e a caracterização dessas cepas únicas de levedura, dessa forma, possibilitam cada vez mais variedade de características organolépticas que podem ser alcançadas no produto (ERTEN; TANGULER; CAKIROZ, 2007; LUMAN; LENTZ, 2011; LENTZ et al., 2014). Aquelas leveduras ditas ‘selvagens’, não inseridas tradicionalmente no processo cervejeiro, podem oferecer rotas metabólicas diversificadas em relação às linhagens já consolidadas, sendo capazes de formar novos produtos, o que pode ser, potencialmente, interessante para a produção de novos estilos de cerveja (CAPECE et al., 2018).

Estudos envolvendo análises metagenômicas têm demonstrado que as linhagens industriais representam apenas uma pequena fração da biodiversidade natural de fungos unicelulares (LITI et al., 2009; WANG et al., 2012). Tikka et al. (2013) utilizou várias amostras de frutas como fontes para o isolamento de leveduras, a partir do isolamento e identificação de cepas de leveduras de habitats naturais, através da triagem dessas cepas de levedura para tolerância ao etanol e caracterização molecular usando marcador RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Ainda nesse âmbito, diversos estudos estão sendo conduzidos, visando o rastreamento e seleção em bancos de leveduras, de diferentes fontes e bioprocessos, demonstrando a diversidade genética e o potencial da utilização de novas espécies e linhagens na indústria de bebidas alcoólicas (ANDUALEM; SHIFERAW; BERHANE, 2017; ARAÚJO, 2013; ARAÚJO et al., 2018; CHRISTOFOLETI-FURLAN et al., 2020; COMITINI et al., 2011; GARCIA, 2017; GUIMARÃES et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2016; FUJIHARA et al., 2014; PINTO, 2018; ŠURANSKÁ; VRÁNOVÁ; OMELKOVÁ, 2016). O isolamento de novas leveduras tem se mostrado interessante, podendo trazer novas perspectivas para a composição de sabor, perfil aromático e a complexidade organoléptica da bebida como um todo (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Assim sendo, linhagens de leveduras fermentadoras isoladas a partir de outros bioprocessos podem apresentar um novo traço em termos de variabilidade genética e metabólica, podendo ser consideradas na elaboração de cervejas especiais inovadoras (ALBERTIN et al., 2011). Segundo Cubillos et al. (2019) leveduras alternativas, com

potencial de fermentação, têm sido isoladas de diferentes nichos ambientais e aplicadas à produção de cerveja. Visando expandir o repertório de leveduras disponíveis para a fabricação de cerveja, esforços recentes se concentram no isolamento de novas espécies de *Saccharomyces* ou espécies 'selvagens' em todo o mundo (CUBILLOS et al., 2019; GARCIA, 2017; PERIS et al., 2014; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Nessa perspectiva, alguns trabalhos têm se destacado na avaliação de linhagens isoladas a partir de frutas (SILVA-FILHO, 2019; LENTZ et al., 2014; SATIRO, 2021), fermentação natural de pães (MARONGIU et al., 2015), processos vitivinícolas (CANONICO; COMITINI; CIANI, 2014) e processo de produção de etanol (CHRISTOFOLETI-FURLAN et al., 2020; LORCA MANDUJANO et al., 2022) com potencial para fermentação em processo cervejeiro, tanto no que se refere à eficiência fermentativa quanto na qualidade sensorial da bebida.

Em estudo recente, Silva-Filho (2019) isolou leveduras a partir de frutos de *Citrus spp* e avaliou a capacidade de fermentação em mosto cervejeiro de 144 cepas. De acordo com o trabalho, a obtenção de linhagens com características desejáveis para a produção de cervejas favorece o desenvolvimento técnico e científico do setor e aparece como uma alternativa aos fermentos importados, possibilitando mais independência e autonomia ao mercado cervejeiro.

O uso de novas leveduras no processo de produção de cervejas, além de representar uma fonte alternativa de matéria-prima, também oferece uma abordagem inovadora para a produção de cervejas especiais e originais (CAPECE et al., 2018).

Fermentação de caldo de cana na produção de cachaça: bioprospecção de linhagens com potencial de aplicação

As leveduras encontram-se em abundância em diversos ambientes; no entanto, apenas uma minoria dessas linhagens, independentemente da fonte na qual elas tenham sido isoladas, podem vir a apresentar características fisiológicas de interesse para aplicação em fermentações comerciais. Sabe-se que a composição de açúcares e outros recursos nutricionais presentes no mosto de cana-de-açúcar utilizado para a produção cachaça e aqueles da cerveja são distintos, no entanto, essas cepas possuem uma capacidade de adaptação eficiente, apresentando potencial de aplicação à novos ambientes (LENTZ et al., 2014).

Por definição, a aguardente de cana e a cachaça são produzidas a partir da destilação do caldo da cana-de-açúcar fermentado. A fermentação alcoólica é a etapa principal da produção, essencialmente conduzida por leveduras da espécie *S. cerevisiae* (MIRANDA,

2005). Em muitas destilarias artesanais, o método tradicional utilizado para a produção de cachaça ainda é a fermentação espontânea, um processo que se baseia na premissa de uma seleção adaptativa pontual e que favorece a instalação e proliferação de leveduras fermentadoras nativas em detrimento de outros microrganismos aeróbios ou de baixa capacidade fermentativa. A fermentação espontânea é conduzida por uma microbiota mista de leveduras, provenientes da cana-de-açúcar, dos equipamentos e da mescla conhecida como “fermento caipira” (SOUZA et al., 2012).

As cepas de *S. cerevisiae* e de outras espécies isoladas de pequenas destilarias de cachaça, segundo Oliveira et al. (2004), podem apresentar parâmetros de fermentação bem diferenciados entre si, porém através de agrupamentos dos parâmetros de desempenho fermentativo foi possível inferir o potencial da seleção de leveduras de cachaça e suas possíveis aplicações em outros bioprocessos. Sabe-se que diversas espécies de levedura podem participar ativamente nesses processos e que cultivos mistos representativos dessa flora microbiana poderiam contribuir para a qualidade química e o sabor da cachaça. Quando utilizadas dentro de processos bem controlados, essas leveduras conduzem a um produto sem traços negativos, podendo constituir um forte indicador de tipicidade da cachaça (PORTUGAL et al., 2016) e, eventualmente, com potencial para utilização no processo de produção de cervejas com apelos de especificidade e peculiaridade.

Unidades produtoras de cachaça (também denominadas Destilarias de cachaça) podem constituir um ambiente interessante para selecionar novas linhagens de leveduras capazes de serem utilizadas em aplicações biotecnológicas como produção de cerveja e bioetanol. Segundo Araújo et al. (2018), as dornas de fermentação espontâneas de cachaça parecem representar um nicho com alta diversidade ecológica para selecionar células de levedura que, devido às suas propriedades específicas, podem ser utilizadas para a produção de outras bebidas alcoólicas. A avaliação do potencial de utilização de leveduras isoladas do processo de produção de cachaça na produção de cerveja foi tema de estudo realizado por Araújo (2013), demonstrando o potencial da utilização de duas das cepas de leveduras isoladas na produção de cervejas do estilo *german pilsner e weissbier*.

As linhagens provenientes de processos de fermentação espontânea na produção da cachaça podem ser oportunas à produção de cervejas. Além disso, o emprego de linhagens isoladas de outros bioprocessos podem contribuir com atributos relevantes e para a obtenção de um produto inovador, com características peculiaridades de sabor e aroma, trazendo um conceito de regionalidade, além de ampliar a gama de leveduras disponíveis para o processo.

Referências

- ABRACERVA, A.B. DE C.A. **MERCADO DA CERVEJA 2018**, 2018.
- ANDUALEM, B.; SHIFERAW, M.; BERHANE, N. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolates from “tella” for beer production. **Annual Research and Review in Biology**, v. 15, n. 5, p. 1–12, 2017.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: Role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2035–2046, 2016.
- ALBERTIN, W.; MARULLO, P.; AIGLE, M. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2772-2784, 2011.
- ALMEIDA-SILVA, J.B. Cerveja. In: Venturini Filho, G. W. **Tecnologia de Bebidas**. Edgar Blucher, Brasil, 2005, p. 347-380.
- ARAÚJO, T.M. **Caracterização bioquímica-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 2013. 95p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.
- ARAÚJO, T.M., SOUZA, M.T., DINIZ, R.H.S. et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1749-1766, 2018. DOI.10.1007/s10482-018-1063-3
- AQUILANI, B.; LAURETI, T.; POPONI, S.; SECONDI, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: an exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214–224, 2014. DOI. 10.1016/j.foodqual.2014.12.005
- 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.
- BJCP - BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. **2015 Style guidelines**. Disponível em: <http://www.bjcp.org/stylecenter.php> Acesso em 02 ago. 2018.
- 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.
- CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 3, p. 262-267, 2014.
- CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; SIESTO, G.; ROMANO, P. Conventional and non- conventional yeasts in beer production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018.
- CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA-SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro. 1ª Parte- As leveduras. **Revista Analytica**, v. 25, p. 36–42, 2006.
- CHRISTOFOLETI-FURLAN, R.M.; PORTUGAL, C.B.; VARIZE, C.S. et al. Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel starters for high-gravity brewing. **Food Research International**, v. 135, p. 109282. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109282.

- COMITINI, F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P. et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 873–882, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- CUBILLOS, F.A.; GIBSON, B.; GRIJALVA-VALLEJOS, N. et al. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, p. 383– 398, 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- DRAGONE, G.; ALMEIDA-SILVA, J.B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Bebidas Alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2010, v. 1, cap. 2, p. 15-48.
- ERTEN, H.; TANGULER, H.; CAKIROZ, H. The effect of pitchingrate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 13, p. 75–79. 2007.
- FIGUEIREDO, B. I. C. **Cruzamento entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes. Potencial par a produção de cerveja**. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- FUJIHARA, H.; HINO, M.; TAKASHITA, H. et al. Efficient screening of environmental isolates for *Saccharomyces cerevisiae* strains that are suitable for brewing. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v 78, n. 6, p. 1086-1089, 2014.
- GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. (Ed.) **Economic perspectives on craft beer: A revolution in the global beer industry**. 494p. Springer Nature, 2018.
- GARCIA, M.M.E. **Produção de cerveja: Utilização de estirpes não- convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja**. 2017. 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar - Processamento de Alimentos) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 2017. <http://hdl.handle.net/10400.5/13875>
- GIBSON, B.; GEERTMAN, J.M.A.; HITTINGER, C.T. 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. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- GLOVER, B. **The World Encyclopedia of Beer**. Lorenz Books,Anness Publishing Limited, New York. 2001.
- GUIMARÃES, T.M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 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. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.10.004.
- KIRIN BEER UNIVERSITY. **Global Beer Consumption by Country in 2018**: report. 2019a. https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2019/1224_01.html.
- KIRIN BEER UNIVERSITY. **Global Beer Consumption by Country in 2018**: report. 2019b. https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2019/1003_01.html.
- KUCK, L.S. Cerveja: **sabor e aroma**. 2008. 46f. Trabalho acadêmico - Graduação em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. Second Edition Springer Science+Business Media New York, 2003.

LENTZ, M.; PUTZKE, T.; HESSLER, R. et al. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 559–564, 2014. DOI: 10.1002/jib.154

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M. et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 337-341, 2009. DOI:10.1038/nature07743

LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018-1036, 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x

LORCA MANDUJANO, G.P.; ALVES, H.C.; PRADO, C.D. et al. Identification and selection of a new *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Brazilian ethanol fermentation process for application in beer production. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103958, 2022. DOI:10.1016/j.fm.2021.103958.

LUMAN, E.; LENTZ, M. Pitching yeast by mass in a small microbrewery. **Master Brewers Association of the Americas. Technical Quarterly**, v. 48, n. 4, p. 113-115, 2011. DOI: 10.1094/TQ-48-4-1228-01.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Anuário da Cerveja 2020. Report: 2021**.

MARONGIU, A.; ZARA, G.; LEGRAS, J.L. et al. Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 85-92, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1525-1>

MARTENS, B.H.; DAWOUD, E.; VERACHTERT, H. Synthesis of aroma compounds by wort enterobacteria during the first stage of lambic fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, n. 5, p. 421–425, 1992. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01126.x>

MICHEL, M.; MEIER-DORNBERG, T.; JACOB, F. et al. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 569–587, 2016. <https://doi.org/10.1002/jib.381>

MIRANDA, M.B. **Avaliação físico-química de cachaças comerciais e estudo da influência da irradiação sobre qualidade da bebida em tonéis de carvalho**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. Editora Larousse, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2004. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000013286.30695.4e

PERIS, D.; SYLVESTER, K.; LIBKIND, D. et al. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 8, p. 2031–2045, 2014. <https://doi.org/10.1111/mec.12702>

PINTO, F.O. **Isolamento, seleção e caracterização de leveduras selvagens com potencial para a**

- produção de cerveja.** 2018. 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. <http://hdl.handle.net/10183/210388>
- PORTUGAL, C.B.; ALCARDE, A.R.; BORTOLETTO, A.M. et al. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1587–1597, 2016. DOI:10.1007/s00217-016-2659-3
- POSTIGO, V.; GARCÍA, M.; CABELLOS, J.M.; ARROYO, T. Wine *Saccharomyces* yeasts for beer fermentation. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 290. (2021). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040290>
- PROTZ, R. **The Ultimate Encyclopedia of Beer**. Carlton Books Limited, London. 1995.
- REITENBACH, A.F. **Desenvolvimento de nariz eletrônico para detecção de compostos voláteis na cerveja.** 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2016. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/176718>
- SATIRO, L.S. **Seleção de leveduras presentes na microfauna do abacaxi cultivado na Paraíba para fermentação.** 2021. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, 2021. <http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/3929>
- SILVA-FILHO, C.H.B. **Isolamento e identificação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de frutos de *citrus* × *limonia* com capacidade de fermentação de mosto cervejeiro.** 48p. Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- SILVELLO, G.C. **Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-23052019-170957>
- SOUZA, A.P.G.; VICENTE, M.A.; KLEIN, R.C. et al. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaca fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 379–392, 2012. DOI: 10.1007/s10482-011-9643-5.
- STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K.J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 61-80, 2014. DOI: 10.1146/annurev-micro-091213-113025.
- ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 181-190, 2016.
- TIKKA, C., OSURU, H.P.; ATLURI, N. et al. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. **Bioinformation**, v. 9, n. 8, p. 421-425. 2013. DOI: 10.6026/97320630009421.
- VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S. et al. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 2-3, p. 140-150, 2003. doi: 10.1007/s00253-003-1340-5.
- WALKER, G.M.; STEWART, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30. 2016. DOI:10.3390/beverages2040030.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar, selecionar e caracterizar leveduras de processos tradicionais de fermentação espontânea de cachaça e avaliar sua aplicação para a produção de cervejas.

Objetivos específicos:

- ✓ Isolar microrganismos provenientes de fermentações espontâneas de caldo de cana na produção de cachaça.
- ✓ Selecionar, identificar e caracterizar os isolados de levedura provenientes de fermentações espontâneas de caldo de cana.
- ✓ Elaborar cervejas com leveduras selecionadas a partir de fermentações de caldo de cana e previamente caracterizadas.
- ✓ Caracterizar, avaliar e comparar a composição química das cervejas.
- ✓ Obter resultados analíticos que possibilitem identificar diferenças entre as cervejas produzidas, ressaltando a originalidade da presente pesquisa.
- ✓ Avaliar a aceitação das cervejas desenvolvidas e caracterizá-las do ponto de vista sensorial.

Obs. Um esquema indicando a sequência do trabalho está apresentado na Figura 1.

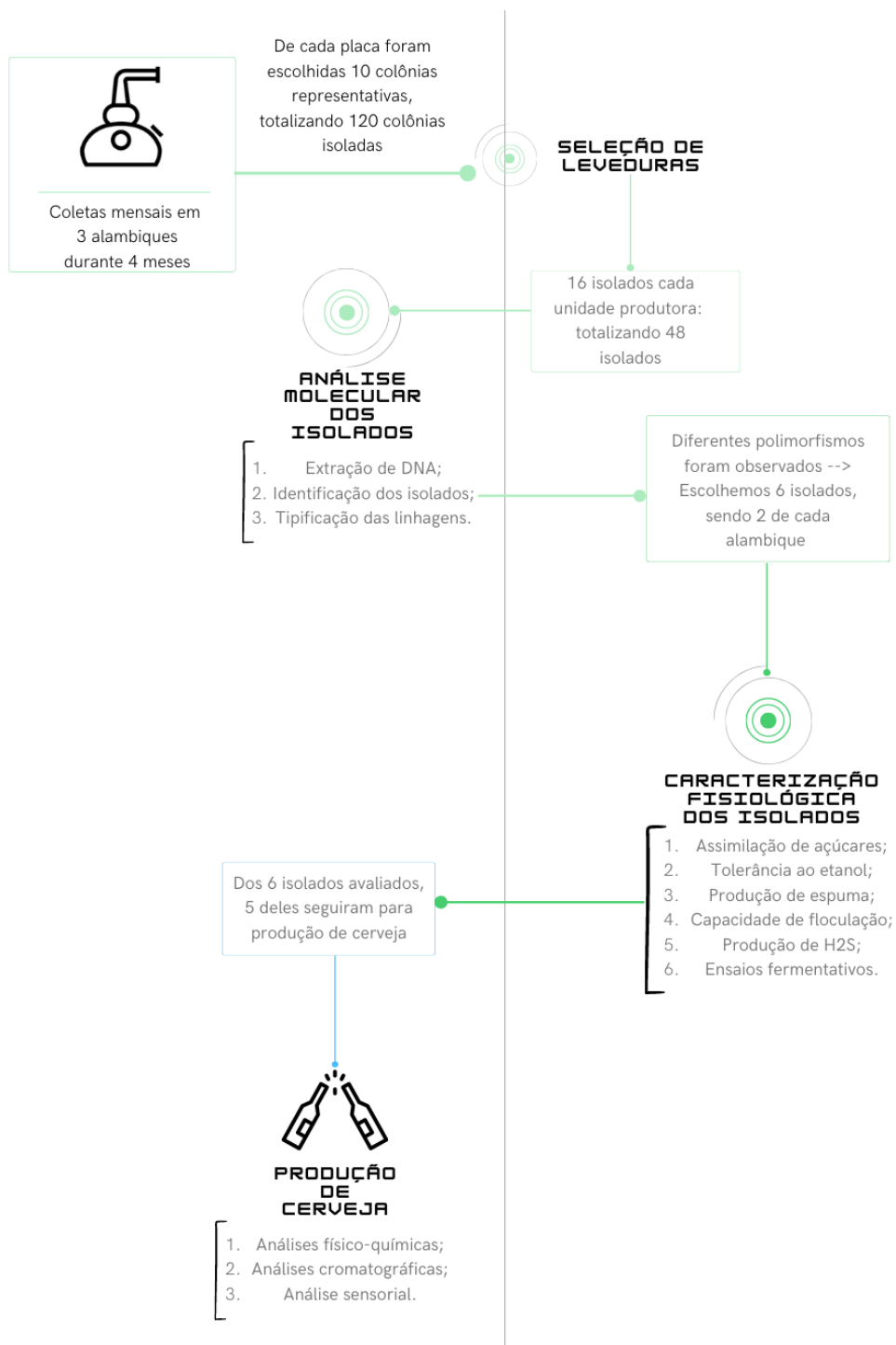


Figura 1. Fluxograma do programa de seleção de cepas de levedura e etapas eliminatórias de triagem.

1. CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA PRODUÇÃO DE CACHAÇA PARA USO NO DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS ESPECIAIS

Resumo

Atualmente, com a expansão do mercado de microcervejarias, a preocupação com a qualidade da cerveja aumentou, principalmente devido ao surgimento de um mercado consumidor mais exigente. O setor cervejeiro tem se apresentado como um dos mais promissores, com ampla capilaridade em segmentos em crescimento, com destaque para os produtos diferenciados e de maior valor agregado. Desta forma, objetivo deste trabalho foi avaliar a seleção e prospecção de leveduras isoladas a partir de processos tradicionais de fermentações espontâneas de cachaça, e analisar a aplicação destas linhagens na produção de cervejas especiais. A coleta de amostras para seleção das linhagens de leveduras foi realizada com pequenos produtores, em uma parceria colaborativa, a fim de gerar conhecimento científico e transferência de tecnologia com vista a melhoria dos seus processos. As linhagens de leveduras selecionadas foram caracterizadas do ponto de vista genético, fisiológico e tecnológico. Diante do comportamento das linhagens nas etapas de caracterização, as linhagens L-145, L-242, L-308 e L-319 foram selecionadas para aplicação como inóculos em ensaios de microfermentação em mosto cervejeiro. Em seguida, os produtos das fermentações foram avaliados quanto a atenuação aparente do mosto, teor alcoólico, acidez total titulável e pH. Os resultados deste estudo demonstraram o potencial do uso de isolados de leveduras de bioprocessos de fermentação espontânea de cachaça para a produção de cerveja artesanal.

Palavras-chaves: Leveduras selvagens, Fermentação, Seleção.

1. SCREENING OF ISOLATED YEASTS FROM CACHAÇA PRODUCTION FOR USE IN THE DEVELOPMENT OF SPECIALTY BEERS

Abstract

Nowadays, with the expansion of the microbrewery market, the concern about the quality of beer has increases, mainly due to the emergence of a more demanding consumer market. The brewing sector has presented itself as one of the most promising, with wide capillarity in growing segments, with emphasis on differentiated products with greater added value. Thus, the aim of this work was to evaluate the selection and prospection of yeasts isolated from traditional processes of spontaneous cachaça fermentation, and to analyze the application of these strains in the special beer production. The collection of samples for the selection of yeast strains was carried out with small producers, in a collaborative partnership, to generate scientific knowledge and technology transfer with a view to improving their processes. The selected yeast strains were characterized from a genetic, physiological, and technological point of view. In front of the behavior of the strains in the characterization steps, the strains L-145, L-242, L-308, and L-319 were selected for application as starter inoculum in micro-fermentation trials in brew wort. Then, the fermentation products were evaluated for apparent must attenuation, alcohol content, total titratable acidity, and pH. The results of this study demonstrated the potential of using yeast isolates from the spontaneous cachaça fermentation bioprocesses to produce craft beer.

Keywords: Wild yeasts, Brewing, Selection.

1.1 Introdução

A produção de cervejas, tradicionalmente, faz uso daquelas leveduras consideradas “convencionais”, sendo linhagens já historicamente vinculadas a processos de fermentação de acordo com o estilo e a origem (GARAVAGLIA; SWINNEN, 2018). No entanto, com a crescente demanda por estilos variados e com o crescimento do setor de cervejarias artesanais (AQUILANI et al., 2015) também aumentaram o número de pesquisas e tentativas de aplicação de novas linhagens de leveduras na elaboração de cervejas (GIBSON et al., 2017; HITTINGER; STEELE; RYDER, 2018).

Do ponto de vista sensorial, a cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais sensíveis e instáveis. O sabor e aroma da cerveja podem variar em função de diversos aspectos e influências que ocorrem durante o processo de produção (REITENBACH, 2016), sendo que a fermentação é uma etapa crítica para a definição desses parâmetros (KUCK, 2008). O processo de fermentação pode ser considerado o ponto central na produção de qualquer bebida alcoólica, pois é nesta etapa que ocorre a conversão dos açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura, sob condições anaeróbicas ou semi-anaeróbicas (DRAGONE; ALMEIDA-SILVA, 2010). Nesta etapa, a concentração, composição do mosto, temperatura e a duração da fermentação influenciam diretamente nos padrões do metabolismo celular e, por conseguinte, no teor dos compostos voláteis produzidos. Esses compostos são provenientes da síntese metabólica das leveduras e têm impacto direto no sabor e aroma da cerveja (REITENBACH, 2016).

De acordo com Gibson et al. (2017), as análises genéticas mais recentes ajudaram a compreender melhor os processos que levaram à domesticação das linhagens de leveduras cervejeiras, além de viabilizarem sua identificação e exploração direcionada para o desenvolvimento de cervejas com características específicas.

As técnicas mais tradicionais para identificação e diferenciação de linhagens de leveduras, como a cariotipagem, normalmente requerem etapas que retardam os resultados, além de serem mais onerosas. Avanços nas técnicas de biologia molecular, como a utilização de enzimas de restrição de DNA e o uso de primers específicos pela técnica de PCR permitem a amplificação de fragmentos de interesse e através da eletroforese em gel de agarose é possível diferenciar as linhagens a partir do perfil de bandas obtidas no gel. Diante disso, Martorell et al. (2005) desenvolveram um método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time PCR) para identificar e quantificar de forma rápida e sensível leveduras da espécie *S. cerevisiae* em amostras de vinho. Primers específicos foram propostos para a detecção de *S. cerevisiae* utilizando as informações de sequências de DNA polimórfico

amplificado aleatoriamente para diferenciar *S. cerevisiae* de outras espécies irmãs, como por exemplo *S. bayanus*, *S. pastorianus* e *S. paradoxus*.

Ao monitorar populações de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica, utilizando PCR em tempo real, Hierro et al. (2007) propuseram e utilizaram primers espécie-específicos para detecção e quantificação de *S. cerevisiae*. A metodologia viabilizou o monitoramento dessas leveduras durante todo o processo de fermentação, podendo identificar possíveis pontos de deterioração ou contaminação.

Diversas metodologias de tipificação baseadas em polimorfismos de DNA foram desenvolvidas, o que permitiu uma maior eficiência na discriminação entre cepas de leveduras (SCHULLER et al., 2004).

Além dos testes de caracterização microbiológicos e fisiológicos, técnicas de análise molecular como a cariotipagem e análises de DNA ribossômico (rDNA) e mitocondrial têm sido empregadas com o objetivo de estreitar o conhecimento acerca da identificação e separação de linhagens de leveduras. Tradicionalmente, a distinção de leveduras baseava-se em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos; no entanto, em grupos de leveduras com perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces*, esses critérios nem sempre são adequados para a tipificação intraespecífica e, diante disso, os métodos de identificação molecular têm trazido a possibilidade de uma distinção mais precisa entre linhagens (KURTZMAN; FELL, 2006).

Existem diversas técnicas moleculares para a caracterização de espécies de leveduras; no entanto, as mais empregadas e destacadas como mais eficientes, são aquelas que se baseiam na restrição enzimática do DNA genômico (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Estes métodos proporcionam uma rápida análise da diversidade genética de populações, fornecendo fingerprints distintos, dependentes da composição das espécies de leveduras estudadas e permitindo análises comparativas entre as populações. Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimáticos capazes de revelar o polimorfismo dos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenéticos (SUÁREZ et al., 2008). Essa técnica tem sido empregada para caracterizar e estudar a diversidade de leveduras fermentadoras, empregadas na produção de diversas bebidas alcoólicas como cachaça, cerveja, vinho e sidra (VICENTI, 2007). Existem métodos moleculares mais refinados que realizam o sequenciamento completo do rDNA, porém, este processo é custoso, sobretudo quando uma grande quantidade de linhagens é avaliada, o que em diversos casos pode inviabilizar o processo (SUÁREZ et al., 2008).

Recentemente, avanços nas pesquisas permitiram a otimização do par de primers utilizados nas análises de regiões interdelta, resultando em padrões altamente polimórficos. Os elementos delta (δ) são sequências de DNA repetitivo, frequentemente, associadas a transposons de leveduras, cujos números e localizações apresentam certa variabilidade intraespecífica e constituem bons marcadores genéticos (impressão digital genética) na detecção de polimorfismos em cepas de *S. cerevisiae* (XUFRE et al., 2011; TRA BI et al., 2016). Esta tipificação por PCR na região interdelta apresenta um poder discriminatório semelhante ao da cariotipagem. Nesse sentido, Legras e Karst (2003) apresentaram uma otimização da análise rápida baseada em PCR simples com o par de primers Delta-12 (δ_{12}) e Delta-21 (δ_{21}), desenhados a partir da análise do genoma de *S. cerevisiae*. A especificidade desta metodologia foi verificada pela comparação de padrões de eletroforese, analisando um total de 53 cepas comerciais e de coleções, com um refinamento na discriminação baseada nessa região altamente variável (LEGRAS; KARST, 2003).

Os estudos de Schuller et al. (2004) corroboram a tipificação genética pela região interdelta como um processo eficiente em comparação com diferentes métodos moleculares para a identificação de diferentes linhagens de leveduras provenientes do processo de produção de vinho. Nesse mesmo sentido, outros autores também trouxeram contribuições para o monitoramento das populações de leveduras durante a fermentação de vinhos baseado na análise molecular de polimorfismos na região interdelta de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Xufre et al. (2011), utilizando amplificação por PCR das regiões delta (δ), avaliou um conjunto de três pares de primers (δ_1 - δ_2 ; δ_{12} - δ_2 ; δ_{12} - δ_{21}) para cada cepa avaliada; a análise dos padrões de polimorfismo mostrou que o conjunto de primers δ_{12} e δ_2 apresentaram a maior resolução e poder discriminatório. Este estudo também mostrou que a amplificação por PCR de sequências delta (δ) de DNA de cepas de *S. cerevisiae* é um método reproduzível, simples e de baixo custo que pode ser usado com sucesso para monitorar a dinâmica populacional de leveduras durante as fermentações.

A utilização de um protocolo de custo reduzido de PCR rápida, baseado na amplificação de regiões interdelta é proposta neste trabalho para a discriminação entre linhagens de leveduras previamente identificadas como *S. cerevisiae*. Com base nestes dados e sabendo que em processos de fermentação espontânea de cachaça ocorre uma sucessão de linhagens de leveduras, este trabalho teve como objetivo isolar, identificar, selecionar e caracterizar fisiotecnologicamente leveduras provenientes de processos tradicionais de fermentação espontânea de cachaça, visando a aplicação em processos de produção de cervejas especiais.

1.2 Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), nas dependências do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas.

1.2.1 Coletas das amostras

As coletas de amostras foram realizadas em processos fermentativos de caldo de cana para a produção de cachaça nos meses de agosto a novembro de 2018. As coletas ocorreram mensalmente em três instalações, denominadas de A1, A2 e A3, de pequenos produtores de cachaça que empregam o sistema tradicional de “fermento caipira”, ou seja, não utilizam levedura selecionada, mas trabalham a partir de processos de fermentação espontânea. A região do Circuito das Águas Paulista foi escolhida para as amostragens.

As amostras foram coletadas diretamente nos tanques de fermentação e transferidas para tubos Falcon (50 mL) estéreis e prontamente refrigeradas a 4°C. As análises microbiológicas de isolamento foram realizadas em até 48 horas após as coletas.

1.2.2 Isolamento e seleção das amostras

Cada amostra foi submetida a diluições seriadas em solução salina estéril (NaCl 0,15 M). Após as diluições apropriadas, 100 µL do material foram espalhados em placas contendo meio de cultura diferencial WLN (Becton Dickinson & Co., Neogen, EUA adicionado de cloranfenicol (100 mg/L) para inibição do crescimento de bactérias. As amostras foram cultivadas em duplicata e incubadas a 30°C por até 5 dias para permitir o crescimento e definição dos morfotipo das colônias.

De cada amostra foram escolhidas 10 colônias representativas, totalizando 120 colônias isoladas para análises posteriores (Tabela 1). As colônias foram isoladas, cultivadas individualmente e ressuspendidas em solução de leite (Skim Milk 100g/L, Neogen, EUA) e conservadas a -20°C.

Tabela 1. Denominação dos isolados obtidos a partir de meio seletivo diferencial WLN

Mês de Coleta	Alambique*	Colônias isoladas
Agosto	A1	L31- L32- L33- L34- L35- L36- L37- L38- L39- L40
	A2	L41- L42- L43- L44- L45- L46- L47- L48- L49- L50
	A3	L51- L52- L53- L54- L55- L56- L57- L58- L59- L60
Setembro	A1	L121-L122-L123-L124-L125-L126-L127-L128-L129-L130
	A2	L131-L132-L133-L134-L135-L136-L137-L138-L139-L140
	A3	L141-L142-L143-L144-L145-L146-L147-L148-L149-L150
Outubro	A1	L258-L259-L260-L261-L262-L263-L264-L265-L266-L267
	A2	L248-L249-L250-L251-L252-L253-L254-L255-L256-L257
	A3	L238-L239-L240-L241-L242-L243-L244-L245-L246-L247
Novembro	A1	L308-L309-L310-L311-L312-L313-L314-L315-L316-L317
	A2	L317-L318-L319-L320-L321-L322-L323-L324-L325-L326
	A3	L298-L299-L300-L301-L302-L303-L304-L305-L306-L307

* Unidade produtora de cachaça

A diferenciação de morfotipos em meio diferencial considerou o padrão crescimento em meio diferencial WLN, considerando coloração, brilho, forma da borda e estrutura geral. A partir dos morfotipos discriminados nesta etapa, foram selecionados quatro isolados representantes de cada amostra provenientes de cada produtor (A1, A2 e A3) e em cada mês de coleta, totalizando 48 isolados.

1.2.3 Análise molecular dos isolados

Das etapas de isolamento e seleção foram obtidos 48 isolados, os quais, foram purificados e submetidos a testes com protocolos de extração de DNA para as análises de identificação e tipificação das linhagens.

Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico foi coletada uma alçada de cada amostra previamente purificada para realizar a ressuspensão das células e realizar os testes com três protocolos rápidos para extração de DNA genômico:

Protocolo (A): Células frescas foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise celular (Tris 500 mM, pH 8,0; β-mercaptoetanol 100 mM). Após agitação vigorosa em vórtex, a amostra foi submetida a banho de água fervente durante 15 min. Após arrefecer à

temperatura ambiente, a amostra foi novamente agitada e centrifugada (12.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante recolhido em um tubo limpo;

Protocolo (B): Células frescas foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH. 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8,0) e a amostra submetida a aquecimento em micro-ondas em potência máxima durante 5 min. Após arrefecer à temperatura ambiente, a amostra foi agitada vigorosamente em vórtex e centrifugada (12.000 rpm, 5 min). Utilizou-se o sobrenadante para as análises.

Protocolo (C): Células frescas foram ressuspensas foram submetidas a extração de material genético genômico total utilizando o Quick-Start Protocol do conjunto comercial DNeasy – PowerSoil (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

As análises foram realizadas utilizando o aparelho Nanodrop®.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) a 90 V, durante 120 min.

Identificação dos isolados de *S. cerevisiae*

Após a obtenção das amostras de DNA genômico, estas foram utilizadas para a triagem de identificação específica, ou seja, identificar e diferenciar os isolados pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* dos demais isolados que não pertencem a essa espécie (não- *Saccharomyces*). Para isso, foram avaliadas três metodologias de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando diferentes primers:

Protocolo 1 - Utilizou-se o par de primers SC1d (5'-ACATATGAAGTATGTTTCTATATAACGGGTG-3') e SC1r (5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA-3'), que gera um amplicon de 301 pb, avaliando-se as condições previamente descritas por Martorell et al. (2005).

Protocolo 2 - Utilizou-se o par de primers SCER-R (5'-ACATATGAAGTATGTTTCTATATAACGGGTG-3') e CESP-F (5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA-3'), que gera um amplicon de 175 pb, avaliando-se as condições previamente descritas por Hierro et al. (2007).

Protocolo 3 - Utilizou-se o par de primers SCER-F2 (5'- GCGCTT TACATTCAGATCCCGAG -3') e SCER-R2 (5'-TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG -3'), que gera um amplicon de 150 pb, avaliando-se as condições previamente descritas por Muir et al. (2011).

As metodologias foram avaliadas com quatro cepas conhecidamente distintas da espécie *S. cerevisiae* (cepas comerciais *S. cerevisiae*) e seis cepas não-*Saccharomyces* (*Candida* sp.; *Torulaspota delbrueckii*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Hanseniaspora vineae*; *Meyerozyma guilliermondii*; *Pichia fermentans*).

O produto das extrações foi quantificado e analisado em gel de agarose a 1% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) por eletroforese (90 V, 45 min). Os géis foram fotografados em equipamento com luz ultravioleta.

Tipificação de linhagens *S. cerevisiae*

As amostras de DNA genômico foram utilizadas para a tipificação de linhagens; ou seja, tipificar os isolados à nível de espécie para que seja possível diferenciar as cepas dominantes e/ou predominantes nos processos. Os primers $\delta 1$ e $\delta 2$ (NESS et al., 1993) e os primers $\delta 12$ e $\delta 21$ (LEGRAS; KARST, 2003) foram avaliados em diferentes combinações ($\delta 1/ \delta 2$; $\delta 12 / \delta 21$; $\delta 12/ \delta 2$), assim como também foram avaliadas variações na composição da mistura de PCR para melhor poder de discriminação (LEGRAS; KARST, 2003; SCHULLER et al., 2004; XUFRE et al., 2011).

Todas as reações foram realizadas em termociclador Labcycler com controle de gradiente (Sensoquest, Alemanha). As reações em cadeia de polimerase foram processadas empregando o kit Taq DNA Polymerase, com tampão 10x e solução $MgCl_2$, assim como conjunto de dNTP e utilizadas de acordo com as instruções do fabricante (Sinapse, Brasil). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (2%) utilizando corante gelRed (Uniscience). Os géis foram fotografados em equipamento com luz ultravioleta.

1.2.4 Caracterização fisiológica dos isolados

Os isolados foram caracterizados por diversas metodologias: assimilação de diferentes açúcares, capacidade fermentativa, capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio e tolerância ao etanol.

Produção de sulfeto de hidrogênio

A avaliação do potencial de produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) foi determinado através da metodologia de aplicação de microgotas, ou seja, uma alíquota (10 μL) da suspensão celular de cada linhagem foi inoculada, em triplicata, em placas contendo meio 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). As placas foram incubadas a 30°C

por sete dias. Após esse período, os resultados do potencial de produção de H₂S foram estimados visualmente, de acordo com a coloração das colônias, e, expressos como negativo (-), ou positivo, na seguinte classificação: fraca (+), média (++) ou alta (+++).

Assimilação de açúcares

A análise de assimilação dos açúcares foi realizada em triplicata em placas microtiter transparente (96 poços) com fundo chato, contendo meio YNB (Yeast Nitrogen Base without amino acids and ammonium sulfate, a 13,4 g/L) acrescido dos açúcares glicose, frutose, sacarose ou maltose (20 g/L).

Os inóculos foram preparados a partir de uma suspensão de células frescas, previamente crescidas em meio YPD a 30°C por 24h, coletadas por centrifugação e ressuspendidas em solução salina estéril e padronizadas em suspensão equivalente a 1 D.O. (A=620 nm), correspondendo a 3×10^7 células/mL (DOBROWOLSKI, 1993).

Em cada poço foram inoculados 50 µL da diluição 10^{-1} da suspensão celular obtida, 25 µL de meio YNB (4x) e 25 µL da solução do respectivo açúcar (4x). Para o controle branco foi utilizado 50 µL de solução salina, no lugar da suspensão celular. Foi utilizado o esquema apresentado na Figura 1. Após a inoculação, a placa foi selada com filme adesivo transparente e incubada em leitor multifuncional de microplacas modelo Sunrise (Tecan, RChisto) durante 24 horas. O crescimento foi avaliado automaticamente por leitura de densidade ótica (D.O.) a 620 nm em intervalos de 1 hora, precedidas de agitações lineares por 30 segundos a uma temperatura controlada de 28°C.

Em todos os casos, foi determinada a velocidade específica máxima de crescimento [$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)] (HISS et al., 2001) e o crescimento máximo (DO_{máx}).

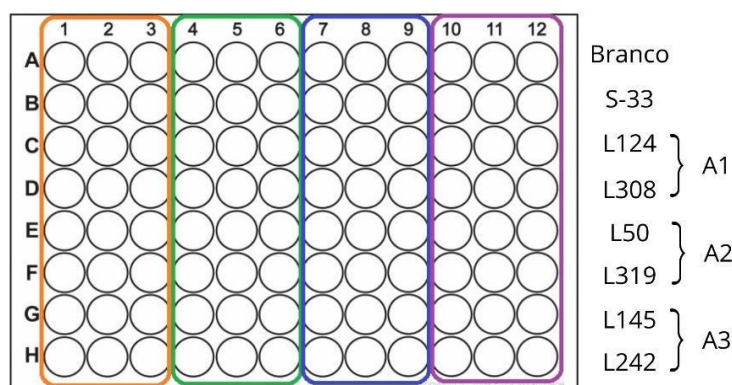


Figura 1. Esquema utilizado para o ensaio de cultivo das amostras em microplaca contendo o meio YNB + Glicose (laranja), Sacarose (verde), Maltose (azul) e Frutose (roxo). Letra (A) = Branco. (A1) Alambique 1; (A2) Alambique 2; (A3) Alambique 3.

Tolerância ao etanol

Os isolados foram avaliados em relação a sua sensibilidade ao etanol em meio sólido YPD acrescido de etanol. Cada isolado foi previamente reativado em meio YPD líquido, centrifugado e a biomassa ressuspensa em solução salina para 1 DO_{620nm}. Foram feitas diluições seriadas 1:10 da suspensão celular e inoculados 7 µL das diluições 10⁻² a 10⁻⁵ de cada isolado em placas contendo meio YPD com etanol nas seguintes concentrações: 8, 10 ou 12 % (v/v). As placas foram incubadas a 30°C por sete dias (SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012).

Produção de espuma

Para a determinação da produção de espuma durante a fermentação, células reativadas dos isolados foram inoculadas na razão de 3×10⁶ cél./mL em tubos (16×150 mm altura) contendo 10 mL de mosto cervejeiro estilo Munich Helles à 11°P. Os tubos foram incubados a 20°C. A altura da espuma foi medida ao longo da fermentação, permitindo verificar a altura máxima alcançada no sistema (REGODÒN et al, 1997).

Capacidade de floculação

O potencial de floculação dos isolados foi avaliado quantitativamente mediante o teste de Helm's, com as adaptações sugeridas por D'Hautcourt; Smart (1999). As linhagens foram propagadas em frascos contendo 50 mL de meio YPD e incubadas sob agitação (125 rpm, 25°C, 72 h). Após a centrifugação, as células foram coletadas e lavadas com água destilada estéril e diluídas em água destilada para se obter uma concentração final de aproximadamente 1×10⁸ células/mL. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, sendo 10 microtubos para cada linhagem: 3 controles e 7 tratamentos.

Para o tratamento experimental, as amostras foram lavadas com solução de sulfato de cálcio (0,51 g/L), centrifugadas e ressuspensas em 'solução de suspensão' [0,51 g/L sulfato de cálcio; 6,8 g/L acetato de sódio; 4,05 g/L ácido acético; 4% (v/v) etanol; pH 4,5]. Cada amostra foi agitada vigorosamente em vórtex, invertida cinco vezes e mantida em repouso a 24°C durante 15-30 min. Após esse período, alíquotas de 100 µL foram diluídas em 900 µL de água deionizada para leitura de absorbância (600nm).

Para o tratamento controle, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em solução de EDTA dissódico 0,5 M (pH 7,0), agitadas, invertidas e deixadas em repouso nas mesmas condições e ao mesmo tempo que o tratamento experimental. A floculação é expressa

em porcentagem, a partir da média de absorvância dos tratamentos controle e experimental para cada cepa ($[(\text{controle} - \text{experimental}) / \text{controle}] \times 100$).

1.2.5 Ensaio de mini-fermentação em mosto cervejeiro

Os ensaios de fermentação foram conduzidos inicialmente em escala de bancada, utilizando as linhagens selecionadas previamente reativadas em meio YPD sólido (28°C, 48h). O experimento foi realizado em tubos Falcon (50 mL) estéreis contendo 30 mL de mosto cervejeiro; as células de levedura foram inoculadas a razão de 1×10^6 cél/mL.

Para a suspensão celular, cada linhagem foi previamente reativada em meio YPD líquido (30°C, por 48 h, sem agitação). Após o período de incubação, foram transferidas para meio fresco e cultivadas sob agitação (170 rpm, 30°C) durante 48 horas. Estimou-se a concentração de células viáveis da suspensão para cada linhagem por contagem ao microscópio e determinou-se o volume de suspensão 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 4.000 rpm, 10 minutos, refrigeradas à 7°C em centrífuga, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500 µL do próprio mosto e inoculadas.

As fermentações foram conduzidas durante 62 horas, a 20°C. Após esse período, foram retiradas alíquotas do produto fermentado homogeneizado para determinação da taxa de viabilidade celular por coloração diferencial com eritrosina. As células foram posteriormente coletadas mediante centrifugação e utilizadas para determinação da biomassa formada no sistema.

A cinética das fermentações foi monitorada por até 62 h e estimadas em função da perda de massa no sistema em função da liberação de dióxido de carbono (CO₂), através de pesagens em intervalos regulares de tempo até que a perda de peso se tornasse constante.

O produto fermentado obtido por cada linhagem foi analisado quanto a: atenuação aparente do mosto, teor alcoólico, acidez titulável e pH.

- a) Atenuação aparente:** Calculada em função da densidade inicial (extrato original) do mosto e da densidade final aparente (extrato aparente), em graus Plato (°P), segundo BRIGGS et al. (2004).

$$\text{Fermentabilidade ou atenuação aparente} = \frac{D_i - D_f}{D_i}$$

Sendo: D_i = densidade inicial do mosto; D_f = densidade final do produto fermentado.

- b) Teor alcoólico:** As amostras dos produtos fermentados foram previamente destiladas em microdestilador (TECNAL, modelo TE012), de acordo com metodologia oficial EBC (EBC, 2019) e o grau alcoólico determinado em densímetro digital (Anton Paar 4500).
- c) Acidez total titulável:** determinada por titulometria de neutralização. O cálculo foi realizado com base na quantidade de solução de NaOH (0,1 N) gasto em relação ao volume da amostra, até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4), utilizando pHmetro (ZAGO et al., 1996), expressa em g de ácido acético/L, segundo a equação:

$$\text{Acidez total (g de ácido acético / L)} = \frac{n * f * N * 60}{V}$$

Onde:

n = volume de NaOH (0,1N) gasto na titulação (mL);

f = fator de correção da solução de NaOH;

N = normalidade da solução de NaOH;

60 = equivalente do ácido acético (CH₃COOH) e V = volume da amostra (mL).

- d) pH:** O pH das amostras foi determinado em peagâmetro digital (DMPH-1 Digimed, Tecnal), por imersão direta do eletrodo na amostra previamente descarbonatada por agitação contínua.

1.2.6 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos nas caracterizações fisiotecnológicas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R (R - versão 3.4.3).

1.3 Resultados e Discussão

Com o intuito de obter diferentes linhagens de leveduras foram visitados três pequenos produtores de cachaça, nos quais, mensalmente, durante quatro meses, foram coletadas amostras do fermentado de caldo de cana-de-açúcar. A indicação dos locais de coleta está representada na Figura 2. A escolha da localidade foi feita devido à grande concentração de unidades produtoras de cachaça na região do Circuito das Águas Paulista e em função da disponibilidade de contato com esses pequenos produtores que, na sua grande maioria,

utilizam o método de “fermento caipira” (fermentação espontânea) em seus processos e que propiciava as condições ideais para este estudo.



Figura 2. Distribuição geográfica dos locais das coletas de amostras.

1.3.1 Isolamento e seleção das amostras

Em cada um dos três produtores artesanais foram coletadas amostras nos meses de agosto a novembro de 2018 (Tabela 1). Após diluição e plaqueamento das amostras em meio de cultura diferencial WLN, foram escolhidas 10 colônias de cada alambique de forma aleatória e representativa, totalizando 120 isolados.

O cultivo das amostras em meio seletivo diferencial WLN permitiu uma separação e isolamento de colônias com base em seu padrão de crescimento e aspectos morfológicos como cor, formato, tipo de borda, aparência etc. Na Figura 3 está apresentada uma foto de uma das placas obtidas, como exemplo, mostrando como foi possível diferenciar dois morfotipos claramente distintos e, a partir dos quais foram selecionados representantes para a etapa de identificação molecular.

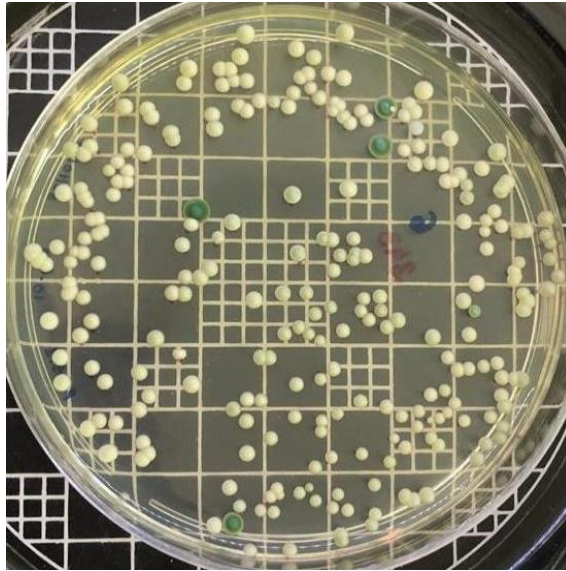


Figura 3. Perfil morfológico de colônias de leveduras obtidas após cultivo das amostras em meio diferencial WLN.

Analisando o perfil morfológico das colônias foi possível a distinção de dois morfotipos (M):

- M1: colônias de aspecto liso, brilhantes, bordas regulares e coloração creme;
- M2: minoritário, coloração verde, brilhante, com halo esbranquiçado e bordas irregulares.

Segundo a porcentagem de representatividade dos diferentes perfis morfológicos nas amostras, foram selecionados 16 isolados de cada produtor, totalizando 48 isolados (Tabela 2). Segundo Campbell (1996), a análise da variação de morfologia e cor de colônias de leveduras crescidas em meio WLN é um teste simples e suficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre isolados de levedura, no entanto não fornece informações sobre sua identidade. Colônias com morfologias diferentes podem pertencer à mesma espécie de levedura e colônias semelhantes podem pertencer a espécies diferentes (SILVA-FILHO, 2005).

Tabela 2. Características morfológicas obtidas dos isolados quando cultivados em meio WLN

Destilaria	morfotipos	n° de isolados	morfologia
A1	M1	15	Liso/bordas regulares/coloração creme
	M2	1	Brilhantes/halo esbranquiçado/bordas irregulares/cor verde
A2	M1	14	Liso/bordas regulares/coloração creme
	M2	2	Brilhantes/halo esbranquiçado/bordas irregulares/cor verde
A3	M1	15	Liso/bordas regulares/coloração creme
	M2	1	Brilhantes/halo esbranquiçado/bordas irregulares/cor verde
Total		48	-

1.3.2 Análise molecular dos isolados

Os 48 isolados representativos de cada morfotipo citados na Tabela 2 foram purificados por estriamento em meio sólido YPD para utilização de células frescas para extração de DNA genômico com a finalidade de identificar cada isolado

Avaliação de método de extração de DNA genômico

O método ideal de extração do DNA, segundo Wang et al. (2003), deve englobar os seguintes critérios: ser sensível, consistente, rápido, fácil de usar, ser um método com zero ou mínimo risco de contaminação cruzada das amostras e, permita a obtenção de amostras puras de DNA.

Nos três diferentes protocolos de extração de DNA analisados foi verificada a pureza e a concentração do DNA. As análises dos produtos de amplificação submetidos a eletroforese permitiram a otimização e a definição do método de extração mais adequado. O Protocolo B não apresentou um resultado de amplificação satisfatório. Já os protocolos A e C apresentaram-se como uma metodologia rápida e com resultados muito satisfatórios para a extração de DNA genômico, no entanto, o Protocolo (C) se trata de um kit de comercial de extração de DNA (DNeasy – PowerSoil (Qiagen)), exigindo assim, um custo de aquisição superior. Diante disso, por se tratar de uma metodologia eficiente e mais econômica o Protocolo (A) se mostrou mais vantajoso. Definiu-se, portanto, utilizar o protocolo (A), técnica que permitiu o processamento de diversos isolados e a obtenção do DNA em concentrações suficientes (100-200 ng/μL) para a aplicação em reações em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação dos isolados *S. cerevisiae*

As amostras de DNA genômico obtidas foram utilizadas primeiramente para a identificação específica de cada isolado, definida como: positivo (detecção de banda de amplificação) para a espécie *S. cerevisiae*, ou negativo (ausência de banda de amplificação), indicando tratar-se de levedura não-*Saccharomyces*. O Protocolo 1 (item 1.2.3) forneceu os resultados com maior poder de discriminação e visualização nítida das bandas na identificação das linhagens de leveduras *S. cerevisiae*. (Figura 4). A reação de PCR, utilizando os primers SC1d e SC1r apresentaram uma banda esperada de amplificação de 301 pares de bases para identificação positiva de leveduras da espécie *S. cerevisiae*.

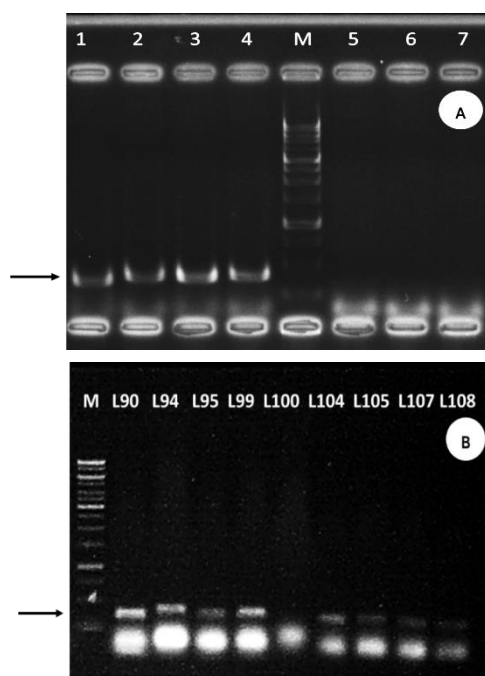


Figura 4. Fotografia do gel de agarose apresentando produtos de amplificação obtidos após PCR com primers específicos para a identificação de isolados *S. cerevisiae*. (M) marcador de DNA de 1kb. (A) 1-4: cepas comerciais *S. cerevisiae*; 5- *Candida* sp. 6 - *Torulaspora delbrueckii*; 7 - *Metschnikowia pulcherrima*. (B) Exemplo de resultado de eletroforese em gel de agarose com leveduras isoladas na região de estudo. A seta indica um fragmento 301 pb específico para *S. cerevisiae*.

Essa metodologia foi avaliada contra quatro cepas distintas da espécie *S. cerevisiae* e seis cepas não-*Saccharomyces* (Figura 4A). A Figura 4B ilustra alguns dos resultados obtidos para os isolados deste estudo após a otimização da metodologia, no qual, os isolados que apresentaram resultado positivo (detecção de banda de amplificação em gel de agarose) foram classificados como *S. cerevisiae*.

De um total de 48 leveduras submetidas à identificação, não se detectaram bandas de amplificação em cinco isolados (4% da amostragem). Os isolados que não apresentaram detecção de banda foram considerados como leveduras não-*Saccharomyces*, de outras espécies.

Tipificação e diferenciação de linhagens *S. cerevisiae*

No caso dos isolados identificados como *S. cerevisiae*, utilizou-se o mesmo material genético previamente extraído e congelado para a realização da tipificação e diferenciação de linhagens por análise de polimorfismo a partir de reação em cadeia da polimerase da região delta (δ). Os primers $\delta 1$ e $\delta 2$ (NESS et al., 1993) e os primers codificadores de região interdelta (LEGRAS; KARST, 2003) foram testados em diferentes combinações ($\delta 1$ -- $\delta 2$; $\delta 12$ -- $\delta 21$; $\delta 12$ -- $\delta 2$) (XUFRE et al., 2011), assim como também foram avaliadas variações na composição da mistura de PCR para melhor poder de discriminação.

Os elementos delta são sequências de DNA repetitivo frequentemente associadas a transposons de leveduras, cujos número e localização apresentam certa variabilidade intraespecífica e constituem bons marcadores genéticos na detecção de polimorfismo. A metodologia foi recentemente avaliada e revelou maior capacidade discriminatória que métodos tradicionalmente utilizados para esse propósito (cariotipagem e análise de DNA mitocondrial) e que são complexos, laboriosos e dispendiosos (XUFRE et al., 2011).

Após a avaliação de três combinações com os primers previamente descritos, obtivemos resultados com maior poder de discriminação utilizando os primers $\delta -12$ e $\delta -21$, conforme protocolo descrito por Xufre et al. (2011). Os resultados de eletroforese em gel de agarose obtidos para os isolados selecionados estão apresentados na Figura 5.

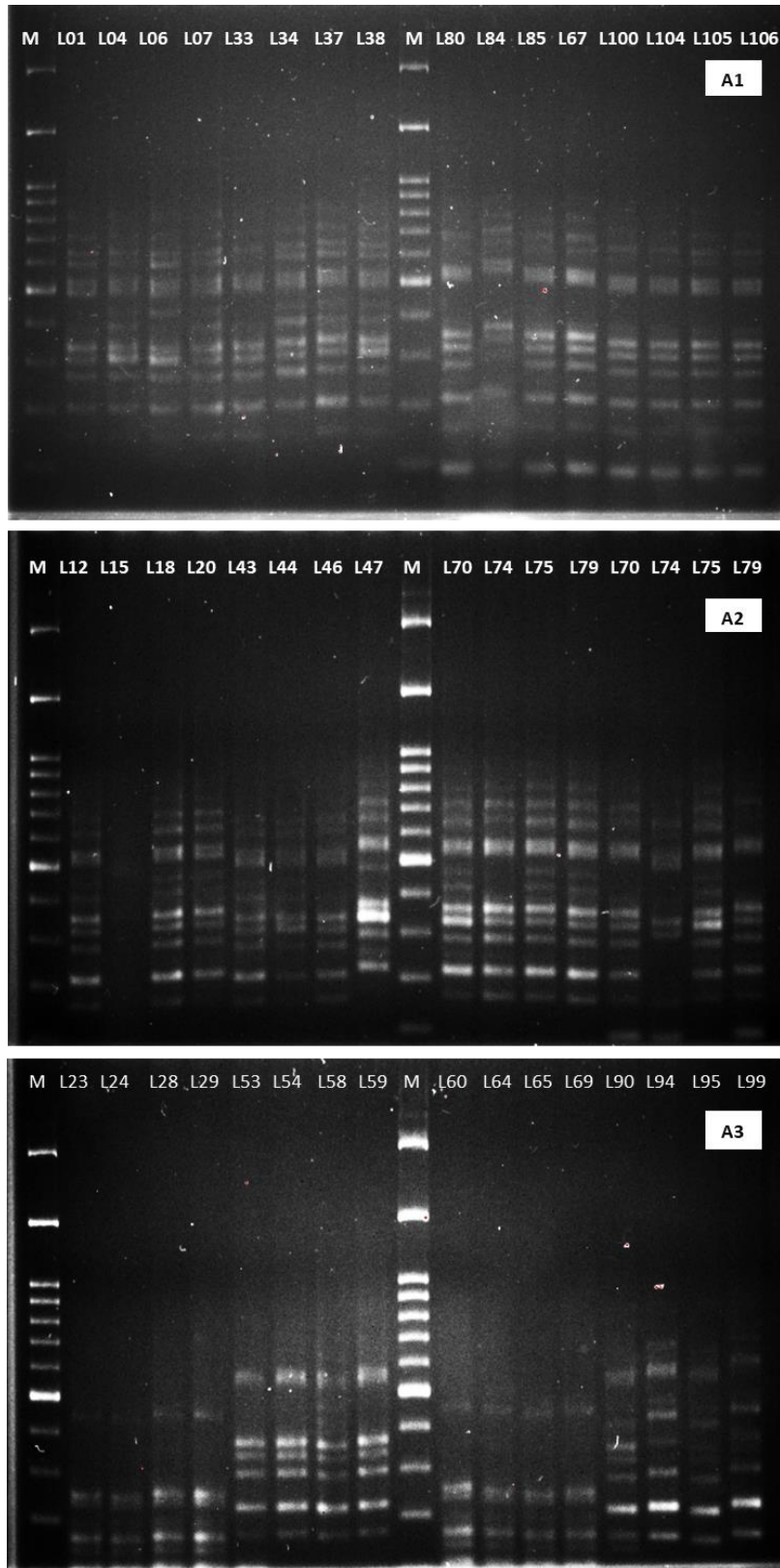


Figura 5. Fotografia de gel de agarose apresentando produtos de amplificação obtidos após PCR com primers específicos para a tipificação de isolados *S. cerevisiae*, respectivamente, em cada unidade produtora. (A1) Destilaria 1, (A2) Destilaria 2 e (A3) Destilaria 3. (M) marcador de DNA de 100b.

Através dos resultados da tipificação molecular dos isolados obtidos em cada uma das unidades produtoras, foi possível diferenciar as cepas dominantes e/ou predominantes nos processos, assim como avaliar sua permanência ao longo dos meses de monitoramento. Sendo assim, a representatividade relativa das cepas foi:

- A1: Um único perfil de cepa predominou nos processos fermentativos dos isolados provenientes do produtor A1, conforme observamos na Figura 5-A1
- A2: O mesmo pode ser observado na unidade vizinha, A2, onde outro perfil de linhagem foi dominante durante todo o período;
- A3: No caso da unidade A3, observou-se a predominância de uma cepa nos meses de agosto e outubro, em alternância com outra linhagem (coincidente com os perfis semelhantes aos apresentados pelas linhagens dos produtores A1 e A2) que dominou o processo em setembro e novembro.

As cepas dominantes nessas três unidades produtoras (A1, A2, A3) apresentaram perfis de linhagens coincidentes, indicando que, provavelmente, a mesma levedura parece atuar de forma característica e persistente na região estudada.

1.3.3. Caracterização fisiológica dos isolados

A partir da análise e discriminação dos padrões genéticos de polimorfismo entre os isolados discriminados nas amostragens, foram identificados e selecionados seis (06) representantes distintos – doravante denominados cepas ou linhagens: L124, L308, L50, L319, L145 e L242. Estas linhagens foram então consideradas para as análises fisiotecnológicas posteriores.

1.3.3.1. Produção de sulfeto de hidrogênio

Os isolados foram caracterizados quanto à capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio. Os padrões considerados para essa análise estão exemplificados na Figura 6.

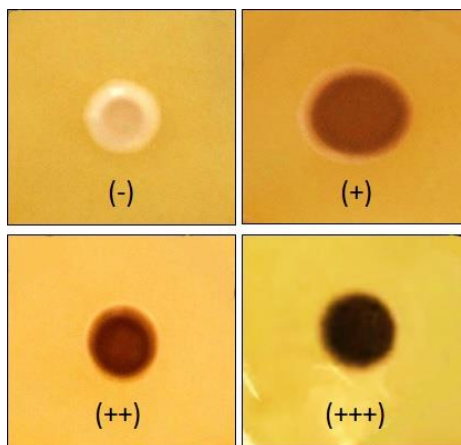


Figura 6. Padrão de crescimento de colônias de levedura em meio diferencial LA e valores atribuídos conforme coloração e intensidade.

No processo de produção de cerveja, são esperados níveis baixos ou quase nulos de sulfeto de hidrogênio durante a fermentação, pois esse composto é considerado alterante e com impacto direto sobre o sabor e aroma da bebida (SAERENS et al., 2010; ARAÚJO, 2013). A Tabela 3 representa os resultados atribuídos a cada linhagem em função do padrão de coloração das colônias após crescimento em meio diferencial LA.

Tabela 3. Formação de sulfeto de hidrogênio segundo intensidade de coloração em meio de cultura diferencial

Linhagem	Coloração	Linhagem	Coloração
L50	-	S-33	++
L124	+	US-05	++
L145	++	W34/70	++
L242	+++	CA-11	-
L308	++		
L319	++		

Tendência à produção de H₂S em meio sintético diferencial LA:
negativo (-); fraca (+); média (++) e alta (+++)

A produção de sulfeto de hidrogênio em quantidades elevadas pode estar diretamente relacionada ao aumento da degradação da cerveja durante o armazenamento, por conta disso, a produção de baixos níveis de H₂S apresenta-se como um critério de seleção fundamental na escolha de leveduras de interesse para a produção de cervejas (ARAÚJO, 2013). Assim como as cepas avaliadas nesse estudo, as cepas cervejeiras comerciais apresentaram tendência à produção de baixos níveis de sulfeto de hidrogênio, corroborando com os resultados apresentados pelas linhagens estudadas, no qual apenas a linhagem L242 apresentou uma

tendência de maior produção de sulfeto de hidrogênio, sendo esta cepa originária da unidade produtora A3, o mesmo não ocorreu com a cepa L145, que apesar de também ser originária da unidade A3, apresentou uma resposta a produção de sulfeto de hidrogênio menor.

1.3.3.2. Assimilação de açúcares

O mosto de malte de cevada é composto por maltose (45-65% dos açúcares totais), maltotriose (15-20%), e em menores concentrações estão presentes também glicose (10-15%), frutose e sacarose (5%, cada) e as dextrinas (25% dos carboidratos totais). (OSTERGAARD et al., 2000; SAERENS et al., 2010; BUDRONI, et al., 2018).

Os isolados e a linhagem referência foram avaliados quanto às possíveis alterações de crescimento em meio YNB contendo, individualmente, diferentes fontes de açúcar, cujos resultados apresentam-se na Figura 7.

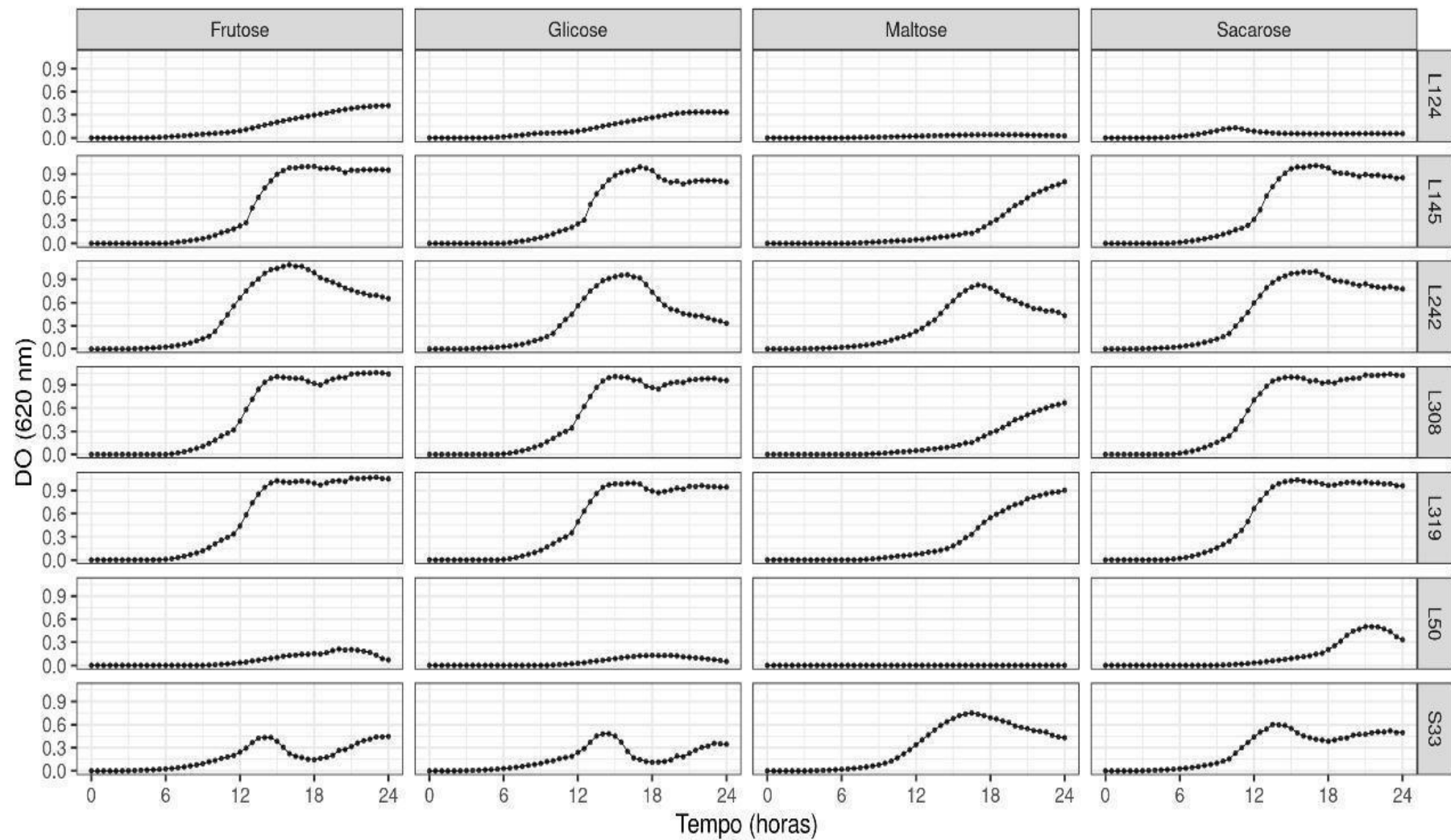


Figura 7. Curvas de crescimento em microcultivo (28°C, 24h) em meio YNB com fontes de carbono isoladas.

A relação da produção de biomassa em função do tempo é estimada através da velocidade máxima específica de crescimento. A análise quantitativa do crescimento dos isolados em microplaca indica que as velocidades de crescimento foram diferentes, dependendo do meio utilizado. Vale ressaltar que diferentes cepas de levedura podem modular seu perfil entre alto rendimento celular e baixa taxa de crescimento, e vice-versa, dependendo das condições impostas (LIPSON, 2015).

Os resultados mostram que a linhagem L50 e L124, não apresentaram crescimento significativo, independentemente da fonte de açúcar utilizada. As demais cepas (L145, L242, L308, L319 e S33) cresceram em todas as fontes de açúcares e apresentaram um perfil de crescimento menor e mais lento quando em maltose, sendo que a L242 mostrou o mesmo padrão de crescimento em maltose que a levedura Referência (S-33) o que demonstra um interessante potencial de exploração dessa linhagem na produção de cervejas especiais. As linhagens L145, L308 e L319 tiveram comportamento semelhante de crescimento na maltose, sendo observado que o período de 24 h foi insuficiente para verificar o final da fase exponencial.

A capacidade de assimilação por parte das cepas está diretamente correlacionada com os açúcares disponíveis no mosto, sendo assim, 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 (ALMEIDA, 2021; LODOLO et al., 2008; MENESES et al., 2002). Sendo assim, a ineficiência da levedura em assimilar algum açúcar específico não é fator isolado e/ou excludente para o estudo de leveduras (GIBSON et al., 2017; MICHEL et al., 2016).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de velocidade máxima de crescimento (μ_{max} (h^{-1})) e máxima absorvância ($DO_{m\acute{a}x}$) registradas durante a avaliação do crescimento nas respectivas fontes de açúcar.

Tabela 4. Valores de densidade óptica máxima (DO_{máx}) e velocidade específica máxima de crescimento (μ _{máx}(h⁻¹)) das diferentes linhagens em meio contendo glicose, frutose, sacarose ou maltose

Linhagem	Glicose		Frutose		Sacarose		Maltose	
	DO MÁX.*	μ MÁX.	DO MÁX.	μ MÁX.	DO MÁX.	μ MÁX.	DO MÁX.	μ MÁX.
S-33	0,49 ^{bc} ± 0,05 (15h)	0,24 ^a ± 0,00	0,45 ^c ± 0,28 (15h)	0,25 ^a ± 0,01	0,61 ^b ± 0,08 (14h)	0,23 ^a ± 0,00	0,76 ^a ± 0,00 (17h)	0,25 ^a ± 0,02
L124	0,36 ^b ± 0,04 (23h)	0,31 ^a ± 0,02	0,44 ^a ± 0,03 (24h)	0,34 ^a ± 0,05	0,13 ^c ± 0,02 (11h)	0,30 ^{ab} ± 0,02	0,04 ^d ± 0,00 (19h)	0,19 ^b ± 0,06
L308	1,05 ^a ± 0,01 (16h)	0,30 ^a ± 0,01	1,06 ^a ± 0,01 (23h)	0,28 ^a ± 0,01	1,04 ^a ± 0,01 (24h)	0,29 ^a ± 0,00	0,71 ^b ± 0,05 (24h)	0,17 ^b ± 0,03
L50	0,13 ^b ± 0,00 (20h)	0,28 ^a ± 0,01	0,24 ^{ab} ± 0,20 (21h)	0,26 ^{ab} ± 0,02	0,51 ^a ± 0,07 (21h)	0,23 ^b ± 0,02	0,00 ^b ± 0,00 (0h)	0,00 ^c ± 0,00
L319	0,95 ^b ± 0,01 (16h)	0,29 ^a ± 0,02	1,07 ^a ± 0,03 (23h)	0,31 ^a ± 0,00	1,02 ^a ± 0,02 (15h)	0,29 ^a ± 0,01	0,90 ^c ± 0,03 (24h)	0,31 ^a ± 0,05
L145	0,99 ^a ± 0,02 (17h)	0,25 ^a ± 0,03	1,00 ^a ± 0,01 (18h)	0,29 ^a ± 0,04	1,01 ^a ± 0,02 (17h)	0,25 ^a ± 0,02	0,80 ^b ± 0,06 (24h)	0,20 ^a ± 0,06
L242	0,96 ^b ± 0,03 (16h)	0,26 ^{ab} ± 0,03	1,09 ^a ± 0,01 (16h)	0,29 ^a ± 0,01	1,00 ^b ± 0,02 (17h)	0,24 ^a ± 0,01	0,83 ^c ± 0,00 (17h)	0,22 ^{ab} ± 0,02

Condições do ensaio: taxa de inoculação foi ajustada para 1 DO_{620nm}. Meio YNB + açúcar 20g/L. Temperatura de 28°C durante 24 h

* Valores são média de triplicata ± desvio padrão e (tempo em que foi atingida a DO_{MÁX})

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.

De acordo com análise estatística univariada foi aplicado o teste de média para comparar o desempenho de uma mesma cepa, quanto aos parâmetros, velocidade máxima de crescimento (μ_{\max} (h^{-1})) e absorvância máxima (densidade óptica, DO_{\max}) nas diferentes fontes de açúcares.

As linhagens S-33, L319 e L145 não apresentaram diferença significativa nas respectivas velocidades específicas máximas de crescimento entre os açúcares avaliados. Foi possível observar que as linhagens L308 e L145 não apresentaram, respectivamente, diferença significativa de crescimento (DO_{\max}) entre os açúcares glicose, frutose e sacarose.

De acordo com Meneses et al. (2002) o grau e a cinética de utilização da glicose, frutose e sacarose apresentam influência determinante na utilização da maltose e esse fator pode refletir consideravelmente no desempenho geral das fermentações. As linhagens L124 e L50, não apresentaram formação de biomassa (DO_{\max}) em meio contendo maltose como única fonte açúcar, esse fator pode estar ligado a ausência de expressão da enzima maltase e/ou deficiência de proteínas transportadoras (ALMEIDA, 2021). O baixo desenvolvimento em sacarose encontrado para as cepas S33, L124, L50 pode estar relacionado à ausência ou baixa produção da enzima invertase, responsável pela hidrólise desse dissacarídeo em glicose e frutose.

1.3.3.3. Tolerância ao Etanol

Os isolados foram avaliados em relação a sua sensibilidade ao etanol, em meio sólido YPD acrescido de etanol nas concentrações: 8, 10 ou 12 %(v/v). Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e a aparência das colônias está apresentada na Figura 8.

Tabela 5. Capacidade de crescimento observada (após 7 dias) em meio YPD acrescido de etanol

Linhagem	Concentração de Etanol		
	8%	10%	12%
S -33	+	+	-
L124	+	+	+
L308	+	+	+
L50	+	-	-
L319	+	+	+
L145	+	+	-
L242	+	+	-

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

Todas as linhagens estudadas apresentaram crescimento na presença de etanol a 8% no meio. A linhagem L50 apresentou crescimento debilitado e nulo em concentrações a partir de 10% etanol. Enquanto as linhagens S33 e L242 não apresentaram crescimento apenas na presença de etanol a 12% no meio, corroborando com estudo realizado por Christofoleti-Furlan (2020) no qual a linhagem comercial S33 teve comportamento semelhante ao apresentado no presente trabalho.

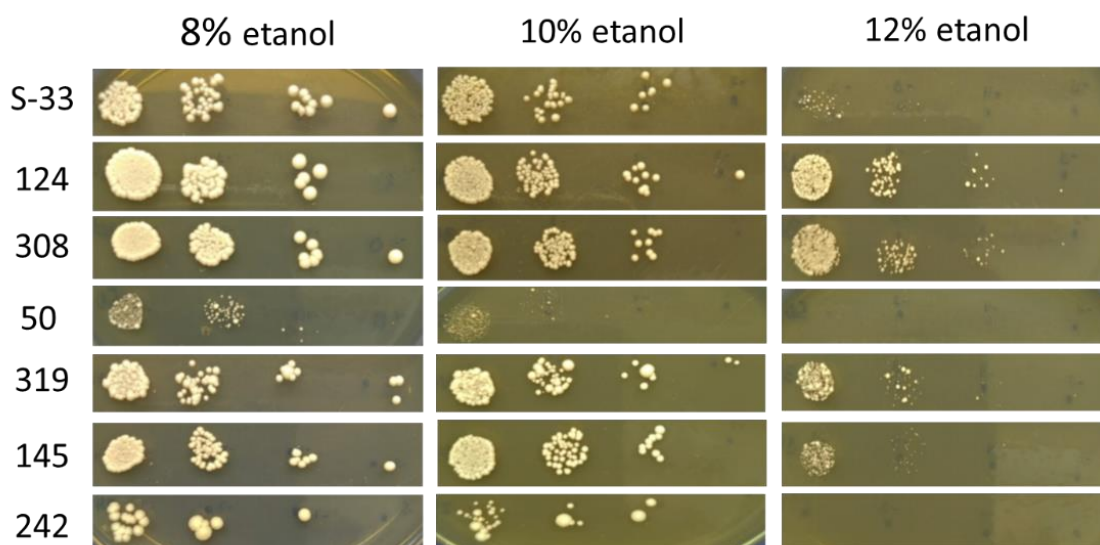


Figura 8. Padrão de crescimento das colônias das diferentes leveduras meio sintético contendo etanol em diferentes concentrações.

A conversão dos açúcares em etanol é considerada uma das principais funções das leveduras durante a fermentação, no entanto, altas taxas de etanol presentes no meio, podem se tornar um fator de estresse para as leveduras, sendo assim, a capacidade de tolerância a esse fator se torna fundamental para eficiência do processo de fermentação (manutenção da vitalidade e viabilidade celular) e para a qualidade do produto (GIBSON et al., 2007, STEWART; RUSSELL; 2009).

Linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas em processos de produção de cervejas, segundo Briggs et al. (2004), geralmente, são tolerantes a concentrações entre 3% e 6% (v/v) de etanol, porém existem linhagens que são empregadas em cervejas de alta densidade que pode ultrapassar a tolerância de 10% (v/v) de concentração de etanol. Dentro deste contexto, as linhagens L124, L308, L319 e L145 apresentaram crescimento em condições de elevada concentração de etanol (12%) demonstrando potencial para testes em mostos de alta densidade.

Os resultados obtidos de produção de sulfeto de hidrogênio (tópico 1.3.3.1), assimilação de açúcares (tópico 1.3.3.2) e tolerância ao etanol (tópico 1.3.3.3), foram utilizados como parâmetro de exclusão de linhagens para as próximas etapas deste trabalho.

1.3.3.4. Produção de espuma

A aparência dos tubos durante o ensaio de produção de espuma está apresentada na Figura 9 e os resultados obtidos ao longo do experimento de produção de espuma estão apresentados na Figura 10.

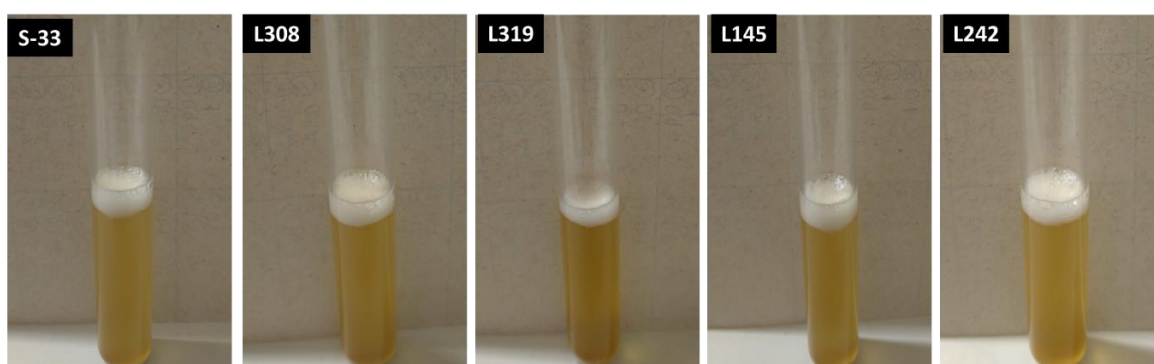


Figura 9. Fotografia dos tubos utilizados na avaliação de produção de espuma.

Na análise dos resultados, pode-se constatar que não houve diferença significativa na altura atingida pela espuma durante as fermentações avaliadas. A formação excessiva de espuma durante a fermentação pode ocasionar inconvenientes durante a produção (ocupar boa parte do volume do tanque de fermentação, ocasionar incrustações nas tubulações, comprometer a assepsia e o amargor do lúpulo e prejudicar a estabilidade da espuma na cerveja final) (KORDIALIK - BOGACKA; AMBROZIAK, 2004).

Todas as linhagens estudadas apresentaram comportamento semelhante a linhagem referência S-33. A caracterização da espuma funciona como parâmetro para o cervejeiro na escolha adequada da cepa para o processo, levando em consideração a quantidade e a estabilidade da espuma formada no processo de fermentação (BASSO, 2019).

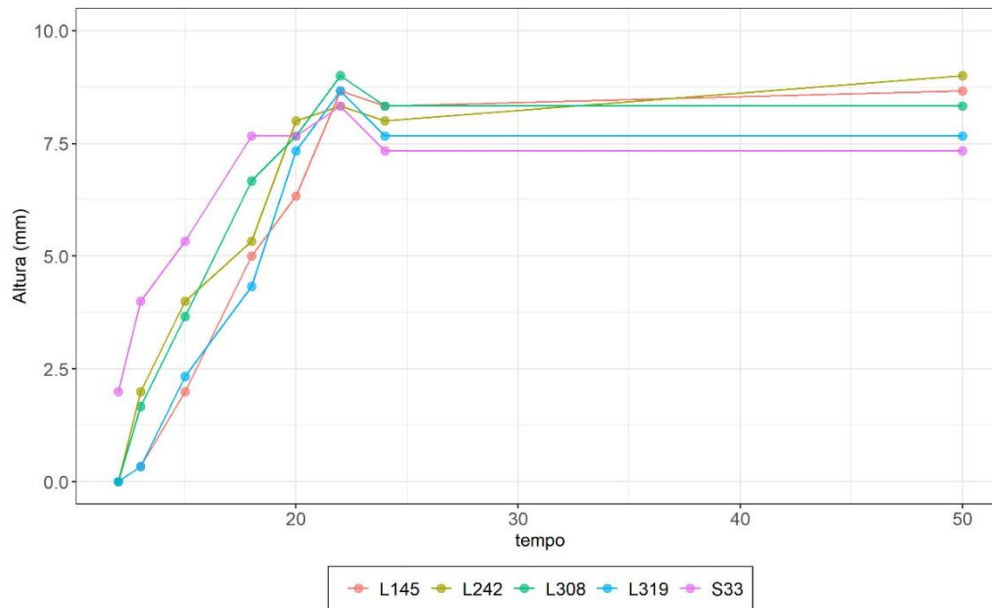


Figura 10. Produção de espuma (altura máxima em mm) para as diferentes linhagens durante a fermentação de mosto cervejeiro 11°P a 20°C.

As cepas avaliadas, alcançaram a altura máxima de espuma em torno de 22 horas de fermentação, com exceção da linhagem L242 que atingiu a altura máxima após 50 horas de fermentação conforme observado na Figura 10. A partir desses resultados, é possível inferir que as linhagens avaliadas neste estudo estariam aptas para a aplicação no processo de produção de cervejas artesanais e industriais.

1.3.3.5. Capacidade de floculação

As leveduras foram analisadas pelo teste de Helm's, que é o teste padrão de floculação recomendado pela ASBC (American Society of Brewing Chemists); neste estudo, as leveduras não apresentaram semelhança estatística entre os grupos, com exceção da levedura L308 (Figura 11).

A capacidade de floculação pode ser definida como uma tendência à agregação de células, formando flocos multicelulares que sedimentam, sendo essa característica um agente facilitador na coleta de leveduras (BAUER et al., 2010). Estudar a tendência de floculação das leveduras, além da importância para o processo, tem relevância na forma como as leveduras são classificadas, a denominação leveduras Ales e Lagers surgiram por conta do tipo de floculação que cada grupo de leveduras apresenta, sendo as Ales de alta floculação e baixa sedimentação e as leveduras Lagers de baixa floculação e alta sedimentação (ARAÚJO, 2013).

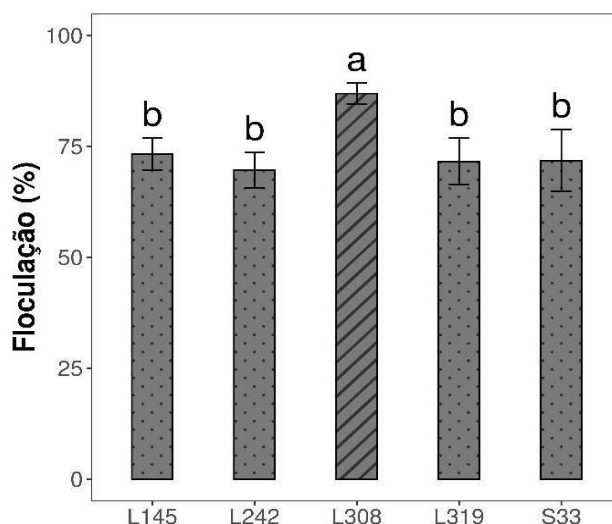


Figura 11. Quantificação da capacidade de floculação/sedimentação (%) para as diferentes linhagens em mosto cervejeiro 11°P a 20°C.

Os resultados sugerem que as linhagens L145, L242 e L319, apresentando comportamento semelhante ao da cepa S-33, corroborando com a característica relatada pelo fabricante, de possuir floculação mediana (68-72%) (FERMENTIS, 2017). Divergentemente, a linhagem L308 enquadrou-se no perfil de alta floculação (86,9%).

A floculação é característica variável nas cepas de levedura, e está ligada ao gene FLO, vários fatores afetam a floculação. São fatores que afetam a atividade do gene FLO (nutrição, temperatura, etanol e outros); a característica genética da cepa (mecanismos sensoriais, transcrição e tradução de genes FLO, incorporação de proteínas nas paredes celulares) e fatores que afetam as interações célula-célula na formação do floco (agitação, concentração de cálcio, concentrações de carboidratos, forma e tamanho da célula, força, pH, temperatura e zimolectinas) (SPEERS; RITCEY, 1995; VERSTREPEN et al., 2003; STRAUSS, 2005; LODOLO et al., 2008).

As cepas de leveduras cervejeiras podem apresentar floculação com valores que chegam a variar entre 40% a 90%, (VERSTREPEN et al., 2003). Ao observar as leveduras tradicionalmente utilizadas, observa-se que as linhagens inglesas costumam apresentar alta floculação (76 - 85%), possuindo maior necessidade de se atentar para produção de diacetil. Já as linhagens americanas costumam apresentar floculação média (62-75%), produzindo cervejas límpidas e com pouco formação de diacetil e ésteres e, por outro lado, as leveduras de baixa floculação (40-62%) são menos frequentes e mais específicas; um exemplo são as linhagens do tipo Heffeweizen (alemãs) e as Witbiers belgas, que deixam a cerveja turva e com aromas de fermentação mais pronunciado (ARAÚJO, 2013). Diante disso, é interessante

ressaltar que a capacidade de floculação é um fator importante e decisório na escolha adequada da cepa de levedura para cada estilo de cerveja e processo de produção desejado.

1.3.4. Ensaio de fermentação

As linhagens selecionadas após caracterização foram submetidas a ensaios de fermentação em mosto cervejeiro (11 °P) e comparadas com a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (S-33). A partir do monitoramento das fermentações foi possível traçar o perfil das linhagens quanto ao desprendimento de gás carbônico, atenuação aparente do mosto, pH, acidez total titulável, teor de etanol e viabilidade celular (Anexo A).

A Figura 12 apresenta o perfil da velocidade de fermentação das linhagens, o avanço da fermentação foi avaliado com base na perda de massa do sistema (tubo + mosto + inóculo), ocasionada pelo desprendimento de CO₂ ao longo da fermentação, essa perda está diretamente correlacionada com a evolução no consumo de açúcares do meio e a consequente produção de biomassa, etanol e CO₂ pela reação da fermentação (POWELL, et al., 2003). O experimento também buscou avaliar o tempo de fermentação, ou seja, o momento no qual a perda de peso (desprendimento de CO₂) iria cessar. Foi possível observar que após 62 h de fermentação todas as linhagens estudadas não apresentavam mais alteração significativa quanto ao desprendimento de CO₂.

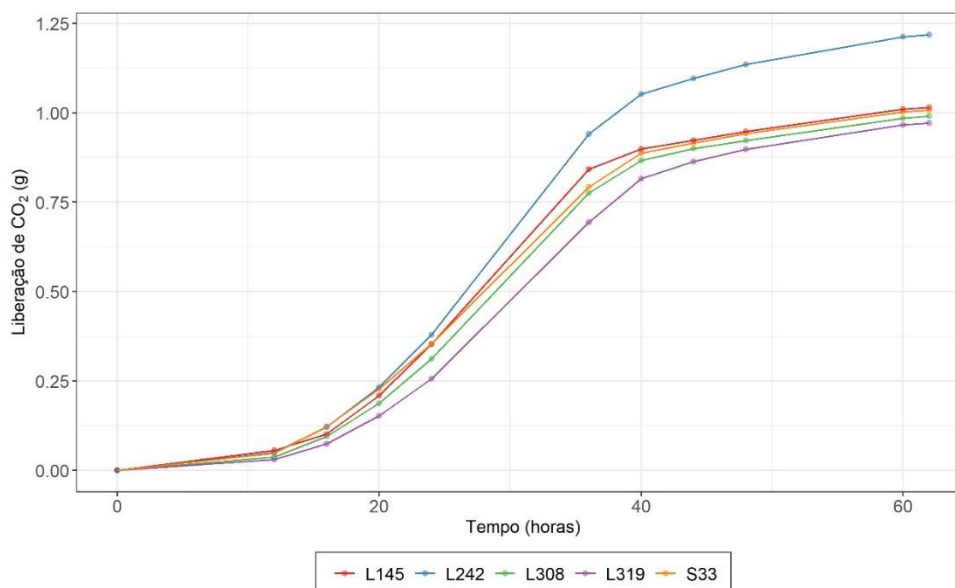


Figura 12. Velocidade de fermentação das diferentes linhagens estimada por monitoramento da perda de peso (g) pela liberação de CO₂ durante a fermentação. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 11°P a 20°C.

As curvas de fermentação, representam a perda de peso acumulada devido à liberação de CO₂ ao longo da fermentação e permitiram avaliar a velocidade com que as linhagens fermentaram os açúcares do mosto. A linhagem L319 apresentou a menor velocidade de fermentação quando comparada a cepa Referência (S-33), isso indica que houve menor liberação de gás carbônico em relação a S-33. As linhagens estudadas, apresentaram velocidades de fermentação e perfil de liberação total de gás carbônico similar a S-33. A linhagem L242 apresentou a maior velocidade de fermentação (Figura 12).

As linhagens atingiram perda de peso constante ao final do tempo de monitoramento, o que indica o término da fermentação. As quantidades totais de CO₂ liberado coincidem com os diferentes perfis de atenuação do mosto e de tolerância ao etanol apresentados pelas linhagens (Figura 13). Aquelas que tiveram maior liberação de CO₂ apresentaram também as maiores taxas de atenuação, sendo a linhagem L242 com maior taxa de atenuação no valor de 83% (Anexo A).

A capacidade de atenuação ou fermentabilidade refere-se ao consumo dos açúcares do mosto e sua transformação em etanol e CO₂ (BRIGGS et al., 2014). A maioria de linhagens cervejeiras é capaz de atenuar o mosto em uma faixa que varia de 65 a 80%. Diante disso, convencionou-se que para o universo cervejeiro, existem basicamente três faixas de atenuação do mosto: baixa (65 a 70%), média (71 a 75%) e alta (76 a 80%) (PALMER, 2017). Segundo o fabricante (FERMENTIS, 2017), a cepa cervejeira S-33, é considerada de baixa atenuação.

De acordo com a Figura 13 é possível observar o perfil de atenuação do mosto e o teor alcoólico produzido pelas linhagens isoladas de produção de cachaça. As cepas L308 e L319 apresentaram fermentabilidade semelhante ao da linhagem Referência S-33, porém, a mesma correlação não se repete na produção de etanol, esse fator, pode estar associado a diferenças na produção de etanol em alguns casos em decorrência do desvio de açúcares para a produção de biomassa.

A linhagem L242, apresentou a maior capacidade de atenuação (83%) e o maior produção de etanol (4,35% (v/v)). Nesse sentido, podemos observar a cepa L145 apresentou atenuação média (76%) e uma baixa produção de álcool de 2,95% (v/v). Isso reflete o perfil da fermentabilidade e da produção de etanol encontrados no experimento, mostrando o paralelismo que existe entre os parâmetros citados. A importância destes resultados é que estes são um dos fatores mais relevantes no momento da escolha da cepa em função do estilo de cerveja que se deseja produzir e das características que se espera na mesma.

Os valores extrato final aparente (°P) nos testes de microfermentação (Figura 13), apresentaram-se dentro do esperado em função do perfil de atenuação e do teor alcoólico de cada linhagem. Os resultados obtidos demonstram que, apenas a cepa L-242 apresentou diferença significativa (Figura 13 C) quando comparada com as demais cepas de leveduras estudadas para esse parâmetro.

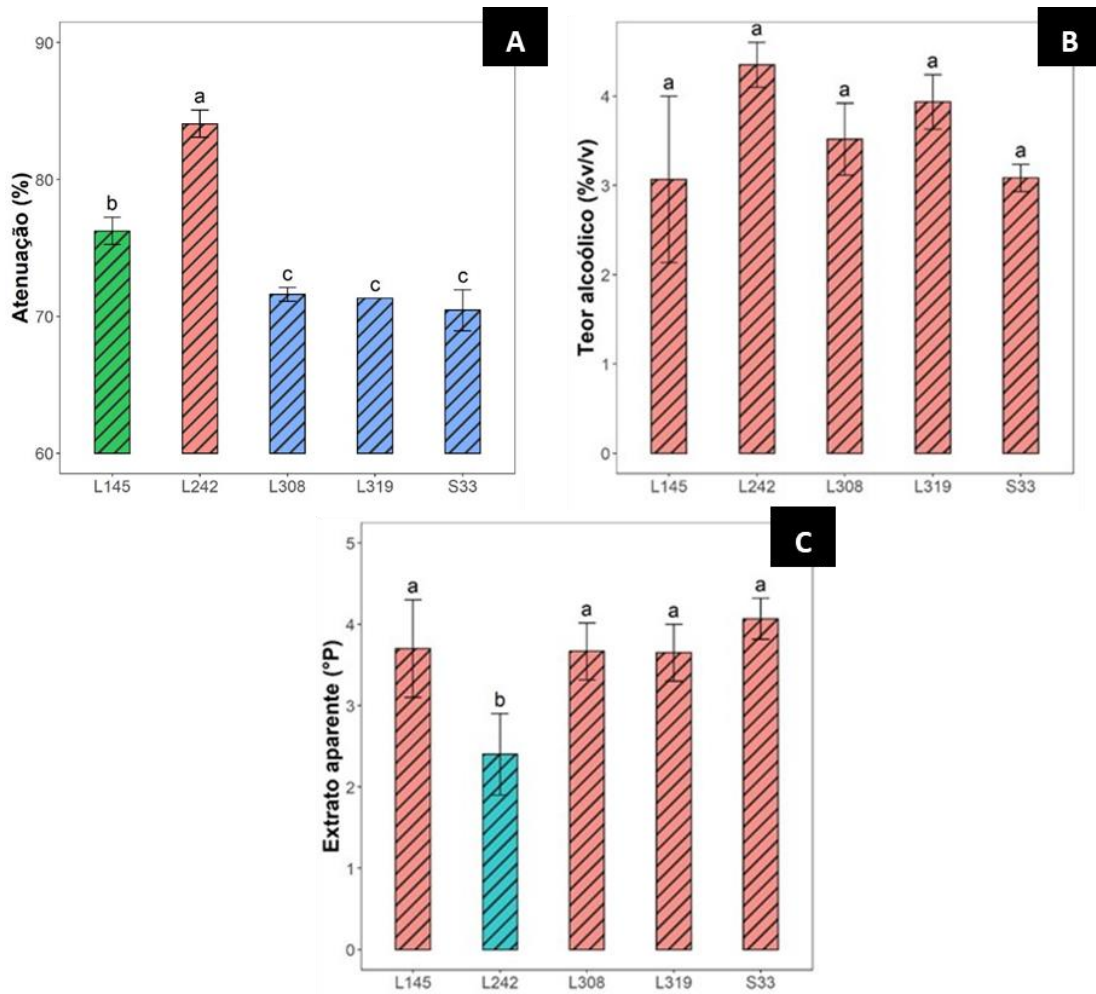


Figura 13. (A) Taxa de fermentabilidade (%) calculada e (B) Teor alcoólico (% v/v) (C) Extrato final aparente, após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens L308, L319, L145, L242 e a linhagem comercial S-33. Letras iguais não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

A viabilidade celular e a biomassa avaliadas durante a fermentação das amostras estão apresentados na Figura 14. As cepas de leveduras isoladas neste estudo apresentaram comportamento semelhante entre si nos testes de fermentação e sob as condições analisadas. Segundo Blicek et al. (2007), o desempenho fermentativo e a qualidade sensorial das cervejas estão correlacionados principalmente com a condição fisiológica da levedura, ou seja, com a capacidade de as leveduras manterem uma alta taxa de viabilidade, fator fundamental para que as leveduras possam ser reutilizadas em fermentações subsequentes mantendo as características sensoriais da bebida reproduzíveis.

As linhagens apresentaram alta viabilidade celular após o ciclo de fermentação, apresentando valores acima de 90% (Figura 14 A), exceto a linhagem Referência S-33 que apresentou 88% de viabilidade ao final da fermentação. Ao observar a produção de biomassa, a linhagem L242 apresentou uma produção de biomassa 25% maior do que as demais

linhagens estudadas, como consequência direta, essa cepa também apresentou a maior velocidade de fermentação, maior atenuação do mosto e maior produção de etanol.

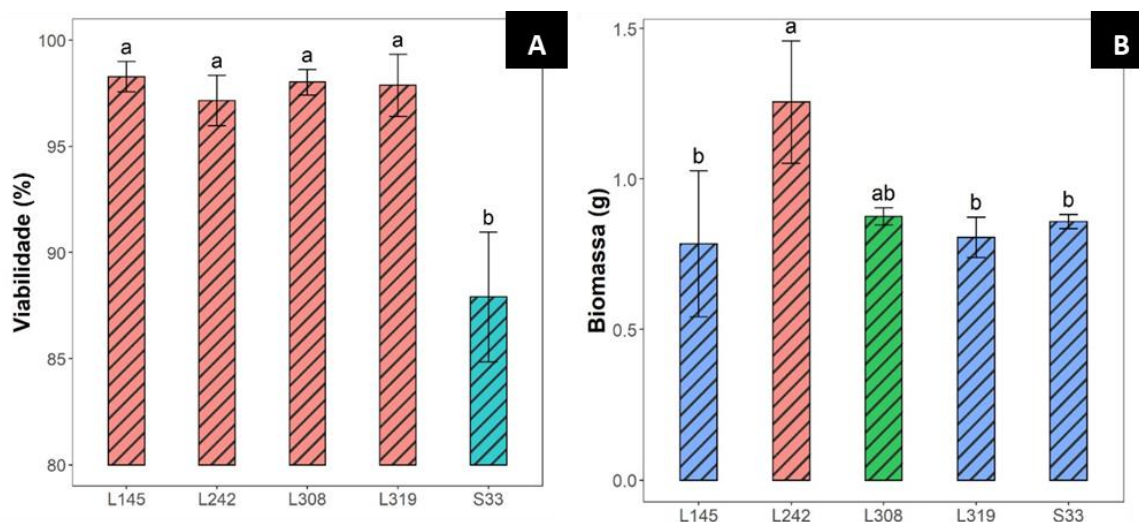


Figura 14. (A) Viabilidade celular (%) e (B) Biomassa úmida centrifugada (g) obtida após a microfermentação para as diferentes linhagens. Fermentação conduzida em mosto cervejeiro 11°P a 20°C. *Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

O pH e a acidez podem afetar a bomba de prótons e outras funções celulares, tais como a absorção de nutrientes (REIS, 2016). As cervejas do estilo “sour beer”, segundo Tonsmeire (2014), são consideradas cervejas ácidas, pois possuem valores de acidez variando de 4 a 20 g ácido acético /L; no entanto, nesse estilo, a acidez elevada é um fator desejável, e tal acidez advém também da atividade de outros microrganismos na bebida como bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* (ANGELONI, 2016). Os valores de acidez total titulável observados no presente trabalho, mostram que todas as linhagens isoladas apresentaram acidez maior que a linhagem comercial (S-33) (Figura 15-A). As amostras apresentaram diferença significativa e tiveram como valor médio 1,18g de ácido acético/L, ou seja, linhagens de baixo potencial de acidificação.

Segundo Cooney (1981), as linhagens de *S. cerevisiae* toleram ampla variação de pH, crescendo entre os limites de 2,5 a 8,5, no entanto o valor ótimo de pH para essa espécie de levedura é em torno de 4,5. Durante o transporte de nutrientes, as células de levedura acidificam seu ambiente através de uma combinação de liberação de prótons, liberação direta de ácidos orgânicos e dissolução de CO₂ (BUDRONI et al., 2018). Ao final dos ensaios de fermentação as linhagens isoladas não apresentaram variação significativa quanto ao pH, tendo como valor médio 3,8 (Figura 15-B).

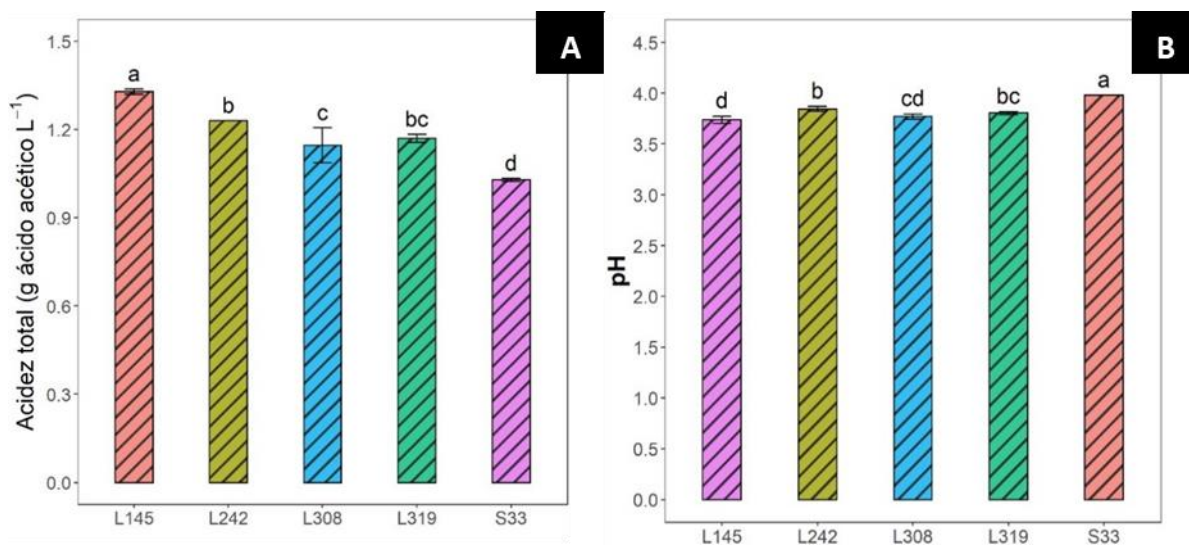


Figura 15. (A) Parâmetros de acidez total titulável (g ácido acético/L) e (B) pH obtidos após microfermentação conduzida com inóculo puro das linhagens L308, L319, L145, L242 e a linhagem comercial S-33.

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

1.4 Considerações finais

As leveduras isoladas de processos de fermentação espontânea de caldo de cana na produção de cachaça apresentaram potencial fisiotecnológico para utilização na produção de cervejas artesanais. De um total inicial de 120 cepas, foram selecionadas 16 cepas de cada unidade produtora, totalizando 48 isolados e após caracterização molecular foram escolhidas seis linhagens, sendo duas de cada destilaria (A1, A2 e A3) para a caracterização fisiotecnológica, das quais quatro linhagens foram testadas em ensaio fermentativo e demonstraram capacidade de aplicação industrial na fermentação de cervejas artesanais.

Através da caracterização das leveduras isoladas neste trabalho foi possível estabelecer técnicas plenamente satisfatórias tanto para análise de extração de DNA, quanto para a técnica de identificação de isolados de forma ágil e eficiente. A técnica de análise de polimorfismo utilizada no estudo foi capaz de caracterizar e diferenciar as linhagens da espécie *S. cerevisiae* isoladas, assim como, possibilitar a identificação de alternâncias populacionais e do *terroir* impresso na região pelas diferenças e semelhanças das linhagens ao longo do tempo. Apesar de detectarmos mais de uma linhagem nas fermentações amostradas, nos três alambiques estudos, houve uma linhagem de levedura dominante e persistente ao longo do tempo como nos alambiques A1 e A2, no A3 ocorreu uma alternância de linhagens entre os meses, porém foram linhagens com mesmo perfil polimórfico apresentado nos alambiques A1 e A2.

A caracterização fisiotecnológicas das linhagens isoladas permitiu a avaliação detalhada e a triagem das cepas com potencial para fabricação de cervejas, um paralelo foi

traçado utilizando o processo de tipificação e as linhagens L124, L308, L50, L319, L145 e L242 foram testadas quanto à produção de sulfeto de hidrogênio, assimilação de açúcares, tolerância ao etanol, apenas as cepas L308, L319, L145 e L242 apresentaram resultados satisfatórios para esses parâmetros, que foram utilizados como critério de exclusão para as seguintes etapas do projeto e diante disso estas cepas também foram testadas quanto produção de espuma e floculação.

Com a utilização dos ensaios de microfermentação foi possível avaliar o perfil físico-tecnológico de cada linhagem quanto à diversos parâmetros (desprendimento de gás carbônico, atenuação aparente do mosto, pH, acidez total titulável, teor de etanol e viabilidade celular) e comprovar o potencial fermentativo das linhagens isoladas de processo de fermentação espontânea de cachaça em mosto cervejeiro base.

O presente estudo demonstrou a aplicação de técnicas moleculares modernas que são adequadas para identificação rápida de cepas de *S. cerevisiae* e testes adicionais de várias cepas quanto ao seu potencial tecnológico. A combinação de técnicas moleculares modernas, incluindo primers espécie-específicos, e tipagem interdelta PCR nos permitiu identificar *S. cerevisiae* em nível de cepa. Também importantes características fisiológicas-tecnológicas das leveduras utilizadas neste estudo são adequadas para a seleção rápida das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* que podem ser aplicadas no processo de produção de cervejas artesanais.

Referências

- ALMEIDA, M.B. DE. **Caracterização de leveduras não- *Saccharomyces* com potencial para a produção de cervejas especiais**. 2021. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2021.
- ANGELONI, L.H.P. **Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos**. 2016. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983, v. 5.
- AQUILANI, B.; LAURETI, T.; POPONI, S.; SECONDI, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: an exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214–224, 2015. doi: 10.1016/j. foodqual.2014.12.005.
- ARAÚJO, T.M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.
- BASSO R.F. **Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas**, 2019. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2019.

- BAUER, F.F.; GOVENDER, P.; BESTER, M.C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 31-39, 2010.
- BLIECK, L.; TOYE, G.; DUMORTIER, F. et al. Isolation, and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 815-824, 2007.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 jun. 2005. Seção I, p. 3.
- BRIGGS, D.E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing: Science and Practice. Cambridge. **Woodhead Publishing Limite**, 2004.
- BUDRONI, M.; ZARA, G.; CIANI, M.; COMITINI, F. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts. In: **Brewing Technology**. p. 267–322. 2018. DOI:10.5772/intechopen.68792
- CAMPBELL I. Wild yeasts in brewing and distilling. In: Priest FG, Campbell I (eds). **Brewing Microbiology**. London, UK: Chapman & Hall, 1996, 193–208.
- CHRISTOFOLETI-FURLAN, R.M.; PORTUGAL, C.B.; VARIZE, C.S. et al. Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel starters for high-gravity brewing. **Food Research International**, v. 135, p. 109282, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109282>
- COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: REHM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology: Microbial fundamentals**. Weinheim: Verlag Chemie, 1981. 73p
- CUBILLOS, F.A.; GIBSON, B.; GRIJALVA-VALLEJOS, N. et al. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 383–398, 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- DOBROWOLSKI, P. Short protocols in molecular biology. 2nd ed. A compendium of methods from “current protocols in molecular biology”. Edited by FREDERICK M. AUSUBEL et al., John Wiley & Sons, 1992., ISBN 0-471-57735-9. **Acta Biotechnologica**, v. 13, n. 1, p. 88-88, 1993.
- DRAGONE, G.; ALMEIDA-SILVA, J.B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Bebidas Alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2010. v.1, cap.2, p.15-48.
- GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. (Ed.) **Economic perspectives on craft beer: A revolution in the global beer industry**. Springer, 2017. DOI:10.1007/978-3-319-58235-1
- GIBSON, B.; GEERTMAN, J.A.; HITTINGER, C.T. et al. New yeasts-new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 4, 2017. doi: 10.1093/femsyr/fox038.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.004>
- HIERRO N, ESTEVE-ZARZOSO B, MAS A, GUILLAMÓN JM. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1340-9, 2007. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00304.x.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). **Biociencia Industrial: engenharia bioquímica**. 1 ed. v. 2. Edgar Blucher, 2001. cap. 6, p. 93-122.

- KORDIALIK-BOGACKA, E. AND AMBROZIAK, W. 2004 'Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84(14), pp. 1960-1968.
- KUCK, L. S. Cerveja: **sabor e aroma**. 2008. 46f. Trabalho acadêmico (Graduação em Química de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.
- KURTZMAN, C.; ROBNETT, D. J. Identification and phylogeny of Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in Ecology. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, , Springer, 2006, p. 11–30.
- KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 2004. 946p.
- LAVALLEE, F.; SALVAS, Y.; LAMY, S. et al. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, p. 86-91. 1994.
- LEGRAS, J. L.; KARST, F. Optimization of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 2, p. 249–255, 2003.
- LIPSON, D.A. The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 615, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00615>
- LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.F.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.
- MARTORELL, P.; QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6823–6830, 2005.
- MENESES, J.; HENSCHKE, P.A.; JIRANEK, V. (2002). 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, p. 310–321, 2002.
- MICHEL, M.; MEIER-DORNBERG, T.; JACOB, F. et al. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 569–587, 2016. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- MUIR, A.; HARRISON, E.; WHEALS, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, p. 552–563. 2011.
- NESS, F.; LAVALLÉE, F.; DUBOURDIEU, D. et al. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 89-94, 1993. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620113>
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34–50, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>

PALMER, G.H. Barley and malt. In: PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. (Ed.). **Handbook of brewing**. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. chap. 5, p. 139-160.

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

REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, 2016.

REITENBACH, A. **Desenvolvimento de nariz eletrônico para detecção de compostos voláteis na cerveja**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

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

SCHULLER, D.; VALERO, E.; DEQUIN, S.; CASAL, M. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 19–26. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00928-5

SETTANNI, L.; SANNINO, C.; FRANCESCA, N. et al. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 606-614, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312002927>>.

SILVA-FILHO, E.A.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13–23, 2005.

SUÁREZ, V.B.; BEDRIÑANA, P.R.; QUEIPO, L.A, ALONSO, M. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiology**, v. 25, p.690-697, 2008.

SPEERS R.A.; RITCEY L.L. Towards an ideal flocculation assay. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, V. 53, P. 174–177, 1995.

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

STRAUSS C.J. **The role of lipids in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae***. PhD thesis, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa. 2005.

TONSMEIRE, M. **American sour beers: Innovative Techniques for Mixed Fermentations**. Brewers Publications, 2014.

TRA BI, C.Y.; N'GUESSAN, F.K.; KOUAKOU, C.A. et al. Identification of yeasts isolated from raffia wine (*Raphia hookeri*) produced in Côte d'Ivoire and genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by PCR inter-delta. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 125, 2016. doi: 10.1007/s11274-016-2095-3.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast flocculation, what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 197–206, 2003.

VICENTI, M.A. **Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação da cachaça de alambique.** 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) -Universidade Federal de Ouro preto, Ouro preto, MG, 2007.

VIEIRA, D.D.; TRINDADE, L.C.A.; NUNES, S.L.D. **Desenvolvimento e caracterização de cerveja artesanal estilo Ale Blond com adição de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba. 2016. 50f.

XUFRE A, ALBERGARIA H, GÍRIO F, SPENCER-MARTINS I. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 127-32, 2011.doi: 10.1007/s10295-010-0837-z.

WANG, S.S.; THORNTON, K.; KUHN, A.M. et al. Homogeneous Real-Time detection of single-nucleotide polymorphisms by strand displacement amplification on the BD ProbeTec ET System. **Clinical Chemistry**, v. 49, p. 1599-1607, 2003.

Anexo
Anexo A

Parâmetros determinados nos ensaios de fermentação com 30 mL de mosto cervejeiro (11°P) para as diferentes respectivas linhagens incubadas a 20°C: Peso total de CO₂ liberado (g) ao longo da fermentação; Atenuação aparente do mosto (%); Viabilidade (%); Atenuação aparente do mosto ou fermentabilidade (%); Extrato aparente do mosto (°P); Teor de etanol (% v/v); Acidez total titulável (g/L) e pH.

Linhagem	Perda CO₂ (g)	BIOMASSA (g)	VIABILIDADE (%)	Atenuação Aparente (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (% v/v)	Acidez Total (g/L)	pH
	1,030	0,831	85	0,70	3,5	2,95	1,02	3,98
<i>S-33</i>	1,009	0,873	88	0,72	3,4	3,25	1,03	3,98
	0,982	0,871	91	0,70	3,5	3,05	1,03	3,98
Média	1,009	0,871^b	88^b	0,70^c	3,50^a	3,05^a	1,03^d	3,98^a
DV	0,02	0,02	0,03	0,02	0,06	0,15	0,01	0,00
	0,981	0,870	97	0,71	3,3	3,10	1,11	3,78
<i>308</i>	1,014	0,906	98	0,71	3,4	3,55	1,11	3,74
	0,976	0,851	99	0,72	3,2	3,90	1,22	3,79
Média	0,981	0,870^{ab}	98^a	0,71^c	3,30^a	3,55^a	1,11^c	3,78^{cd}
DV	0,02	0,03	0,01	0,01	0,10	0,40	0,06	0,03
	1,008	0,841	99	0,71	3,3	4,00	1,16	3,82
<i>319</i>	0,939	0,729	96	0,71	3,2	3,60	1,16	3,8
	0,966	0,849	98	0,71	3,3	4,20	1,19	3,79
Média	0,966	0,841^b	98^a	0,71^c	3,30^a	4,00^a	1,16^{bc}	3,80^{bc}
DV	0,03	0,07	0,01	0,00	0,06	0,31	0,01	0,02
	1,028	0,858	99	0,77	2,6	4,05	1,33	3,72
<i>145</i>	0,972	0,982	98	0,76	2,9	2,20	1,33	3,71
	1,045	0,514	98	0,76	2,4	2,95	1,32	3,78
Média	1,028	0,858^b	98^a	0,76^b	2,60^a	2,95^a	1,33^a	3,72^d
DV	0,04	0,24	0,01	0,01	0,25	0,93	0,01	0,04
	1,215	1,137	97	0,83	1,9	4,35	1,23	3,87
<i>242</i>	1,196	1,490	96	0,83	2,1	4,60	1,23	3,83
	1,245	1,140	99 ^a	0,85	1,7	4,10	1,23	3,83
Média	1,215	1,140^a	0,97	0,83^a	1,90^b	4,35^a	1,23^b	3,83^b
DV	0,02	0,20	0,01	0,01	0,20	0,25	0,00	0,02

Letras iguais na coluna, para o mesmo parâmetro, indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$). DV = Desvio Padrão

2. PERFIL SENSORIAL DE CERVEJAS ESPECIAIS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTAÇÃO ESPOTÂNEA DE CACHAÇA

Resumo

Diversos estudos têm demonstrado o potencial das leveduras selvagens de *Saccharomyces* na produção de cervejas artesanais e sua contribuição para novos perfis sensoriais. Essas leveduras, isoladas de outros bioprocessos, podem apresentar potencial para aplicação na fabricação de cerveja. A fim de avaliar a capacidade cervejeira de cinco linhagens de leveduras *Saccharomyces*, isoladas do processo de fermentação espontânea de cachaça, foram produzidas cervejas do estilo *American Blond Ale* (80% de malte Pilsen, 18,3% de malte Viena e 1,7% de malte Caragold). As características físico-químicas e sensoriais das cervejas foram comparadas com a cerveja produzida com uma cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (SafAle S-33). Aspectos como teor alcoólico, acidez volátil, pH, cor, amargor e compostos orgânicos voláteis pertencentes ao grupo dos álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas foram avaliados. As características físico-químicas demonstraram que todas as cervejas estavam dentro do padrão esperado para o estilo de cerveja em questão. No entanto, foram identificadas diferenças em relação as linhagens de leveduras utilizadas. Em relação a análise sensorial, as cervejas obtidas das cinco linhagens de leveduras selecionadas tiveram perfis aromáticos complexos. De maneira geral, os resultados forneceram bons insights sobre a utilização de linhagens de leveduras isoladas do processo de produção de uma bebida tipicamente nacional e como o estudo de leveduras selvagens pode abrir caminho para uma nova geração de cervejas artesanais brasileiras.

Palavras-chaves: Cervejas especiais, *Saccharomyces*, Bioaromatização.

2. SENSORIAL PROFILE OF SPECIAL BEERS PRODUCED BY ISOLATED YEASTS FROM SPONTANEOUS CACHAÇA FERMENTATION

Abstract

Several studies have demonstrated the potential of wild *Saccharomyces* yeasts in the production of craft beers, and their contribution to new sensorial profiles. These yeasts, isolated from other bioprocesses, can show potential for application in brewing. In order to evaluate the brewing ability of five *Saccharomyces* yeast strains isolated from the spontaneous fermentation process of cachaça, American Blond Ale style beers were produced (80% Pilsner malt, 18.3% Vienna malt, and 1.7% Caragold malt). The physicochemical and sensorial characteristics of the beers were compared with the beer produced with a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (SafAle S-33). Aspects such as alcohol content, volatile acidity, pH, color, bitterness, and volatile organic compounds belonging to the group of alcohols, esters, aldehydes, and ketones were evaluated. The physical-chemical characteristics demonstrated that all beers were within the expected standard for the beer style in question. However, differences were identified in relation to the yeast strains utilized. Regarding the sensory analysis, the beers obtained from the five selected yeast strains had complex aromatic profiles. Overall, the results provided good insights into the use of yeast strains isolated from the production process of a typically national beverage and how the study of wild yeasts can pave the way for a new generation of Brazilian craft beers.

Keywords: Specialty beers, *Saccharomyces*, Bioflavoring.

2.1 Introdução

O mercado cervejeiro no Brasil passou por grande expansão nas últimas décadas, apresentando 1.549 cervejarias em operação em 2021 (MAPA, 2021). Este número é ainda maior se considerarmos as cervejarias ‘ciganas’, marcas que terceirizam suas produções em outras cervejarias e, nesse panorama, contamos atualmente com um número de produtos registrados, acima de 35 mil no último ano, e um aumento acumulado de cerca de 400% nos últimos cinco anos. Estes números incluem tanto as cervejarias industriais como as artesanais e fazem parte do Anuário da Cerveja no Brasil de 2021, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que regulamenta o setor.

A legislação brasileira define cerveja como sendo a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada, água potável, com adição de lúpulo e ação da levedura (BRASIL, 2009). A leveduras é um insumo essencial para a produção de cerveja, dentre as principais espécies de leveduras utilizadas estão a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus*. (LIBKIND et al., 2011; BING et al., 2014).

A maioria das linhagens de leveduras industriais é de origem europeia -principalmente belga, inglesa ou alemã - e apresentam características genéticas e fisiológicas distintas das leveduras presentes no ambiente, conhecidas como “leveduras selvagens” (GALLONE et al., 2016). A diversificação das propriedades organolépticas da cerveja é também resultado do uso de linhagens diferentes; estas são capazes de oferecer benefícios como a produção de aromas e sabores peculiares, podendo ser utilizadas na criação de novos estilos de cerveja e na releitura de estilos históricos, ou seja, novas linhagens de leveduras podem diversificar ainda mais os produtos de um setor naturalmente diverso (CUBILLOS et al, 2019). É de grande interesse do mercado cervejeiro explorar a diversidade de leveduras, buscando selecionar novos microrganismos que confirmam propriedades organolépticas diferenciadas às cervejas, proporcionando uma maior variedade de sabores e aromas e promovendo o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos nacionais (SILVA-FILHO, 2019).

O crescente aumento no número de microcervejarias, assim como das variedades de estilos e marcas disponíveis no mercado tem resultado em novas exigências do consumidor, o que também tem sempre aberto espaço para o desenvolvimento de novos produtos (PINTO, 2018). Uma tendência em grande parte impulsionada por uma busca comprometida em cervejas especiais diferenciadas e inovadoras, em linha com as mudanças nos hábitos de consumo dos consumidores de cervejas padrão produzidas em massa para outras bebidas de alta qualidade e especiais (GARAVAGLIA; SWINNEN, 2017, GIBSON et al., 2017).

Dessa forma, a busca e pesquisa em desenvolvimento de produtos, inovação em tecnologia e aperfeiçoamento de métodos também esbarra na investigação e inovação a partir de fatores biológicos do processo, incluindo a busca por novas linhagens de levedura ou mesmo diferentes formas de sua utilização no processo produtivo (ARAÚJO, 2013). Um olhar diferente sobre este tópico, segundo nosso estudo, poderia ser a bioprospecção de novas linhagens de leveduras a partir de fermentações de caldo de cana aplicados à produção de cachaça. Na premissa de que essa hipótese pudesse ser corroborada, isto ainda significaria uma importante desoneração para o segmento, que poderia contar com alternativas para utilização de fermentos nacionais, evitando a dependência externa, e ao mesmo tempo conferindo aos produtos uma tipicidade nacional ou mesmo regional.

Uma linhagem de levedura proveniente de um bioprocessamento diferente do tradicional impacta diretamente nas características fisiológicas das células de levedura, na cinética de fermentação e na produção de compostos aromáticos. Alguns esforços foram realizados para encontrar linhagens de levedura com melhor desempenho de fermentação e com características químicas e organolépticas que propiciem o desenvolvimento de novas cervejas artesanais (CHRISTOFOLETI-FURLAN, 2020). A utilização de leveduras isoladas de bioprocessamento de produção de cachaça é uma proposta metodológica nesse sentido, usando linhagens isoladas a partir de fermentação selvagem de caldo de cana de açúcar, processo tradicionalmente realizado no Brasil todo.

A seleção de leveduras em ambientes de destilarias de cachaça pode trazer originalidade, uma vez que os microrganismos oriundos desses sistemas estão expostos a condições peculiares e restritivas, incluindo pressão osmótica, etanol, temperatura, acidez, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, estresse oxidativo e muitos outros (BASSO, 2011, FAVARO; JANSEN; VAN ZYL, 2019).

Tem sido observado um crescente interesse e esforço no segmento cervejeiro na busca por novas linhagens de leveduras de diferentes ambientes. Supõe-se que leveduras provenientes de diferentes fontes e condições podem apresentar maior versatilidade fisiológica e podem ser aplicadas para diferentes finalidades e produtos (ALBERTIN et al., 2011, BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

O processo de fermentação da cerveja é responsável por transformações importantes no produto, como formação de álcoois superiores, compostos carbonílicos, compostos sulfurosos, ésteres, ácidos orgânicos, diminuição da intensidade de coloração, diminuição do pH e precipitação de substâncias de amargor (Kunze, 2004).

Nesse sentido, o ambiente relacionado à produção de cachaça surge como uma fonte viável para a prospecção de leveduras e com potencial para contribuir na produção de cervejas especiais diferenciadas. O objetivo deste estudo foi estudar o perfil de composição química e sensorial das cervejas produzidas com leveduras isoladas do processo de fermentação espontâneo de cachaça. As linhagens previamente selecionadas foram utilizadas para a produção de cervejas especiais do estilo *American Blond Ale*, visando avaliar os atributos químicos e sensoriais determinados por cada linhagem.

2.2 Metodologia

2.2.1 Leveduras utilizadas

Quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em ambientes de destilarias de produção de cachaça da região do Circuito das Águas Paulistas (Monte Alegre do Sul – SP), foram utilizadas neste trabalho. As linhagens *S. cerevisiae* L145, L242, L308 e L319 foram avaliadas e comparadas com a cepa comercial *S. cerevisiae* Safbrew-S-33 (Fermentis).

Os microrganismos, conservados sob congelamento (-20°C) em solução de glicerol 15%, foram reativadas em meio YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L, glicose, 20 g/L) a 30°C por 48 h, para obtenção de biomassa fresca a ser aplicada nos ensaios.

2.2.2 Propagação das linhagens

As linhagens reativadas em meio YPD foram transferidas para frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio YPD, incubados a 30°C por 48h. Posteriormente, foram transferidos para Erlenmeyer (500 mL), contendo 200 mL do mesmo meio, incubados 30°C por 24h com agitação (110 rpm). As células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e preparada uma suspensão com água esterilizada na concentração de 3×10^6 cél./mL.

2.2.3 Produção da cerveja com linhagens de leveduras isoladas de cachaça

As cervejas do tipo *American Blond Ale* foram produzidas segundo as condições descritas na Tabela 1. Para a produção das cervejas foi realizado um tratamento prévio da água adicionando 14 g de CaCl₂ (cloreto de cálcio) e 1,7 g CaSO₄ (sulfato de cálcio) em 40 L de água.

Tabela 1. Condições de produção das cervejas American Blond Ale

Etapas	Temperatura	Tempo
Mosturação	52 ± 0,5°C	15 min
	67 ± 0,5°C	60 min
“Mash out”	78 ± 0,5°C	5 min
Clarificação	75 ± 0,5°C	16 L (2 lavagens)
Fervura	-	70 min
Lupulagem	-	Após 50 min fervura
Whirlpool	-	2 min
Repouso	-	30 min
Fermentação	20 ± 0,5°C	5 dias
Fermentação	22 ± 0,5°C	4 – 9 dias
Maturação	2 ± 0,5°C	15 dias

A mosturação foi iniciada com o aquecimento de 18 L de água até 45 ± 0,5°C durante e a descida dos 6 kg de malte. Três tipos de malte foram utilizados nas seguintes proporções: 4,8 kg de Malte Pilsen (80%), 1,1 kg de Viena (18,3%) e 0,1 de Caragold (1,66%). O pH da mistura (água mais malte), na mosturação era 6,0; para a correção foi adicionado ácido láctico (4 mL), obtendo-se pH final da mistura de 5,5. A seguir, o mosto permaneceu em repouso à 52 ± 0,5 °C por 15 min; depois a temperatura foi alterada para 67°C por 60 min, o “mash out” foi a 78 ± 0,5°C por 5min.

Na clarificação/lavagem do mosto, o extrato primário era de 22°P, nesta etapa foi adicionado um total de 16 L de água (8 L na 1ª lavagem com 15 minutos de repouso e mais 8 L na 2ª lavagem com 15 minutos de repouso). A água de lavagem que foi utilizada nessa etapa estava com pH inicial de 8,36; após adição de 12 mL de ácido láctico obteve-se um pH final (água de lavagem) de 4,4.

A etapa de fervura ocorreu com 27,5 L de mosto com 14,3°P, foi mantido em fervura durante 70 min e foi utilizado 18 g do lúpulo Nugget (13% a.a) aos 50 min finais de fervura. Obtendo um total de 22,5 L de mosto com um extrato de 16,5°P. Foi realizado o whirlpool por 2 min e um repouso do mosto de 30 min. A água para diluição do mosto estava com um pH inicial de 5,45, foi adicionado 1,5 mL de ácido láctico para atingir um pH final do mosto de 5,28. O apronte final foi de 32 litros de mosto a 11,5°P.

O mosto (11,5°P) foi transferido para fermentadores (baldes com capacidade de 10 L) e inoculado com as diferentes linhagens de leveduras selecionadas previamente, na concentração de 3 x 10⁶ cel/mL. A fermentação ocorreu a 20 ± 0,5°C por 5 dias e, depois a 22 ± 0,5°C por mais 4 a 9 dias, até a atenuação completa de cada amostra de cerveja. A

maturação ocorreu à $2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 15 dias. Foram realizadas duas carbonatações em barril de inox de 5L.

As cervejas foram carbonatadas por carbonatação forçada com injeção de CO_2 , agitação e refrigeração, os barris foram agitados com fluxo contínuo de CO_2 por 5 min a $2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a uma pressão de $2,7 \text{ kgf/cm}^2$.

Para o envase foram utilizadas garrafas de cor âmbar com capacidade de 600 mL esterilizadas. O envase foi realizado utilizando um sistema de contra-pressão. As cervejas obtidas com cada linhagem de levedura foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: teor alcoólico, densidade relativa, pH, acidez total, cor, amargor, compostos aromáticos e análise sensorial.

2.2.4 Análises físico-químicas das cervejas

Para a realização das análises físico-químicas dos produtos obtidos, as amostras foram previamente descarbonatadas por agitação. As análises realizadas foram:

Grau alcoólico: As amostras foram previamente destiladas em microdestilador (TECNAL, modelo TE012), de acordo com metodologia EBC (EBC, 2019) e o grau alcoólico determinado em densímetro digital (DMA 35 Basic, Anton Paar, Canada).

Acidez total titulável: Foi determinada a acidez por meio de titulometria de neutralização. O cálculo foi realizado com base na quantidade de solução de NaOH gasto em relação ao volume da amostra (ZAGO et al., 1996), expressa em gramas de ácido acético por litro, segundo equação abaixo:

$$A_t = \frac{n \times f \times N \times 60}{V}$$

Onde:

(A_t) acidez total, em g de ácido acético/L; (n) volume de NaOH gasto na titulação (mL); (f) fator de correção da solução de NaOH; (N) normalidade da solução de NaOH; 60: equivalente do ácido acético (CH_3COOH); (V) volume da amostra (mL).

pH: Os valores de pH foram determinados em pHmetro digital (DMPH-1 Digimed, Tecnal), por imersão direta do eletrodo na amostra descarbonatada.

Cor: A intensidade da cor foi medida utilizando-se o método 8.5 espectrofotométrico Analytica – EBC (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2000). A amostra de cerveja foi filtrada em membrana 0,45 µm e realizada a leitura de absorbância a 430nm. O cálculo da cor da amostra não diluída foi realizado pela fórmula:

$$\text{Cor (EBC)} = A * f * 25$$

Onde:

A= absorbância a 430nm; f= fator de diluição.

Amargor: O amargor foi determinado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela European Brewery Convention (EBC, 2004), após extração por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) em amostras acidificadas, seguido de medição espectrofotométrica (A=275nm). Os resultados foram expressos em BU (Bitterness Units). Segundo a equação:

$$\text{Amargor (EBU)} = A_{275\text{nm}} \times 50$$

2.2.5 Descrição dos métodos analíticos

As cervejas obtidas foram caracterizadas por análises cromatográficas, incluindo a detecção e quantificação de: álcoois, aldeídos e ésteres. A análise de álcoois e ésteres foi realizada por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) e aldeídos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV-visível (HPLC-UV-VIS). Todas as análises foram realizadas em parceria com a Biomade Soluções Biotecnológicas, Brasil e com o Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica da Universidade Júlio de Mesquita – UNESP/IBILCE.

Álcoois

As amostras foram analisadas segundo metodologia descrita por Aquino (2013) com adaptações, na qual foram identificadas a presença de metanol, propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-butanol, álcool isoamílico (com padrão interno, Octanol) em um sistema de cromatografia gasosa (PerkinElmer, Clarus 680) usando um detector de massas (MS) (PerkinElmer, Clarus 600T) e uma coluna Supelcowax 10 (60 m x 0,32 mm x 0,5 µm). A temperatura do injetor foi de 180°C. O split foi de 10 mL min⁻¹ e o fluxo de gás de arraste (hélio) de 2 mL min⁻¹. O programa de temperatura do forno foi de 35°C (5 min); 6°C min⁻¹ a 240°C (10 min). Os álcoois foram analisados no modo scan, somente o n-propanol foi quantificado no modo sin, utilizando m/z 31.

Ésteres

Acetato de etila, butirato de etila, hexanoato de etila, lactato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, decanoato de etila, octanoato de isoamila e acetato de isoamila foram determinados por extração em fibra de SPME PDMS/DVB. Em cada extração, 3 mL do fermentado foi colocada em frasco de headspace com capacidade de 20 mL. Os frascos foram fechados com tampa de rosca e submetidos a uma temperatura de extração de 80°C com a fibra exposta por 10 minutos. A fibra foi injetada manualmente e exposta por 1 min no cromatógrafo gasoso modelo Clarus 680 (PerkinElmer) conectado a um detector seletivo de massa modelo Clarus 600T (PerkinElmer) usando impacto de elétrons (70 eV) como fonte de ionização.

Os analitos alvo foram separados na coluna capilar Supelcowax 10 (60 m x 0,32 mm x 0,5 µm). A temperatura do injetor foi de 180°C. A temperatura do forno foi programada para 35°C durante 5 min, aquecimento a 240°C a uma taxa de 6°C min⁻¹, mantendo nesta temperatura por 10 min, usando o split de 10 mL min⁻¹. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi de 2 mL min⁻¹. Com exceção do acetato de isoamila, os ésteres foram analisados no modo sin, utilizando m/z 88. O acetato de isoamila foi quantificado no modo scan.

Aldeídos e cetonas

Acetona, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), acetaldeído, acroleína e furfural foram determinados através da derivatização dos compostos com 2,4-dinitrofenilhidrazinas, produzindo suas respectivas 2,4-dinitro-fenilidrazonas (aldeído- DNPHs) usando um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) Perkin-Elmer modelo Flexar equipado com um detector UV-Vis (Perkin-Elmer Flexar, comprimento de onda = 360 nm). A separação por HPLC foi realizada com uma coluna Thermo Scientific AcclaimTM 120 C18 (25 cm × 4,6 mm i.d. × 5,0 µm de tamanho de partícula) e um sistema de gradiente de água e acetonitrila. O volume de injeção foi de 20,0 µL e o fluxo usado foi de 0,7 mL/min.

2.2.6 Análise sensorial das cervejas

Foram realizadas avaliações sensoriais dos produtos obtido, o que possibilitou verificar as relações ou diferenças provocadas nas cervejas *American Blond Ale* pelas leveduras provenientes do processo de produção de cachaça.

Amostras

As amostras para avaliação sensorial foram produzidas utilizando uma levedura comercial (Safbrew-S-33 - Fermentis) como padrão do estudo e as linhagens isoladas previamente durante o trabalho de seleção de leveduras. No total foram produzidas cinco cervejas diferentes: sendo uma com levedura comercial e outras quatro com leveduras selecionadas. Cada amostra foi previamente codificada com números aleatórios de três dígitos e apresentada aos provadores em ordem aleatória.

Painel de provadores

Uma equipe de 19 provadores previamente treinados foi selecionada para realizar todos os testes sensoriais. O painel selecionado foi constituído de homens e mulheres, de faixa etária entre 25 e 45 anos de idade, pesquisadores do Laboratório de Qualidade de Bebidas, do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Bebidas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, cervejeiros profissionais e cervejeiros caseiros. O critério de inclusão de provadores foi apresentar idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos, com massa maior que 60 kg, não serem portadores de doenças crônicas, gestantes ou em estado de amamentação.

Seguindo o protocolo, foram entregues aos provadores um termo de consentimento – TCLE (Anexo F), de acordo com às exigências da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da ESALQ/USP e três fichas com instruções de como deveria ser realizada a análise (Anexos B, C e D). O projeto de análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da ESALQ/USP CAAE 81265417.0.0000.5395 (Anexo E).

Metodologia para a Análise sensorial

Inicialmente os provadores foram confrontados com um teste de ambientação com gostos básicos que envolveu o uso de padrões de gostos básicos diluídos na matriz da cerveja com levedura padrão. A concentração de cada um dos padrões é descrita na Tabela 2. Nesta etapa, foram apresentadas amostras dos gostos básicos e a amostra referência correspondente à cerveja com levedura comercial padrão, de forma a incentivar os avaliadores a perceberem a diferença na percepção de cada um dos gostos básicos levando em conta os interferentes da matriz. Nesta etapa foram apresentados aos provadores 4 mL de cada amostra dos cinco gostos básicos, mais a amostra referência e eles foram incentivados a consumir todo o volume de uma só vez (ANEXO F).

Tabela 2. Concentração de padrões de gostos básicos diluídos na cerveja *American Blond Ale*

Gosto básico	Padrão utilizado	Concentração na matriz
Doce	Sacarose	20 g·L ⁻¹
Salgado	NaCl	4 g·L ⁻¹
Ácido	Ácido cítrico	7 g·L ⁻¹
Amargo	Extrato de lúpulo PODOOZE	350 µL·L ⁻¹
Umami	Glutamato monossódico	2 g·L ⁻¹
Neutro	-	-

A avaliação sensorial iniciou-se com a realização de um treinamento. O painel de especialistas foi submetido a familiarização com os possíveis atributos a serem identificados no teste (aromas, gostos básicos e sensações), neste momento os provadores foram reunidos para confrontar referências de aromas e sensações, com o intuito de estabelecer padrões para aromas, foram selecionados materiais que serviram de referência para o nivelamento da equipe (ANEXO G). Como material de referência durante o treinamento, utilizou-se o Kit de extrato e *flavours* da *BrauFlavor (Brasil)* e rodas sensoriais referências (CLAPPERTON; DALGLIESH; MEILGAARD, 1976; DREDGE, 2014; SILVELLO, 2020).

Para referência de coloração, os avaliadores confrontaram uma tabela de coloração de cerveja (escala EBC) com legendas em português para as diferentes tonalidades (Figura 1).

MACRO DIVISÃO	SRM	TONALIDADE	EBC	CLASSIF.**
Palha	2 - 3		3,94 - 5,91	Cerveja Clara ≤ 20 EBC
Amarelo	3 - 4		5,91 - 7,88	
Ouro	4 - 5		7,88 - 9,85	
Âmbar	6 - 9		11,82 - 17,73	
Profundo âmbar / cobre luz	10 - 14		19,70 - 27,58	
Cobre	14 - 17		27,58 - 33,49	Cerveja Escuro ≥ 20 EBC
Profundo cobre/castanho claro	17 - 18		33,49 - 35,46	
Castanho	19 - 22		37,43 - 43,34	
Castanho Escuro	22 - 30		43,34 - 59,10	
Castanho muito escuro	30 - 35		59,10 - 68,95	
Preto	35 +		68,95 - 78,80	
Preto opaco	40 +		>78,80	

Fonte: Adaptado de BJCP Guideline 2008 **Classificação de acordo com a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994

Figura 1. Tabela com escala de coloração entregue aos provadores.

Fonte: SPIESS, 2016.

A análise sensorial ocorreu em uma sessão de avaliação contendo cinco amostras; a sessão foi dividida em três etapas: mapeamento, descritiva e avaliação global. O objetivo foi avaliar as diferenças e a aceitação entre cerveja produzida com levedura comercial e a produzida com a linhagem selecionada previamente neste trabalho.

Os especialistas avaliaram as amostras em uma sessão, seguindo a metodologia *Napping* (PAGÈS, 2003). Esta metodologia pode ser aplicada como uma versão do mapeamento projetivo onde os provadores são orientados a organizar as amostras, em uma folha retangular A3, de acordo com as similaridades e diferenças (próximas se forem similares e distantes se forem diferentes) (LAWLESS, 1989; LAWLESS et al., 1995). Após o agrupamento das amostras, o painel foi orientado a atribuir descritores para cada amostra. Estudos mostram que a utilização da metodologia *Ultra Flash Profile* (PERRIN et al., 2008) com provadores treinados facilita durante a descrição dos atributos, quando comparada com consumidores, pois estes apresentam maior dificuldade na verbalização de atributos (WORCH et al., 2014). Ao final de cada sessão, aplicou-se um teste afetivo descrito por Moraes (1985) para a avaliação hedônica, a fim de se avaliar quanto a qualidade de cada amostra provada (impressão global). A combinação de diferentes métodos de avaliação sensorial possibilita a avaliação de todos os tratamentos estudados, sob diferentes perspectivas.

2.2.7 Análise de dados

Para as análises de dados foi utilizada a IDE R (R versão 4.1.2) com o auxílio das bibliotecas de análise FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008) SensoMineR (LÊ; HUSSON, 2008), funções nativas de testes de hipótese e a biblioteca gráfica ggplot. Para os dados físicoquímicos e cromatográficos foi utilizada a análise descritiva (média e desvio padrão) mediante análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey, a 5%, aplicado para comparar as médias dos resultados em função das leveduras utilizadas para produzir as cervejas.

Para as análises sensoriais foi utilizada a análise de componentes principais (ACP) foi realizada pelo critério *listwise* e os componentes extraídos considerando-se um autovalor (*eigenvalue*) mínimo de 1,0. E como metodologia complementar os resultados referentes ao teste afetivo de aceitação utiliza a escala hedônica estruturada foram analisados mediante análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey, a 5%, aplicado para comparar as médias dos resultados.

2.3 Resultados e Discussão

Linhagens de leveduras isoladas de processos fermentativos de produção de cachaça foram selecionadas conforme apresentado anteriormente. As quatro linhagens selecionadas (L308, L145, L242 e L319) e a levedura comercial S-33 foram utilizadas para a produção de cerveja do estilo *American Blond Ale*.

2.3.1 Análise físico-química da cerveja

As cervejas obtidas a partir de fermentações com as diferentes leveduras apresentaram valores de aproximadamente 10 EBC (nuance amarelo), sem diferenças significativas entre si (Figura 2), enquadrando-se na caracterização de cervejas claras (European Brewery Convention, 2000). A cor da cerveja é uma característica relacionada diretamente ao aspecto visual da bebida e tem influência direta da matéria-prima utilizada, por exemplo o tipo de malte utilizado, que na presença do calor, pode ocasionar as reações de Maillard entre açúcares redutores e aminas alterando a coloração do mosto (BOULTON; QUAIN, 2001) ou de outras etapas do processo, como a oxidação de polifenóis e taninos durante o processo de produção ou a maturação (BAMFORTH, 2003).

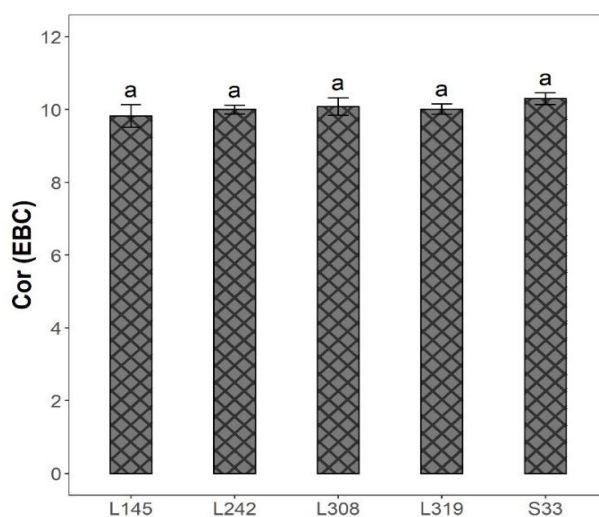


Figura 2. Parâmetros de cor (EBC) das cervejas elaboradas com as diferentes leveduras.

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

Com relação ao pH, as cervejas produzidas com as diferentes linhagens não apresentaram diferenças significativas entre si, variando de 3,98 a 4,17 (Figura 3). As cervejas são consideradas produtos ácidos, tendo o seu pH situado na faixa de 3,8 a 4,6 (BAMFORTH, 2003), esse pH costuma estar amplamente associado à fermentação. De acordo com Araújo;

Silva; Minim (2003) as cervejas tipo ale apresentam um pH entre 3,0 e 6,0, este baixo valor de pH pode ser atribuído ao pH do malte que situa entre 4,0 e 5,0 (VIEIRA, 2016).

A acidez total é uma medida quantitativa do grau de ácidos presentes na amostra (STEWART; RUSSELL, 2009). De acordo com Guyot-Declerck et al. (2005), a acidez tem relevância na percepção sensorial do sabor ácido, o qual se relaciona com a presença dos ácidos orgânicos na bebida. Conforme pode-se constatar na Figura 3, as cervejas apresentaram valores de acidez que variaram entre 2,37 e 3,17 g ácido acético/L, sem diferença significativa entre as amostras, o que pode indicar produção e presença de ácidos no estado livre de forma semelhante entre as linhagens estudadas. Vale ressaltar que o tamanho das células de levedura está relacionado com os níveis de pH da cerveja, ou seja, cervejas produzidas por cepas de levedura com tamanho de célula pequeno apresentaram pH mais baixo, enquanto leveduras com tamanho de célula grande apresentam pH mais alto, sendo esta correlação um importante determinante da estabilidade e do sabor das cervejas (SHIMIZU et al., 2001).

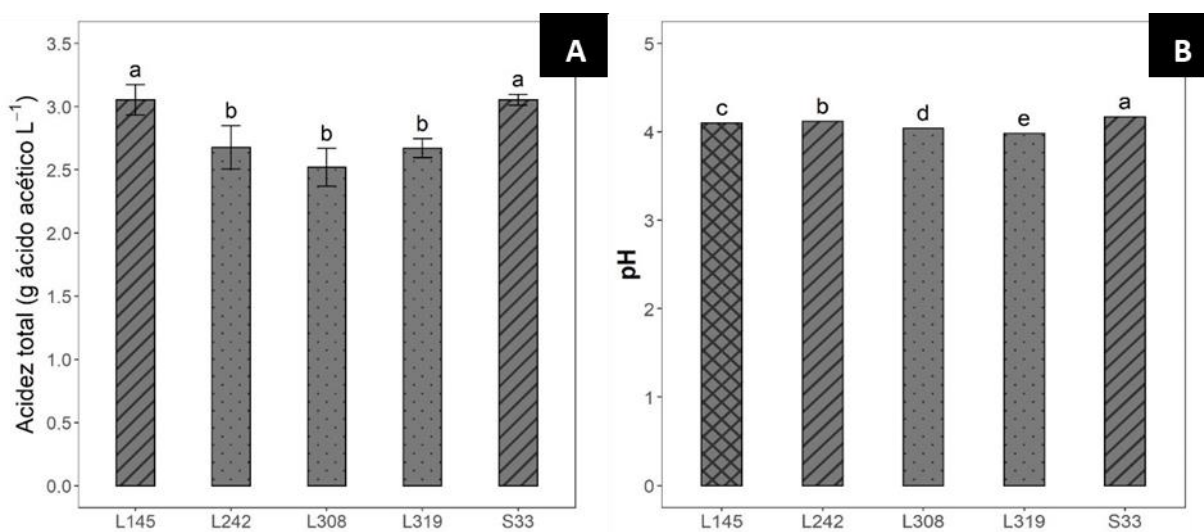


Figura 3. (A) Parâmetros de acidez total titulável (g ácido acético/L) e (B) pH das cervejas elaboradas com as diferentes leveduras.

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

Os valores obtidos para teor alcoólico e extrato aparente ($^{\circ}$ P) nas cervejas (Figura 4), apresentaram-se dentro do esperado em função dos testes fermentativos e do perfil de fermentabilidade de cada linhagem apresentados no Capítulo 1. A cerveja elaborada com a cepa L-242 apresentou maior teor alcoólico e menor extrato aparente, sendo que as demais linhagens apresentaram valores semelhantes aos da cerveja produzida com a cepa referência

S-33. De acordo com o *Beer Judge Certification Program – BJCP*, as cervejas do estilo *American Blonde Ale* podem apresentar variação de ABV: 3.8 – 5.5%, o que condiz com os resultados encontrados nas cervejas produzidas com as diferentes linhagens isoladas.

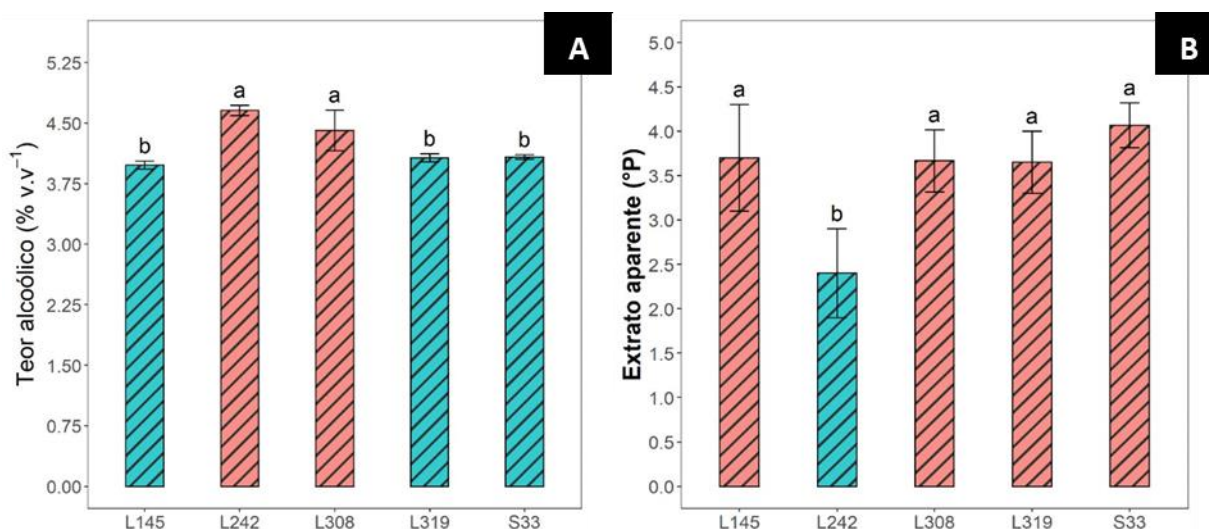


Figura 4. Parâmetros de (A) teor alcoólico (% v/v) e (B) extrato aparente (°P) das cervejas elaboradas com as diferentes leveduras.

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

Na receita base desse trabalho, a densidade relativa inicial foi de 1.046 e a densidade final das cervejas variou de 1.007 a 1.013 g/cm^3 . De acordo com *Beer Judge Certification Program*, as cervejas do estilo *American Blonde Ale* podem apresentar densidade original (OG) inicial entre 1.038 e 1.054 g/cm^3 , já no caso da densidade relativa final (FG) o esperado para esse estilo de cerveja é de: 1.008 – 1.013 g/cm^3 , o que condiz com os resultados encontrados nas cervejas produzidas com as diferentes linhagens isoladas. Cervejas Blonde Ale analisadas por VIANA et al. (2016) apresentaram densidade de 1.011 a 1.014 g/cm^3 . Segundo Mcneil & Harvey 2008, as leveduras consomem os açúcares simples disponíveis no mosto, produzindo álcool e gás carbônico (CO_2), diminuindo assim a concentração de açúcares disponíveis no mosto e conseqüentemente a densidade do mesmo, como é possível observar no Figura 5 através da curva da evolução da densidade relativa ao longo da fermentação.

De acordo com a Figura 5 é possível observar, ainda, o perfil de atenuação das cervejas, a cepa L242 apresentou a maior taxa de atenuação, o que está correlacionado com o resultado apresentado na Figura 4, na qual a linhagem L242, também, apresentou a maior produção de etanol. Durante a fermentação os açúcares do mosto são convertidos

principalmente em etanol e gás carbônico, e a densidade específica (g/cm^3) diminui progressivamente ao longo do tempo, até um limite de atenuação; o que implica diretamente no teor alcoólico final apresentado pela cerveja (BRIGGS et al., 2014).

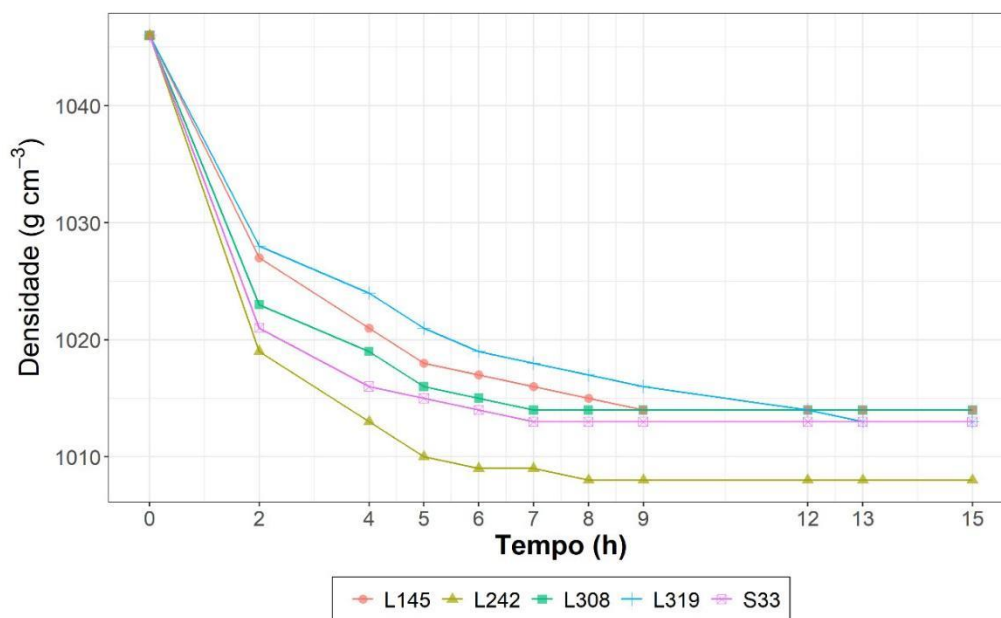


Figura 5. Evolução da densidade relativa (OG) (g/cm^3) ao longo da fermentação das cervejas elaboradas com as diferentes linhagens.

As cervejas produzidas neste estudo, apresentaram amargor com pequena variação entre as diferentes cepas de leveduras utilizadas. A faixa de IBU das cervejas foi de 11 – 14 IBU (Figura 6), valores abaixo do esperado de acordo com o *Beer Judge Certification Program – BJCP* para cervejas do estilo *American Blode Ale* que fica entre IBUs: 15 – 28. Este resultado pode estar relacionado à degradação oxidativa dos compostos de amargor que podem ocorrer durante a fervura (HASHIMOTO et al., 1979; VANDERHAEGEN, 2006) ou apenas ao fato da quantidade de lúpulo adicionada na receita ter sido baixa, decisão proposital realizada pela pesquisadora responsável pela pesquisa com o intuito de deixar a cerveja neutra e ressaltar os aromas provenientes das leveduras.

O comportamento natural da medida de amargor das cervejas ao longo do tempo é diminuir, pois ocorre a degradação dos iso- α -ácidos, que é uma das moléculas responsáveis pelo amargor do lúpulo e isomerizadas durante a fervura (VANDERHAEGEN, 2006). A análise de amargor por espectrofotometria tem o objetivo de quantificar os compostos apolares presentes na cerveja, o que torna esta metodologia ideal para a avaliação de

compostos de amargor em cervejas com menor complexidade (EBC, 2004; SILVELLO, 2019).

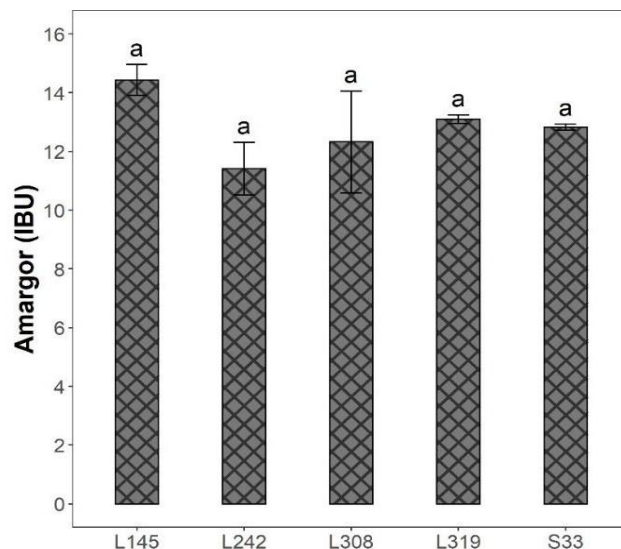


Figura 6. Amargor (IBU) das cervejas elaboradas com as diferentes leveduras.

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

2.3.2 Caracterização das cervejas por cromatografia

Os compostos voláteis produzidos nas diferentes cervejas foram analisados por cromatografia. A composição e quantificação de compostos voláteis nos produtos obtidos estão apresentadas na Tabela 3. Foi obtido um cromatograma contendo a sobreposição das cervejas produzidas com as leveduras brasileiras isoladas, e seus respectivos tempos de retenção referente à análise de álcoois e ésteres realizada por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) (Anexo I) e a outro cromatograma que apresenta a sobreposição e os tempos de retenção referente à análise de aldeídos e cetonas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV-visível (HPLC-UV-VIS) (Anexo H).

Tabela 6. Concentrações*(mg/L) e desvio padrão dos compostos voláteis determinados nas cervejas produzidas a partir de linhagens de levedura isoladas de processo de fermentação de cachaça

Compostos	Linhagens				
	S-33	308	145	242	319
Isoamilico	59,79 ^b ± 0,18	53,54 ^c ± 4,26	49,79 ^c ± 3,57	42,18 ^d ± 1,53	65,49 ^a ± 1,08
Isobutanol	12,16 ^c ± 0,22	17,25 ^b ± 0,82	16,80 ^b ± 1,65	12,03 ^c ± 1,24	22,23 ^a ± 4,70
N-propanol	10,15 ^b ± 1,41	10,50 ^b ± 0,63	9,28 ^b ± 0,32	8,61 ^b ± 1,36	14,55 ^a ± 2,14
2-feniletanol	46,23 ^a ± 2,10	35,80 ^b ± 3,20	29,38 ^c ± 5,29	28,89 ^c ± 0,67	32,34 ^{bc} ± 2,83
Alcoóis superiores	128,32 ^b ± 3,92	117,10 ^c ± 2,52	105,20 ^d ± 3,70	92,18 ^e ± 0,40	13,61 ^a ± 1,34
Acetaldeído	23,48 ^b ± 0,18	20,88 ^c ± 0,1	43,39 ^a ± 0,03	11,59 ^e ± 0,02	15,87 ^s ± 0,08
Formaldeído	<LQ	<LQ	0,01 ± 0,00	<LQ	<LQ
Acetona	0,15 ^b ± 0,01	0,14 ^{bc} ± 0,01	0,07 ^d ± 0,00	0,17 ^a ± 0,00	0,13 ^c ± 0,01
5-HMF	0,47 ^c ± 0,09	1,30 ^a ± 0,29	0,71 ^{bc} ± 0,00	1,05 ^{ab} ± 0,09	1,12 ^a ± 0,32
Furfural	1,17 ^b ± 0,09	1,19 ^b ± 0,08	0,71 ^c ± 0,06	0,76 ^c ± 0,07	1,35 ^a ± 0,06
Acetato de etila	17,32 ^{bc} ± 3,56	20,31 ^{ab} ± 0,26	21,98 ^a ± 0,33	15,12 ^c ± 2,11	21,96 ^a ± 2,47
Acetato de Isoamila	0,24 ^c ± 0,03	0,62 ^a ± 0,06	<LQ	0,30 ^c ± 0,05	0,49 ^b ± 0,01
Caproato de etila (Hexanoato de etila)	0,04 ± 0,16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Caprilato de etila (Octanoato de etila)	0,13 ± 0,00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Caprato de etila (Decanoato de etila)	0,05 ± 0,00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

* Níveis dos parâmetros obtidos pela média de duas amostras por cerveja produzida ± desvio padrão. <LQ = abaixo do limite de quantificação do método: álcoois e acetato de etila (<10mg/L); aldeídos (<0,1mg/L), acetato de isoamila (<1mg/L), demais ésteres (<0,5mg/L).

A produção de compostos aromáticos na cerveja é influenciada pela composição do mosto e pelo metabolismo da levedura sobre essa matriz. Os principais compostos ativos de sabor derivados de levedura são: etanol, gás carbônico, carbonilas (aldeídos/cetonas), álcoois superiores, ésteres, dicetonas vicinais (diacetil e pentanodiona), ácidos graxos e orgânicos e compostos de enxofre (LODOLO et al, 2008). Neste sentido os subprodutos mais importantes do metabolismo da levedura e, portanto, relacionados diretamente à qualidade da cerveja, são os álcoois superiores, ésteres, ácidos e aldeídos (POSTIGO et al, 2021).

Além dos parâmetros descritos na Tabela 3, foram realizadas análises de diversos compostos voláteis, sendo estes: amílico, metanol, álcool sec-butílico, álcool n-butílico, 2,3butanediol, acroleína, lactato de etila, octanoato de isoamila, butirato de etila, nanoato de etila, laurato de etila, miristato de etila, palmitato de etila, siringaldeído, sinapaldeído,

coniferaldeído, benzaldeído, butiraldeído, crotonaldeído, propionaldeído, valeraldeído, isovaleraldeído acetofenona. No entanto, os níveis destes parâmetros, em todas as amostras, ficaram abaixo dos limites de quantificação (LQ) do método ou não foram dequitados (ND).

As cervejas produzidas com as leveduras S-33 (Referencia) e L-145 apresentaram concentrações de acetaldeído de 23,48 e 43,99 mg/L (Figura 7) respectivamente, valores acima do limiar de percepção (10-20 mg/L) descrito por Meilgaard (1975). O acetaldeído é o principal aldeído presente nas cervejas, sendo formado durante a preparação do mosto (reações de Maillard e oxidação) e, também, como parte das vias anabólicas e catabólicas na formação do álcool durante a fermentação (LODOLO et al., 2008). Wang et al. (2013), testou o desenvolvimento de leveduras obtidas por técnicas de melhoramento genético que fossem capazes de produzir menores concentrações de acetaldeído, pois altas concentrações de acetaldeído são uma preocupação da indústria. No trabalho, as cepas mutantes produziram menor quantidade de acetaldeído (10,21–16,53 mg/l), resultado que corrobora com o observado nas cervejas produzidas neste estudo, pelas linhagens L319 e L242 que apresentaram baixa produção de acetaldeído (15,87 e 11,59 mg/l), demonstrando potencial de utilização pela indústria cervejeira.

A concentração de acetato de etila nas cervejas produzidas com as leveduras S-33 e L-242 manteve-se abaixo (entre 17,32 e 15,12 mg/L) do limiar de percepção equivalente a 20 mg/L (MEILGAARD, 1975). Os ésteres são compostos químicos derivados de um ácido carboxílico e um álcool, e são de grande interesse industrial por apresentarem limiares de percepção sensoriais muito baixos e por definirem o aroma frutado da cerveja (BUDRONI et al., 2018). As outras amostras de cerveja não apresentaram diferença estatística nesse parâmetro (Figura 7 B).

Para cada estilo de cerveja é esperado uma concentração diferente dos compostos químicos, e conseqüentemente dos compostos aromáticos que serão perceptíveis. Para cervejas *ales* um caráter frutado é desejável, enquanto para *lagers* normalmente não (PIRES et al., 2014). Cepas de leveduras *S. cerevisiae* (linhagens ale) produzem mais ésteres que cepas de *S. pastorianus* (linhagens lager), principalmente acetato de isoamila (YU et al., 2012).

O acetato de isoamila também é um importante éster presente nas cervejas, sendo responsável pelo aroma de banana e pera (PIRES et al., 2014). Dentre as amostras de cerveja analisadas apenas a L-145 não apresentou acetato de isoamila (valores <LD), as demais amostras obtiveram valores baixos entre 0,24 – 0,62 mg/L. Os valores obtidos para as cervejas mostram que existe diferença estatística entre as amostras (Figura 7 C). De acordo com

Meilgaard (1975) o acetato de isoamila pode apresentar uma variação de concentração de 0,3 - 3,8 mg/L e tem seu limiar de percepção de em média 1,2 mg/L, o que corrobora com os valores encontrados nas cervejas produzidas neste trabalho.

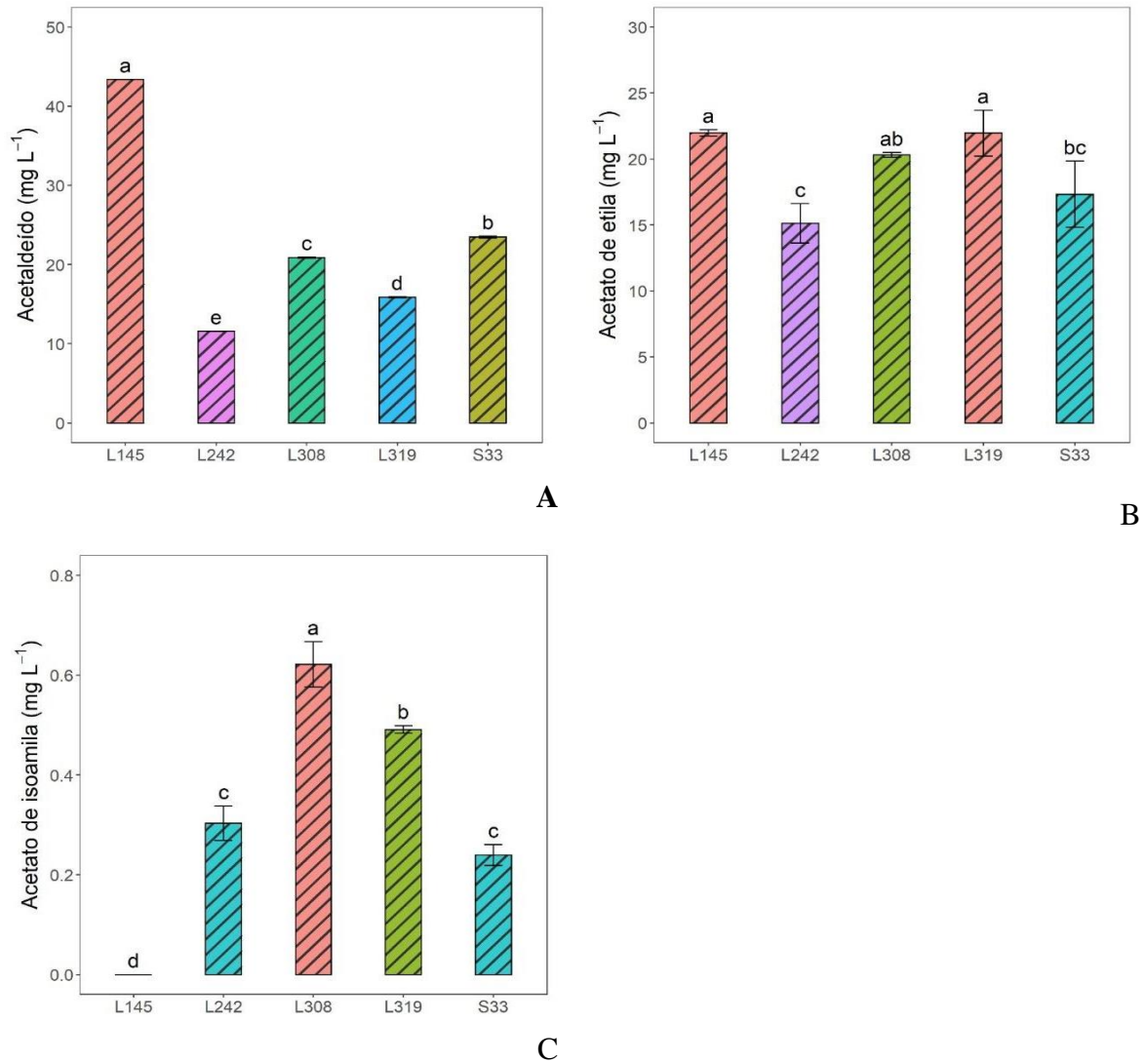


Figura 7. Compostos voláteis (mg/L) das cervejas produzidas com as diferentes leveduras. Comparação das cervejas para as linhagens quanto ao: (a) acetaldeído; (b) acetato de etila e (c) acetato de isoamila

*Letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Os ésteres normalmente apresentam um baixo limiar de percepção em cervejas, podendo, desta forma, influenciar consideravelmente a qualidade sensorial da bebida. O limiar de percepção para o hexanoato de etila é de 0,2 mg/L, para o octanoato de etila é de 0,9 mg/L e para o decanoato de etila de 0,13 mg/L. A amostra controle S-33 foi única que apresentou valores acima do limite de detecção (LD) para os ésteres hexanoato de etila com 0,16 mg/L (aroma de maçã e frutado), octanoato de etila com 0,13 mg/L (aroma de frutas

ácidas) e decanoato de etila 0,05 mg/L (nota floral) (MEILGAARD, 1975; PIRES et al., 2014; SAERENS et al., 2008; SAERENS et al., 2010; STEWART, 2017;).

Os álcoois superiores encontrados nesse estudo foram: n-propanol, isobutanol, isoamílico e 2-feniletanol conforme apresentado na Tabela 3, sendo considerados os principais compostos voláteis, responsáveis pelos aromas e sabores, presentes em cervejas (BOULTON; QUAIN, 2001; BUDRONI, et al. 2018; PIRES et al., 2014; STEWART, 2017). Abaixo de 300 mg/L esses compostos adicionam complexidade à cerveja, conferindo notas florais, com sensação de refrescância. Pelo contrário, acima dessas concentrações, tendem a contribuir negativamente, impactando o produto com notas de solvente (BUDRONI, et al 2018). As concentrações de álcoois superiores nas amostras de cervejas produzidas com linhagens selecionadas (Figura 8A) corroboram com valores observados por Boulton & Quain (2001) (100 e 200 mg/L) para os diferentes tipos de cervejas, o que indica conformidade com resultados esperados, exceto para a linhagem L-242, que apresentou uma concentração de 92,18 mg/L abaixo do normal, o que relaciona o tipo de linhagem de levedura à variação destes compostos voláteis.

A cerveja produzida com a levedura L-319 apresentou as maiores concentrações de álcool isoamílico e, conseqüentemente, o que influenciou diretamente em maiores concentrações de álcoois superiores (Tabela 3). O álcool isoamílico é o composto quantitativamente mais importante para o sabor dentre os álcoois superiores pois influencia diretamente na formação do corpo (estrutura em boca) da cerveja, deixando a cerveja mais densa conforme a maior concentração de álcool isoamílico presente na cerveja (OLANIRAN. et al., 2017). O álcool isoamílico (Figura 8 B) foi detectado em concentrações equivalentes ao limiar de percepção descrito por Pires et al. 2014 (50-65 mg/L) para todas as cervejas produzidas com as diferentes linhagens isoladas. A presença do álcool isoamílico em cervejas está diretamente ligada a produção de compostos aromáticos por parte das leveduras, sendo responsável pelo sabor adocicado e os aromas alcoólicos e de banana presentes nas cervejas (PIRES et al., 2014).

As concentrações de n-propanol (Figura 8 C) para as diferentes cervejas variaram de 8,61 a 14,55 mg/L, ficando consideravelmente abaixo do limiar de percepção de 600 mg/L (MEILGAARD, 1975), porém dentro da faixa de concentração descrita por Pires et al. (2014) que foi de 4-17 mg/L.

Os valores de isobutanol das cervejas apresentaram pouca variação conforme observado (Figura 8 D) com valores entre 12,03 – 22,23 mg/L, novamente apresentando valores significativamente menores que o limite de percepção (100 mg/L) relatados por

Meilgaard (1975). Porém os resultados corroboram com Bortoleto; Gomes (2016), que estudaram a concentração dos compostos voláteis em cervejas artesanais de diferentes estilos e marcas e demonstram que as cervejas do tipo *ale* apresentam valores de isobutanol em torno de 22 mg/L. O isobutanol pode trazer um efeito indesejável na qualidade da cerveja, pois traz a impressão aromática referente à solvente para a bebida final (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Com relação ao 2-feniletanol, a amostra controle S-33 apresentou valor de 46,23 mg/L, acima do limite de percepção (40mg/L) descrito por Meilgaard (1975). Este composto é responsável por características organolépticas que traz para cerveja aromas de rosas, perfume e adocicado (OLANIRAN et al., 2017). As cervejas produzidas com as cepas selecionadas diferem estatisticamente da cerveja obtida com a cepa Referência (Figura 8 E).

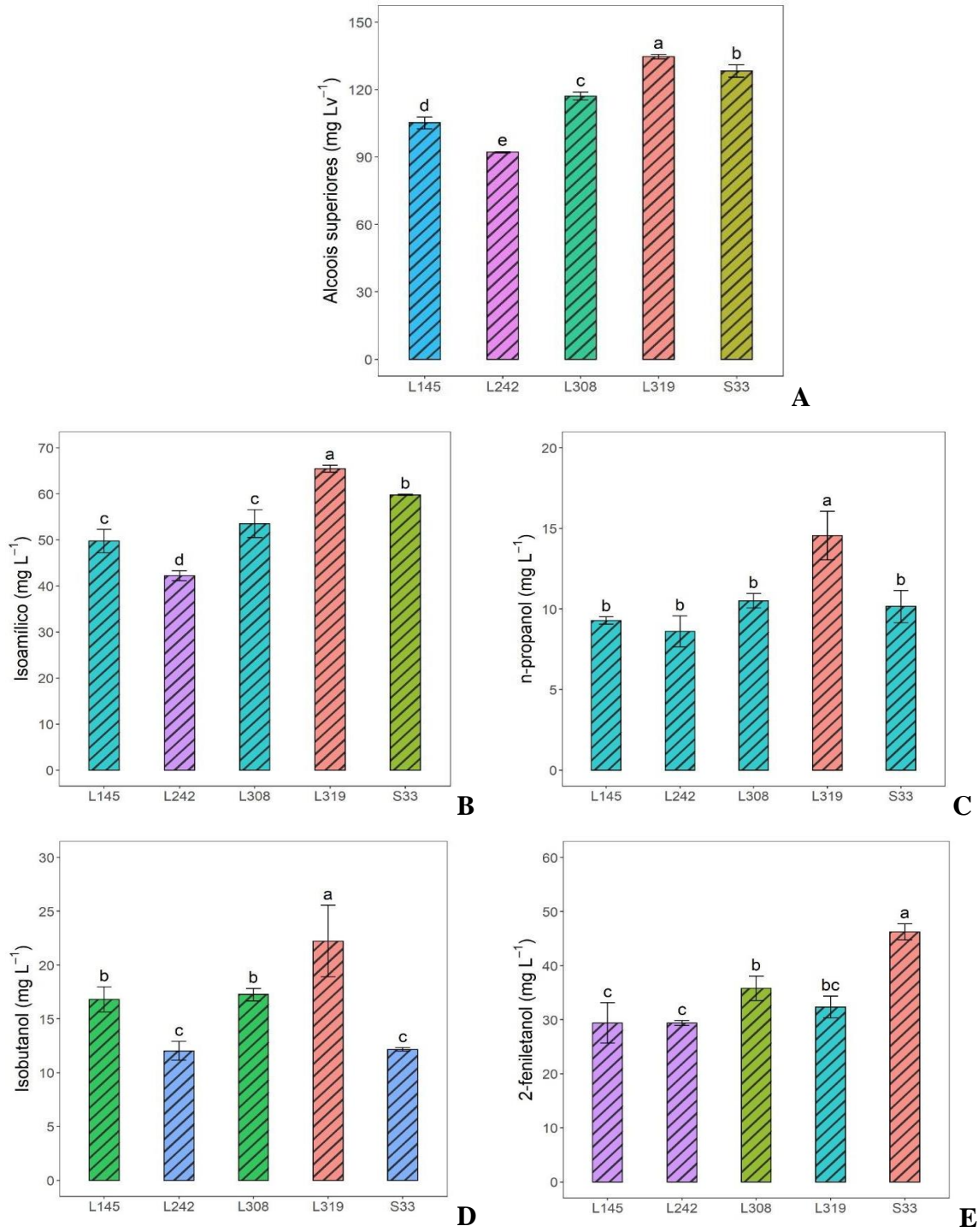


Figura 8. Compostos voláteis (mg/L) das cervejas produzidas com as diferentes leveduras. Comparação das cervejas para as linhagens quanto ao: (A) álcoois superiore; (B) álcool isoamilico; (C) n-propanol, (D) isobutanol e (E) 2-feniletanol.

*Letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$)

Na Figura 9 estão apresentados os valores comparativos para acetona, furfural e 5-HMF produzidos pelas cervejas.

De acordo com Kepner et al. (1963), o nível de concentração da acetona nas cervejas costuma ser baixo e de difícil detecção no produto. As cervejas produzidas com diferentes linhagens selecionadas, apresentaram valores menores que 0,17mg/L, a baixa concentração deste composto demonstra que possivelmente as cervejas não apresentam aromas alterantes (*off-flavors*).

O furfural e o 5-HMF, embora geralmente possuam limites de percepção baixos, eles são mencionados como indicadores de deterioração do sabor da cerveja. Curiosamente, uma correlação é encontrada entre o aumento desses compostos e a percepção sensorial de envelhecido ou “velho”, portanto, esses compostos podem ser usados como indicadores de danos ao sabor e aroma da cerveja (SHIMIZU et al., 2001; VANDERHAEGEN, 2006). Os resultados obtidos para esses compostos com as cervejas produzidas com linhagens selecionadas de leveduras mostram que tanto as concentrações de 5-HMF (0,47 – 1,30 mg/L) quanto as de furfural (0,71 – 1,34 mg/L) apresentaram valores baixos o que condiz com estudo realizado para controlar os níveis de 5-HMF e furfural realizado por Shimizu et al. (2001) que mostrou que oxidação e pH baixo em cervejas podem aumentar a formação de desses compostos durante o armazenamento, corroborando com o valor de pH 4,0 das amostras descrito no item 4.1. deste artigo. Isso sugere que o controle da formação de 5-HMF e furfural durante a fermentação pode auxiliar na estabilidade da cerveja. Outros fatores que podem influenciar a formação desses compostos é oxidação durante a mosturação e a seleção de cepas de levedura com maior volume celular. O tamanho das células de levedura se correlaciona com os níveis de pH da cerveja, sendo assim, o uso de levedura com um tamanho de célula maior resulta em um nível de pH mais alto na cerveja e, conseqüentemente, um nível mais baixo de furfural e 5-HMF (SHIMIZU et al., 2001).

Todas as cervejas foram produzidas nas mesmas condições, sendo assim, é possível observar que as diferenças apresentadas são atribuídas às linhagens de levedura utilizadas no processo de produção. Isso demonstra a importância da levedura que será utilizada no processo e permite ao cervejeiro direcionar a escolha da levedura de acordo com os atributos que podem incorporar à cerveja as características que se deseja encontrar no produto, de acordo com o estilo, aromas e sabores esperados.

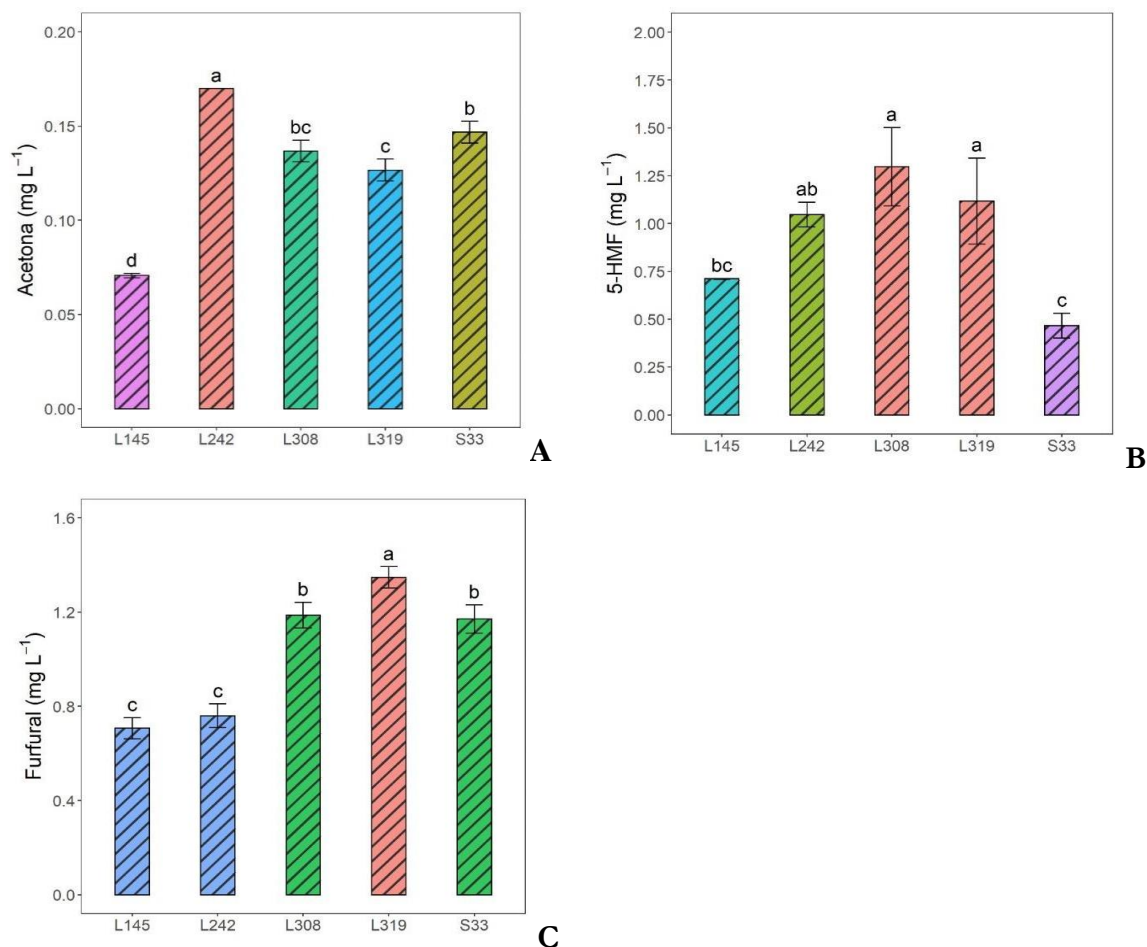


Figura 9 - Compostos voláteis (mg/L) das cervejas produzidas com as diferentes leveduras. Comparação das cervejas para as linhagens quanto ao: (a) acetona; (b) 5-HMF; (c) Furfural.

*Letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$).

2.3.3 Análise sensorial das cervejas

Com a análise sensorial das cervejas foi possível elencar e quantificar os elementos de percepção relacionados aos aspectos visual, olfativo e gustativo das bebidas elaboradas com as diferentes linhagens de levedura selecionadas. A avaliação sensorial foi realizada para com o intuito de determinar as principais características de qualidade relacionadas ao perfil organoléptico e para verificar possíveis diferenças sensoriais existentes entre as cervejas artesanais produzidas a partir da fermentação utilizando as linhagens selecionadas do processo de produção de cachaça.

No levantamento de atributos durante a análise sensorial utilizando a metodologia *Ultraflash Profiling* foram obtidos mais de 150 termos pela equipe de avaliadores. Esses termos foram analisados e agrupados em 31 termos finais através do mapeamento por frequência utilizando uma nuvem de palavras como representação gráfica (Figura 11).

Através da nuvem de palavras é possível observar todos a lista de atributos e a frequência de citações, que é observada através da dimensão das palavras dentro da composição gráfica da nuvem. Dos atributos apresentados na Figura 11 foram considerados para a análise de componentes principais (ACP) somente os atributos que aparecem nas descrições de pelo menos 5% dos provadores. Estes termos foram agrupados em 11 atributos. Os descritores selecionados foram: especiarias, amargor, frutado, maltado, adocicado, floral, carbonatado, corpo, fermentação, fenólico e off-flavour.

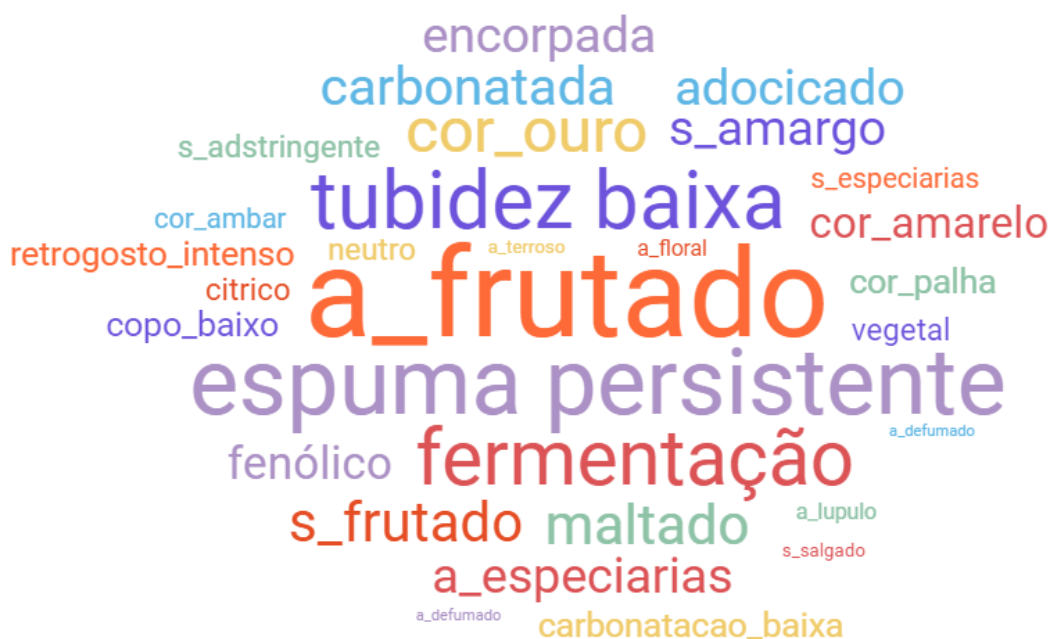


Figura 11. Nuvens de palavras originadas do mapeamento dos atributos sensoriais levantados pela equipe de avaliadores.

A Figura 12 apresenta o agrupamento das amostras, baseado nas similaridades e diferenças entre as amostras, combinado, com apresentação dos termos descritivos levantados pelos avaliadores. O gráfico da análise multivariada explica 65,5 % da variância total entre as 5 amostras de cerveja artesanal foi explicada pelas duas primeiras dimensões fatoriais.

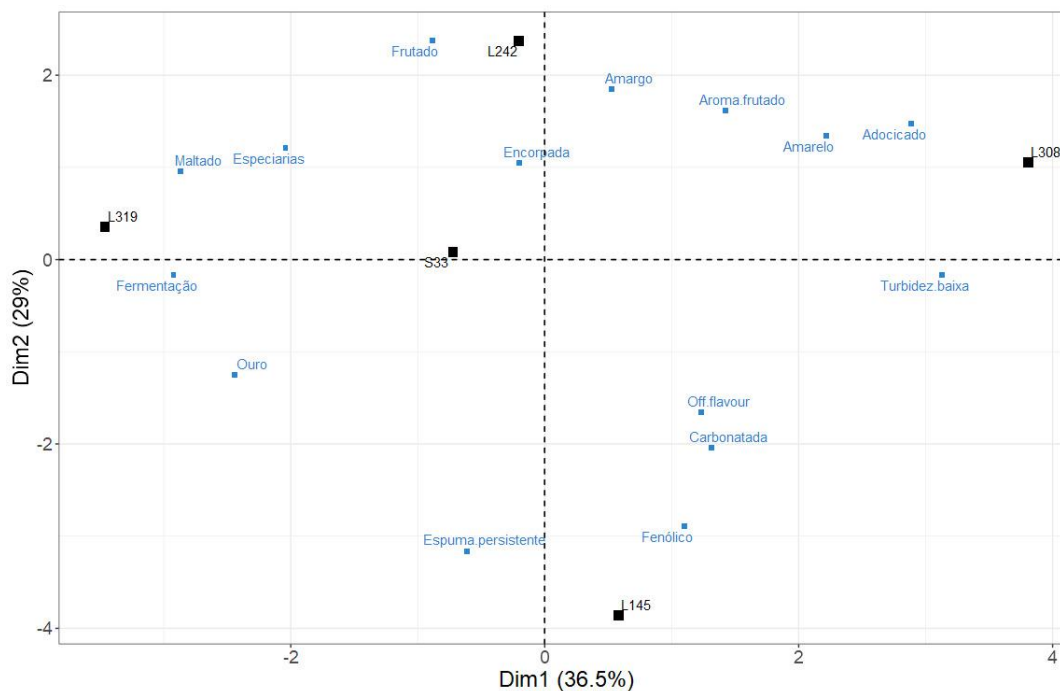


Figura 12. Representação da análise de componentes principais de cervejas produzidas com diferentes linhagens de leveduras.

Resultados gerados pela ACP sobre os resultados de *Napping* (mapeamento projetivo) e *Ultra Flash Profile* (descrição dos atributos realizado pelos avaliadores) nas dimensões 1 e 2. Cepas isoladas a partir de fermentação de caldo de cana em produção de cachaça: *S. cerevisiae* L145, L242, L308 e L319. Cepa comercial *S. cerevisiae* S-33 (Fermentis).

Analisando as dimensões 1 e 2 (Figura 12) observa-se que as amostras de cervejas produzidas no presente trabalho encontram-se distribuídas em lados opostos ao da cerveja produzida com a levedura comercial, que se encontra no centro das duas dimensões ou seja, foram consideradas diferentes pelos avaliadores, porém, L242 e L319, ficaram localizadas no mesmo quadrante direito superior que a levedura comercial S33, indicando que os provadores identificaram alguma semelhança entre as amostras e evidenciando que há diferenças sensoriais perceptíveis dessa amostras quando comparadas com a cerveja L308 e L145.

Os perfis de sabor únicos da cerveja podem ser atribuídos em grande parte às atividades bioquímicas dentro da célula de levedura durante a fermentação (LODOLO et al., 2008). Nesta etapa, muitos compostos voláteis e fenólicos são produzidos, estes compostos são responsáveis por diversas características organolépticas da cerveja e possuem o potencial de conferir identidade às cervejas artesanais brasileiras. Quanto ao perfil aromático, observa-se uma clara distinção entre todas as amostras. A amostra L145, foi explicada, pelos descritores “fenólico”, “espuma persistente”, “carbonatada” e “off-flavour”. A amostra L308, por outro lado, foi explicada pelos descritores “adocicado” e “turbidez baixa” “amarelo”

“aroma frutado” e “amargo”. As cervejas L242, L319 e a cerveja produzida com levedura comercial, apresentaram perfil semelhante, sendo explicadas e agrupadas pelos atributos “frutado”, “encorpada”, “especiarias e “maltado”.

Na cerveja, a produção de compostos ativos de sabor é estritamente dependente da cepa (CALLEJO et al, 2019). Assim, a escolha das linhagens de levedura utilizadas na produção de cerveja é essencial para a obtenção de produtos com propriedades sensoriais desejáveis e diferenciadas (IORIZZO et al., 2021).

A presença do acetaldeído acima do limite de percepção resulta em sabores desagradáveis, associados a descritores vegetais, como “grama” (MEILGAARD, 1975). Fator que corrobora e explica a presença desses descritores na avaliação sensorial, pois na avaliação química das cervejas a concentração de acetaldeído encontrada ficou, em média, 65% acima do limiar de percepção humana (10-20mg/L).

Os ésteres são principais compostos químicos responsáveis pelo aroma das cervejas, são mais de 100 ésteres diferentes que resultam nos mais variados sabores e aromas nas cervejas. Alguns dos principais ésteres que afetam o sabor da cerveja são: acetato de etila (frutado/solvente), acetato de isoamila (banana) e caproato de etila (maçã/anis) (MEILGAARD, 1975; LODOLO et al., 2008). As cervejas L308 e L242 apresentaram correlação com o descritor “frutado”, corroborando com os maiores valores apresentados na análise química para o composto acetato de etila e acetato de isoamila. Os aromas de “maçã” e “anis” não foram perceptíveis para os provadores, assim como o caproato de etila não foi identificado na análise química das cepas estudadas. A presença do descritor “solvente”, não condiz com os resultados químicos, pois de acordo com Budroni et al. (2018) os aromas de “solvente” só seriam perceptíveis caso a concentração de álcoois superiores das amostras estivesse acima de 300 mg/L.

De acordo com o observado na Tabela 4, existe diferença numérica nas notas das cervejas produzidas com as leveduras brasileiras isoladas neste estudo em relação à cerveja produzida com a levedura comercial, indicando maior aceitação por parte dos provadores e, possivelmente, indicando um incremento e um diferencial na qualidade sensorial. A amostra L308 recebeu a nota média de (6,95) na escala de nove pontos, enquanto a cerveja produzida com a levedura comercial apresentou a menor nota (5,84).

Tabela 4. Avaliação global das notas no teste hedônico de preferência das amostras de cervejas produzidas com leveduras brasileiras isoladas

Linhagem utilizada na produção da cerveja	Nota ± DP
S-33	5,84 ± 1,80
L308	6,95 ± 1,96
L145	6,11 ± 1,91
L242	6,32 ± 2,21
L319	6,32 ± 1,86

(DP) desvio padrão

Observa-se, portanto, que os provadores não conseguiram identificar diferenças notáveis entre as amostras, o que permite inferir que as leveduras brasileiras isoladas nesse estudo quando utilizadas para produzir cervejas do estilo *American Blonde Ale*, carregaram para a cerveja características organolépticas semelhantes a uma cepa convencional cervejeira.

Através das diferentes análises sensoriais empregadas no estudo foi possível identificar as semelhanças e diferenças entre as cervejas produzidas e compreender como as leveduras influenciam no perfil organoléptico de cervejas especiais. As cervejas produzidas com leveduras brasileiras isoladas do processo de fermentação espontânea de cachaça apresentaram uma avaliação global superior à cerveja produzida com levedura comercial, comprovando o potencial sensorial e econômico da utilização de novas linhagens de leveduras brasileiras no processo de produção de cerveja artesanal.

2.4 Conclusões

Este estudo não só propiciou visão geral das leveduras *Saccharomyces* utilizadas, geralmente, na produção de cerveja, mas também trouxe perspectivas futuras de como a pesquisa biotecnológica pode oferecer ao aprimoramento da cerveja artesanal brasileira. O fenômeno da microcervejaria (revolução artesanal) e a crescente demanda por cervejas especiais tem estimulado pesquisadores e cervejeiros a selecionar novas linhagens de leveduras que possuam propriedades metabólicas específicas. Esse estudo comprova, em particular, que a utilização de leveduras brasileiras pode permitir o desenvolvimento de produtos inovadores, acompanhando as novas tendências do mercado para responder às exigências dos consumidores.

Em conclusão, este estudo mostrou claramente a importância da comunidade microbiana, química da cerveja e características sensoriais na produção de cervejas artesanais. Também descobrimos que as características iniciais da cerveja e o tipo de levedura são

fatores-chave na determinação do perfil químico do produto. Considerando que este estudo aumenta nossa compreensão sobre a seleção de leveduras de bioprocessos na produção de cervejas artesanais, pesquisas mais aprofundadas testando o comportamento das linhagens isoladas em outros estilos de cerveja são necessárias para confirmar as observações feitas neste estudo, bem como obter mais informações sobre as características comportamentais tecnológicas das linhagens brasileiras e os efeitos resultantes na química da cerveja e nas características sensoriais.

Referências

- ALBERTIN, W.; MARULLO, P.; AIGLE, M. et al. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2772-2784, 2011.
- AQUINO, A. J. **Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosidases para liberação de aroma na produção de aguardente de cana**. 74p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013
- ARAÚJO, F.B.; SILVA, P.H.A.; MINIM, V.P.R. **Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, n. 2, p. 121 – 128, 2003
- ARAÚJO, T.M. **Caracterização bioquímica-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 2013. 95p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.
- BAMFORTH, C.W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2003. 246 p.
- BASSO, T.O. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. doi:10.11606/T.87.2011.tde-14092011-153623.
- BING, J.; HAN, P.J.; LIU, W.Q. et al. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast.” **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R380-1, 2014. doi:10.1016/j.cub.2014.04.031
- BJCP - BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. **2015 Style guidelines**. Disponível em: <<http://www.bjcp.org/stylecenter.php>> Acesso em 02 ago. 2018.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. *Brewing Yeast e Fermentation*. Blackwell Publishing. p. 46-48, 108-148.2001.
- BUDRONI, M.; ZARA, G.; CIANI, M.; COMITINI, F. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts. In: **Brewing Technology**. p. 267–322. 2018. DOI:10.5772/intechopen.68792
- 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.

- BORTOLETO; G.G.; GOMES, W.P.C. Determinação de compostos orgânicos voláteis em cervejas artesanais por cromatografia gasosa e amostragem por headspace. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 21, 2016.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Oxford: Blackwell Science, 2001. 646 p.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 jun. 2005. Seção I, p. 3.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 04 de julho de 2009. Regulamenta a Lei nº8.918, de 14 de junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**, Brasília, 04 Jun. 2009.
- CALLEJO, M.J.; GARCÍA NAVAS, J.J.; ALBA, R. et al. Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. **European Food Research Technology**, v. 245, p. 1229–1238, 2019.
- CHRISTOFOLETI-FURLAN, R.M.; PORTUGAL, C.B.; VARIZE, C.S. et al. Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel starters for high-gravity brewing. **Food Research International**, v. 135, 2020.
- CLAPPERTON, J.F.; DALGLIESH, C.E.; MEILGAARD, M.C. Progress towards an international system of beer flavour terminology. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 1, p. 7-13, 1976. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03715.x>
- CUBILLOS, F.A.; GIBSON, B.; GRIJALVA-VALLEJOS, N. et al. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 383–398, 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- DREDGE, M. **Craft Beer World: A guide to over 350 of the finest beers known to man**. New York: 325p.
- EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. **Analytica-EBC: Method 8.5** revised Oct. 2000. London: Elsevier, 1963. 78 p.
- EBC- EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC: Method 9.8**. revised Oct. 2004. London: Elsevier, 1963. 59 p.
- FAVARO, L.; JANSEN, T.; VAN ZYL, W.H. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: The case of bioethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 800–816, 2019. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1619157>.
- FAY, J.C.; BENAVIDES, J.A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae* **PLoS Genetics** 1 (1): e5. doi:10.1371/journal.pgen.0010005. 2005.
- GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T. et al. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts, **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397-1410.e16, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.
- GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. **Economic perspectives on craft beer: A revolution in the global beer industry**. 2017.

- GIBSON, B.; GEERTMAN, J.A.; HITTINGER, C.T. et al. New yeasts-new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 4, 2017. doi: 10.1093/femsyr/fox038.
- GUYOT-DECLERCK, C.; FRAN, N.; RITTER, C. et al. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 2, p. 157–162, 2005. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2004.04.007>.
- HASHIMOTO, N.; SHIMAZU, T.; ESHIMA, T. Oxidative degradation of isohumulones in relation to beer flavor. **Report of the Research Laboratory of the Kirin Brewery Company**, v. 22, p. 1 – 10, 1979.
- IORIZZO, M. et al. Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. **Processes**, v. 9, n. 5, p. 1–16, 2021.
- KEPNER, R.E.; STRATING, J.; WEURMAN, C. Quantitative determination of esters in beer by gas chromatographic analysis of head space vapours. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 69, p. 399-405, 1963. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1963.tb01946.x>
- KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 2004. 946p.
- LIBKIND, D.; CHRIS TODD HITTINGER, C.T.; VALERIO, E. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the USA**, v. 108, n. 35, p. 14539–14544, 2011. doi: 10.1073/pnas.1105430108
- LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.F.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Anuário da Cerveja 2020. Report: 2021
- MEADEN, P.G.; TAYLOR, N.R. Cloning of a yeast gene which causes phenolic off-flavours in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 97, p. 353–357. 1991.
- MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Practical Fermentation Technology**. 2008. 388p.
- MEILGAARD, M. C. Flavour chemistry of beer. part I: flavour interaction between principal volatiles. **Master Brewers Association of the Americas- Technical Quarterly (MBAA TQ)**, v. 12, n. 2, p 107-117, 1975
- OLANIRAN, A.O.; HIRALAL, L. MOKOENA, M.P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13–23, 2017.
- PAGÈS, J. Collection and analysis of perceived product inter-distances using multiple factor analysis: Application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 7, 2005.
- PINTO, F.O. **Isolamento, seleção e caracterização de leveduras selvagens com potencial para a produção de cerveja**. 95p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.
- PIRES, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; BRANYIK, T.; VICENTE, A.A. 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.
- POSTIGO, V.; GARCÍA, M.; CABELLOS, J.M.; ARROYO, T. Wine *Saccharomyces* yeasts for beer fermentation. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 290. (2021). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040290>

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

SILVA-FILHO, C. H. B. DA **Isolamento e identificação de leveduras saccharomyces cerevisiae de frutos de citrus × limonia com capacidade de fermentação de mosto cervejeiro**. 48p. Universidade federal de santa Catarina, 2019.

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

STEWART, G.G. **Brewing and Distilling Yeast**. Springer International Publishing. 2017. 422p.

SILVELLO, G.C.; BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A. R. The barrel aged beer wheel: a tool for sensory assessment. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 126, p. 382– 393. 2020. <https://doi.org/10.1002/jib.626>.

SILVELLO, G.C. **Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-23052019-170957>

SHIMIZU, C.; NAKAMURA, Y.; MIYAI, K. et al. Factors affecting 5-hydroxymethyl furfural formation and stale flavor formation in beer, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n. 2, p. 51-58, 2001.

SPIESS, S. **A cor da cerveja**. O caneco, 2016. Disponível em: < <https://www.ocaneco.com.br/cor-da-cerveja/> > Acesso em: Out. 2021.

VANDERHAEGEN, B. et al. The chemistry of beer aging - A critical review. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 357–381, 2006.

VIEIRA, D.D.; TRINDADE, L.C.A. DA; NUNES, S.L.D. **Desenvolvimento e caracterização de cerveja artesanal estilo Ale Blond com adição de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais. p. 50, 2016.

WANG, S.S.; THORNTON, K.; KUHN, A.M.; NADEAU, J.G. E HELLYER, T.J. Homogeneous Real-Time Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms by Strand Displacement Amplification on the BD ProbeTec ET System. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1599-1607, 2003.

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

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

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**, 2.ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ/USP, 1996. 194p.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os resultados obtidos permitem concluir que é possível selecionar leveduras capazes de imprimir características e perfis sensoriais adequados para a produção de cervejas.
- A metodologia utilizada para a seleção de leveduras permitiu a obtenção de 48 isolados de leveduras provenientes de processos de fermentação espontânea de cachaça e com potencial para a produção de cerveja.
- A partir da análise de tipificação genética empregada neste estudo foi possível discriminar facilmente diferentes padrões genéticos de polimorfismo entre os isolados e diferenciar linhagens da espécie *S. cerevisiae*.
- Os testes de exclusão foram adequados para a seleção de leveduras com características desejadas, resultando em seis linhagens isoladas e avaliadas que exibiram potencial para a produção de cervejas de boa qualidade.
- A caracterização fisiotecnológica empregada neste estudo permitiu a seleção e avaliação de quatro leveduras para potencial aplicação na produção de cerveja.
- A análise sensorial das cervejas produzidas neste trabalho a partir de fermentações com diferentes leveduras isoladas revelou microrganismos com potencial para imprimir perfis organolépticos peculiares e de aplicação na indústria

ANEXOS

Anexo A

Parâmetros determinados nas cervejas elaboradas com as diferentes linhagens: teor alcoólico (% v/v); amargor (IBU); Cor (EBC); pH; Acidez total titulável (g/L); densidade relativa (OG) e extrato aparente (°P).

Linhagem	Teor alcoólico (% v/v)	Amargor (IBU)	COR (EBC)	pH	Acidez total (g/ácido acético)	Densidade Relativa	Extrato aparente (°P)
S-33	4,11	13	10	4,17	3,10	1013	4,3
	4,08	13	10	4,17	3,01	1012	3,8
	4,05	13	10	4,17	3,05	1014	4,0
Média	4,08^b	13^a	10^a	4,17^a	3,05^a	1013	4,0^a
DV	0,03	0,13	0,21	0,00	0,04	1,00	0,25
308	4,41	11	10	4,04	2,52	1010	3,6
	4,66	14	10	4,04	2,37	1013	4,0
	4,16	12	10	4,04	2,67	1012	3,3
Média	4,41^a	12^a	10^a	4,04^d	2,52^b	1012	3,6^a
DV	0,25	1,24	0,18	0,00	0,15	1,53	0,35
319	4,12	13	10	3,98	2,59	1013	4,0
	4,07	13	10	3,98	2,67	1011	3,6
	4,02	13	10	3,98	2,74	1010	3,3
Média	4,07^b	13^a	10^a	3,98^e	2,67^b	1011	3,6^a
DV	0,05	0,12	0,10	0,00	0,07	1,53	0,35
145	4,03	14	10	4,10	3,17	1014	4,3
	3,98	14	10	4,10	3,05	1010	3,2
	3,93	15	10	4,10	2,93	1006	2,1
Média	3,98^b	14^a	10^a	4,10^c	3,05^a	1010	3,2^a
DV	0,05	0,56	0,24	0,00	0,12	4,00	1,10
242	4,65	12	10	4,12	2,68	1007	2,9
	4,59	11	10	4,12	2,85	1005	1,9
	4,72	11	10	4,12	2,50	1009	2,4
Média	4,65^a	11^a	10^a	4,12^b	2,68^b	1007	2,4^b
DV	0,07	0,68	0,09	0,00	0,17	2,00	0,50

Letras iguais na coluna, para o mesmo parâmetro, indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$). DV = Desvio Padrão.

Anexo B

Ficha de avaliação sensorial 1

Olá,

Você irá receber 5 amostras de cerveja!

Elas devem ser avaliadas quanto às semelhanças e diferenças, de acordo com o seu próprio critério, já que não existem respostas certas ou erradas.

Por favor, posicione os copos na folha em branco à sua frente, onde as amostras que estiverem perto devem ser muito parecidas (de forma global) e as amostras distantes devem ser bem diferentes (de forma global). Sinta-se à vontade para utilizar toda a folha, da maneira que preferir.

Certifique-se de beber água antes e depois de provar cada amostra e de realizar a análise da esquerda para direita. Prove as amostras quantas vezes for necessário, na ordem que quiser.

Boa degustação!

Anexo C

Ficha de avaliação sensorial 2

Olá,

Por favor, anote o código de cada amostra na folha A3 onde o mesmo estiver localizado.

Em seguida, escreva ao lado de cada código, alguns termos que descrevam as características de cada amostra que você provou. Se quiser, pode utilizar a ficha Guia, as Rodas de Aromas e a tabela de cores para auxiliar sua descrição.

Você pode provar as amostras novamente, na ordem que preferir.

Boa degustação!

Anexo D

Ficha Guia de avaliação sensorial

Olá,

Seguem abaixo um guia com alguns aspectos que podem ser avaliados, considerados e descritos nesta análise sensorial.

- Aspecto VISUAL

- Cor
- Turbidez
- Espuma

- AROMAS

- Aspecto GUSTATIVO/SABOR

- Carbonatação
- Corpo

Anexo E

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética na Pesquisa (CEP) de aprovação das análises sensoriais desenvolvidas durante este projeto.

USP - ESCOLA SUPERIOR DE
AGRICULTURA "LUIZ DE
QUEIROZ" DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - ESALQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aplicação de novas linhagens de leveduras na inovação e desenvolvimento de cervejas especiais

Pesquisador: Lethicia Corniani

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46072921.3.0000.5395

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.806.264

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 25 de Junho de 2021

Assinado por:

CRISTIAN MARCELO VILLEGAS LOBOS
(Coordenador(a))

Anexo F**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você é nosso convidado para participar, de forma voluntária, da pesquisa **Aplicação de novas linhagens de leveduras na inovação e desenvolvimento de cervejas especiais**, de autoria das pesquisadoras Lethicia Suzigan Corniani, doutoranda do PPG-CTA e prof. Dra. Sandra Helena da Cruz do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP.

O objetivo desta pesquisa é utilizar linhagens de leveduras selecionadas de processos tradicionais de fermentação espontânea de cachaça para aplicação no processo de produção de cervejas especiais associado à inovação de processo e desenvolvimento de novos produtos.

Os procedimentos serão: Você participará de 1 sessão onde serão oferecidas 3 amostras, contendo 50 mililitros cada, de cerveja oriundas de fermentações com diferentes leveduras isoladas de processo de produção de cachaça. Todas as cervejas estarão padronizadas a 5% (v/v) de teor alcoólico. Os provadores devem agrupar as amostras quanto às similaridades e diferenças. Em seguida, deverão escolher atributos que descrevam a amostra provada. Devido às restrições de circulação por conta da pandemia do Covid, todos os procedimentos necessários serão tomados visando assegurar.

Os riscos relacionados a essa pesquisa existem, devido ao consumo de bebidas alcoólicas e serão minimizados, pois os participantes serão aconselhados a não consumir, ou seja, não deglutir o produto durante as sessões de análise sensorial, visto que nenhuma quantidade de etanol no sangue é permitida pela legislação nacional para a condução de veículos. Portanto, há riscos, mas podem ser minimizados se não houver a deglutição do produto. O benefício da pesquisa será a obtenção de resultados práticos e realistas que contribuam para o desenvolvimento de cervejas especiais associado à inovação de processo e desenvolvimento de novos produtos com qualidade sensorial superior.

A pesquisa será acompanhada integralmente pelo seu responsável, o qual garante total assistência ao sujeito durante a realização da pesquisa. Caso você necessite de esclarecimentos adicionais antes, durante ou após a participação nessa pesquisa, entre em contato com Lethícia, lethicia.corniani@usp.br, fone: (19) 3447-8678

Você poderá se recusar a participar desta pesquisa em qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer sanção ou penalidade. Fica garantido o sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam provocar constrangimentos ou prejuízos a você. Os resultados da pesquisa serão publicados e apresentados em reuniões científicas sem identificação dos voluntários.

Após a leitura deste TCLE e concordando com os itens apresentados, assine abaixo. Uma cópia assinada deste TCLE será entregue a você.

Caso você tenha dúvidas e/ou perguntas sobre seus direitos como participante deste estudo ou se estiver insatisfeito com a maneira como o estudo está sendo realizado, poderá contactar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da ESALQ, situado na Av Pádua Dias, 11, no Prédio de Apoio à Pesquisa, sala 27, telefone (19) 3429-4400, de sexta-feira, das 8h às 17h ou pelo e-mail cep.esalq@usp.com

Piracicaba, ____ de _____ de 20__.

Nome (completo) _____

Assinatura _____

Anexo G

Lista de atributos e estímulos apresentados durante treinamento dos provadores para análise sensorial das cervejas produzidas com diferentes leveduras.

Grupo de aromas	Atributo/Descritores	Estímulo olfativo
Adocicado	Baunilha	1 favo de baunilha
	Limão	5g de casca de limão siciliano
Frutado	Laranja	5g de casca de laranja
	Tangerina	Extrato N Tangerina BRUAFLAVORS [1%]
	Damasco, frutas secas	10g de damasco
	Pêra verde	Aroma de Pêra BRUAFLAVORS [1%]
	Abacaxi	Extrato N Abacaxi BRUAFLAVORS [1%]
	Manga, managa verde	Extrato N Manga BRUAFLAVORS [1%]
	Frutas vermelhas	Extrato N Cereja BRUAFLAVORS [1%]
	Acerola	10g de Acerola
	Banana, acetato de isoamila	Aroma N Banana BRUAFLAVORS [1%]
Matérias primas	Cevada, malte, grãos	5g de Malte Pilsen
	Lúpulo	2 g lúpulo Nugget
Aromas de fermentação	Fermento	Levedura líquida SMART YEAST
	Frutas-passa	10g de uvas passas pretas e brancas 3 ameixa
	Maça verde, acetaldeído, solvente	Aroma N Maça Verde BRUAFLAVORS [1%]
	Acetona, acetato de etila, verniz	Acetona [1%]
	Pão, casca de pão	100g de Pão francês
Defumado	Defumação	Extrato N Avelã defumada BRUAFLAVORS [1%]
	Noz moscada, especiarias	Extrato N Noz moscada BRUAFLAVORS [1%]
Especiarias	Cardamomo	5g de cardamomo seco
	Canela	3 canelas em pau
	Cravo	Extrato N Cravo BRUAFLAVORS [1%]
	Pimenta, pimenta de cheiro, pimenta rosa, condimento	2g Pimenta rosa 2g Pimenta da jamaica
		Extrato N Pimenta de cheiro BRUAFLAVORS [1%]
	Coentro	Extrato N Semente de coentro BRUAFLAVORS [1%]
	Gengibre	Extrato N Gengibre BRUAFLAVORS [1%]
	Anis, erva doce	2g de anis
Terrosos	Terra, cogumelo, umidade	8g de cogumelos portobello
	Alecrim fresco, alecrim seco	2g de alecrim seco
Herbáceos/ Vegetais	Tomilho fresco, tomilho seco	2g de Tomilho seco
	Vegetal, grama	2g de grama cortada
	Folhas de orégano	2g de orégano
	Ervas, adocicado	1 sachê chá Twining's Tea
	Manjerição fresco, manjerição seco	Extrato N Manjerição BRUAFLAVORS [1%]
	Pepino	Extrato N Pepino BRUAFLAVORS [1%]
	Menta, hortelã	5g de hortelã
Floral	Flor doce	5g de chá de camomila
	Flor	óleo essencial de lavanda [1%]
Fenólico	Medicinal	1 Band-aid
	Amadeirado	10g de pedaços de madeira
	Fenólico, couro, sela de cavalo	Pedaço de couro
Defeitos (off-falvors)	Amanteigado, manteiga	1 g de manteiga
	Vinagre, ácido	Solução ácido acético [1%]
	Papelão	10g Papelão molhado
	DMS, milho verde	20 mL de água de milho

Anexo H

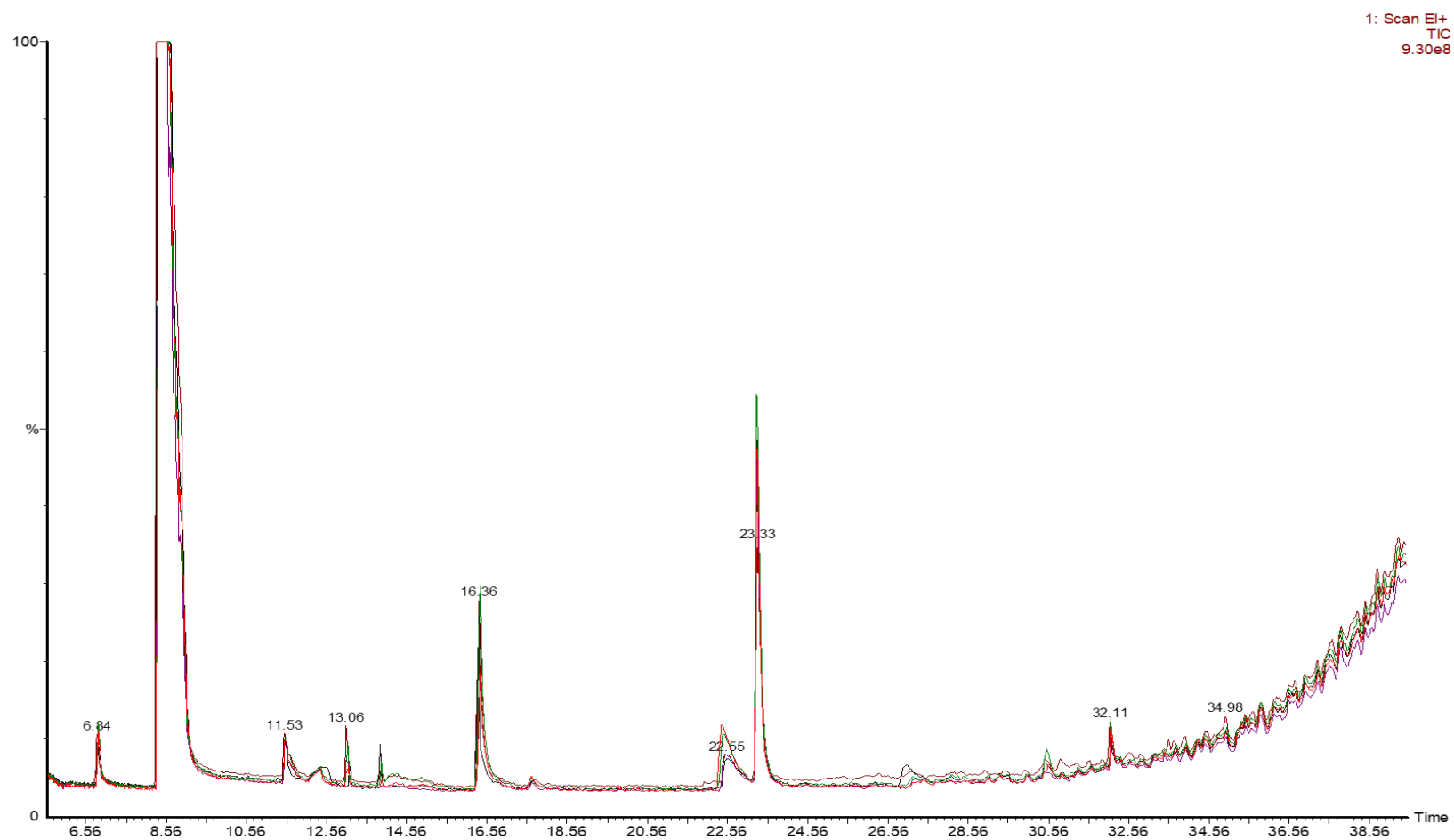


Figura 15. Cromatogramas com sobreposição dos picos. (vermelho) – S33; (Preto) – L242; (Verde) – L308; (Roxo) – L145; (Marrom) – L319. Identificação dos tempos de retenção: (6.84) – Acetato de etila; (11.53) – n-propanol; (13.06) – Isobutanol; (16.36) – Isoamílico; (22.56) – Acetato de isoamila; (23.33) – Octanol (PI); (32.11) – 2-feniletanol.

Anexo I

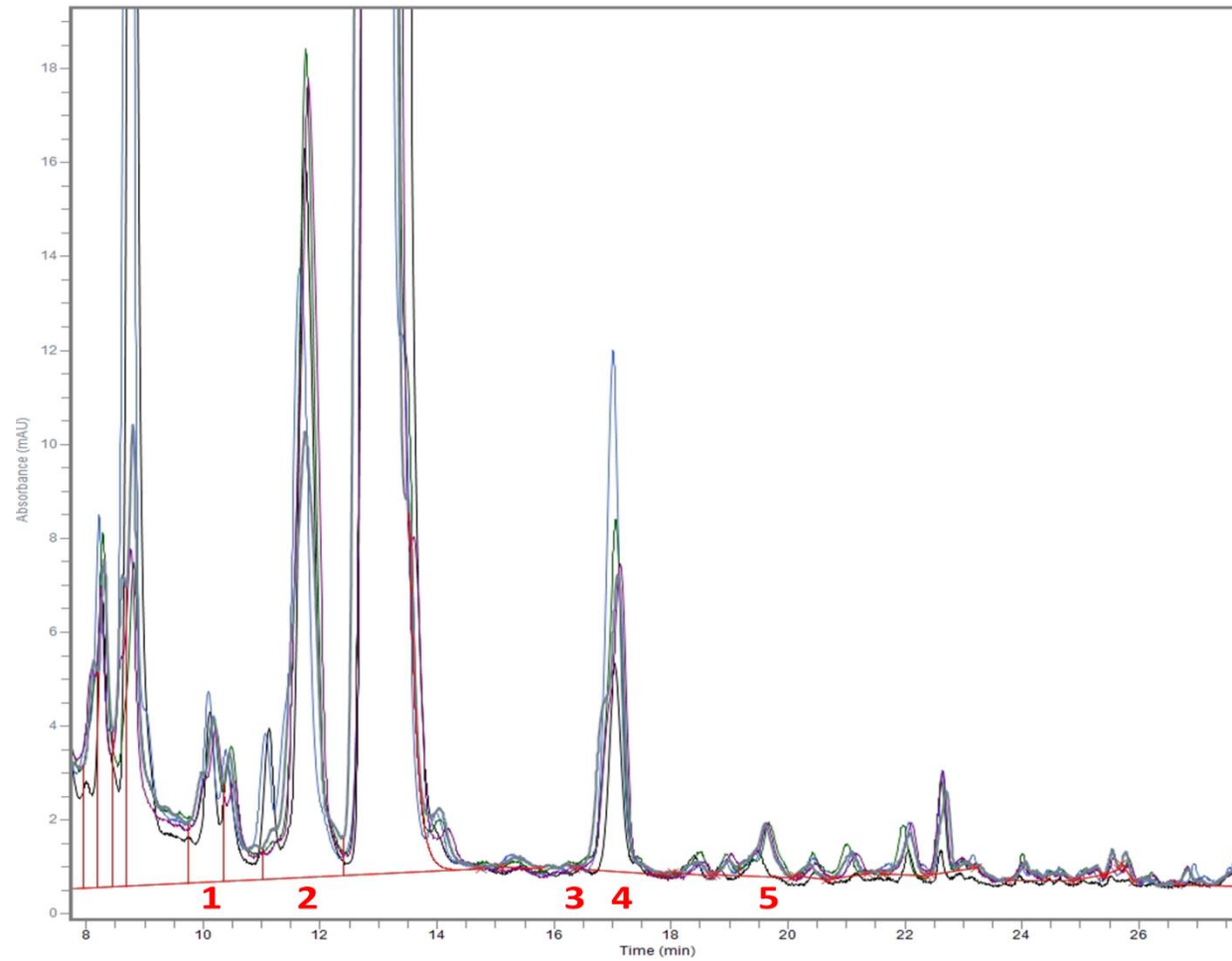


Figura 15. Cromatogramas com sobreposição dos picos. (Cinza)-padrão; (Rosa) – S33; (Preto) – L145; (Rosa) – L242; (Roxo) – L308; (Azul) – L319. Identificação dos picos: (1) – 5-hidroxiacetilfurfural; (2) – Acetaldeído; (3) – Acroleína; (4) – Acetona ; (5) – Furfural.