



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

STEFANO SABINO VIVAS DA SILVA

***Seleção de leveduras não convencionais e não comerciais para produção
de cervejas por fermentação pura, mista e sequenciada com
Saccharomyces cerevisiae***

Recife/PE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

STEFANO SABINO VIVAS DA SILVA

***Seleção de leveduras não convencionais e não comerciais para produção
de cervejas por fermentação pura, mista e sequenciada com
Saccharomyces cerevisea***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco.

ORIENTADOR/A: Prof^a Dr^a Andrelina Maria Pinheiro Santos

CO-ORIENTADOR/A: Prof^a Dr^a Enayde de Almeida Melo

Prof^a Dr^a Eliana Setsuko Kamimura

Recife
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

***Seleção de leveduras não convencionais e não comerciais para produção
de cervejas por fermentação pura, mista e sequenciada com
Saccharomyces cerevisiae***

Por Stéfano Sabino Vivas da Silva

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 25/05/2021 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa Dra. Luciana Leite de Andrade Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa Dra. Solange Maria de Vasconcelos
Universidade Federal da Paraíba

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
Franca Sabino e Jorge William que
estão sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Franca Sabino e Jorge William da Silva, por estarem sempre ao meu lado, por serem responsáveis por minha formação moral e ética, com princípios que levarei para a vida toda.

A minha namorada Raquel Machado, por toda compreensão, companheirismo e suporte ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos do Departamento de Ciência do Consumo pelo companheirismo, por compartilhar as frustrações e as alegrias de um mestrando.

Aos meus companheiros de laboratório, Ursula Coutinho e Vitor Chaves, pois foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído, ou mesmo para que eu não desistisse de fazê-lo.

A técnica de laboratório, Marcia dos Santos, por sempre ser prestativa, companheira e tão doce.

A minha orientadora, Andreлина Maria Pinheiro Santos, por ter me orientado na conclusão deste projeto, mas sobre tudo por ter acreditado no meu projeto e na minha capacidade de concluí-lo, apesar das minhas limitações de tempo.

As minhas coorientadoras Enayde de Almeida Melo e Eliana Setsuko Kamimura pelo suporte e todo auxílio para execução deste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de fazer o mestrado.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela estrutura e disponibilidade do espaço.

EPÍGRAFE

“Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez. ”

Jean Cocteau

RESUMO

Leveduras de diversos gêneros e espécies são capazes de converter açúcares em etanol e dióxido de carbono, bem como em outros metabólitos menores, um processo químico conhecido como fermentação alcoólica. No passado, a fermentação espontânea era praticada e caracterizada por leveduras não *Saccharomyces* durante as primeiras fases da fermentação, enquanto as leveduras do gênero *Saccharomyces* dominavam as fases posteriores. Hoje, a inoculação de culturas de leveduras puras proporciona melhor controle do processo, entretanto, limitando a complexidade de sabor e aroma gerados por diversas linhagens e espécies. Diante do exposto, este artigo tem a finalidade de fazer um estudo exploratório da cinética fermentativa de leveduras não convencionais na produção de cerveja, seja em fermentação simples, mista ou sequenciada, em conjunto com uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Para avaliar o comportamento da fermentação e sua eficácia foram analisadas a produção de álcool, consumo de substrato, pH, crescimento celular e viabilidade dos microrganismos ao longo do processo. O estudo indicou que as leveduras não convencionais em fermentação pura apresentaram rendimento inferior, quando comparadas às cepas comerciais de *S. cerevisiae*, considerando os parâmetros fermentativos, com atenuação real variando entre 8,84% e 17,79% do mosto. Na etapa de fermentação mista entre leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* não foram observadas diferenças significativas em relação à fermentação simples (*S. cerevisiae*), considerando os parâmetros fermentativos. Na etapa de fermentação sequenciada, com 48 horas de diferença entre as inoculações, houve uma queda no rendimento do processo, com diferenças significativas em relação ao controle (*S. cerevisiae*) para os principais parâmetros fermentativos. Considerando que a maioria das cepas de leveduras não convencionais apresentou crescimento de biomassa e boa adaptabilidade ao meio fermentativo, *L. thermotolerans* e *W. anomalus* se mostraram promissoras para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico. Em fermentação mista e sequenciada, novos estudos são necessários para verificar possíveis impactos nas características sensoriais das cervejas.

Palavras-chaves: bioprocesso, cinética fermentativa, interação microbiana

ABSTRACT

Yeasts of several genera and species are capable of converting sugars to ethanol and carbon dioxide, as well as other minor metabolites, a chemical process known as alcoholic fermentation. In the past, spontaneous fermentation was practiced and characterized by non-Saccharomyces yeasts during the early stages of fermentation, while yeasts of the genus Saccharomyces dominated the later stages. Today, the inoculation of pure yeast cultures provides better process control, however, limiting the complexity of flavor and aroma generated by different strains and species. Given the above, this article aims to carry out an exploratory study of the fermentative kinetics of unconventional yeasts in beer production, whether in simple, mixed or sequenced fermentation, together with a commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To evaluate the fermentation behavior and its effectiveness, the alcohol production, substrate consumption, pH, cell growth and viability of microorganisms throughout the process were analyzed. The study indicated that the unconventional yeasts in pure fermentation showed lower yield when compared to commercial strains of *S. cerevisiae*, considering the fermentative parameters, with real attenuation varying between 8.84% and 17.79%. In the stage of mixed fermentation between unconventional yeasts and *S. cerevisiae*, no significant differences were observed in relation to simple fermentation (*S. cerevisiae*), considering the fermentation parameters. In the step of sequential fermentation, with 48 hours of difference between inoculations, there was a decrease in the yield of the process, with significant differences in relation to the control (*S. cerevisiae*) for the main fermentation parameters. Considering that most of the unconventional yeast strains showed biomass growth and good adaptability to the fermentation medium, *L. thermotolerans* and *W. anomalus* showed promise for the production of low-alcohol beers. In mixed and sequenced fermentation, further studies are needed to verify possible impacts on the sensory characteristics of beers.

Keywords: bioprocess, fermentation kinetics, microbial interaction

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Organelas e compartimentos de uma célula de levedura.....	20
FIGURA 2 – Visão geral da respiração celular.....	22
FIGURA 3 – Rendimento de ATP por molécula de glicose em cada estágio da respiração celular.....	23
FIGURA 4 – Papel do piruvato no catabolismo e fermentação alcoólica.....	24

Artigo

FIGURA 1 - Fluxograma de fermentação mista e sequenciada.....	50
FIGURA 2 - Cinética de crescimento de <i>L. thermotolerans</i> em fermentação pura e mista. <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. thermotolerans</i> em fermentação pura (A), mista (B) e sequenciada (C).....	60
FIGURA 3 - Cinética de crescimento de <i>W. anomalus</i> em fermentação pura e mista. <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. thermotolerans</i> em fermentação pura (A), mista (B) e sequenciada (C)	61

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 – Classe de aminoácidos em ordem de assimilação durante a fermentação.....	28
--	----

Artigo

TABELA 1 - Cepas, espécies, substratos e respectivos bancos de origem das leveduras	47
TABELA 2 – Cepas, espécies, sinônimos e respectivos bancos de origem das leveduras utilizadas no estudo	53
TABELA 3 - Parâmetros fermentativos obtidos ao fim do processo, representados por concentração de substratos, teor alcoólico, viabilidade e concentração celular	55
TABELA 4 – Principais determinações analíticas das cervejas produzidas com <i>L. thermotolerans</i> em fermentação pura, mista e sequenciada	56
TABELA 5 - Principais determinações analíticas das cervejas produzidas com <i>W. anomalus</i> em fermentação pura, mista e sequenciada	57

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°brix – grau brix

°C – graus Celsius

Acetil-CoA – acetilcoenzima A

ATP – adenosina trifosfato

Ba²⁺ - íon de bário

Ca²⁺ – íon de cálcio

Cd²⁺ - íon de cádmio

CervBrasil – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja

CNT – nanotubos de carbono

CO₂ – gás carbônico

Cu²⁺ – íon de chumbo

DNS – ácido 3,5 - dinitrosalicílico

g/L – grama por litro

H⁺ – íon de hidrogênio

HPLC - *High performance liquid chromatograph*

L – litro

L/L – litro por litro

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ml – mililitros

mm – milímetro

Mn²⁺ – manganês

NAD – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD⁺ - coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Ni²⁺ – íon de níquel

nm – nanômetro

p/p – peso por peso

Pb²⁺ – íon de chumbo

pH – potencial Hidrogeniônico

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 A cerveja no Brasil	18
3.2 Leveduras	20
3.2.1 Citologia	21
3.2.2 Metabolismo celular e Fermentação alcoólica	23
3.3. Principais componentes do mosto cervejeiro e bioquímica da Fermentação Alcoólica	27
3.3.1 Carboidratos.....	28
3.3.2 Compostos nitrogenados.....	29
3.3.3 Lipídeos.....	31
3.3.4 Íons metálicos	32
3.3.5 Tolerância ao etanol	33
3.4 Formação de compostos secundários pelas leveduras.....	34
3.4.1 Alcool superior	35
3.4.2 Ésteres	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
RESUMO	48
ABSTRACT.....	50
4.1 INTRODUÇÃO	51
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.2.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

É muito provável que as primeiras bebidas fermentadas tenham sido o resultado de fermentações espontâneas, assim, microrganismos (fungos e bactérias) presentes na superfície de frutas e grãos, dentro de vasos de fermentação ou introduzidos pela ação humana, foram responsáveis pela sua produção (VARELA, 2016). Logo, os produtores dessas bebidas notaram que a velocidade, a qualidade e a consistência de um processo de fermentação frequentemente aumentavam quando eram inoculadas com uma pequena amostra de um produto de fermentação acabada (STREENSELS & VERSTREPEN, 2014).

A fermentação espontânea, processo microbiano complexo que envolve a ação de diferentes microrganismos, é utilizado na produção de várias bebidas fermentadas (JOLLY *et al.* 2014; SPITAEELS *et al.*, 2014; TAPSOBA *et al.*, 2015). Devido a sua abundância e predominância em muitas dessas fermentações, as espécies *Saccharomyces* (especialmente *S. cerevisiae*) foram selecionadas para processos de fermentação controlada, incluindo a produção de pão, cerveja, saquê e vinho (DEQUIN & CASAREGOLA, 2011). Esta espécie possui várias características que explicam sua predominância atual nos processos fermentativos industriais, tais como eficiência na produção de etanol, capacidade fermentativa em meios aeróbios e anaeróbios, além de alta tolerância ao etanol (GODDARD, 2008; PISKUR *et al.*, 2006).

Apesar das claras vantagens da utilização de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, um número crescente de estudos considera que a restrição da diversidade microbiana limita as características sensoriais e reduz a complexidade do produto final (DAENEN *et al.*, 2008; DOMIZIO *et al.*, 2007). Além disso, não está claro se as cepas de *S. cerevisiae* usadas atualmente são ideais para suas tarefas industriais, uma vez que muitas destas cepas demonstram deficiências específicas, como por exemplo, a produção de “off-flavors” e o desempenho de fermentação abaixo do ideal (STREENSELS & VERSTREPEN, 2014).

Para superar essa restrição, vários laboratórios e cervejarias começaram a cultivar leveduras não convencionais e a caracterizar suas capacidades fermentativas, a fim de desenvolverem cervejas com compostos de aroma e sabor distintos. Uma das principais leveduras não convencionais utilizadas na fabricação

de cervejas artesanais é a espécie *Brettanomyces*, como no caso das belgas *lambic* e *gueze*, onde o resfriamento do mosto em tanques abertos dá origem à fermentação espontânea, responsável pela complexidade sensorial do produto (SPITAEELS *et al.*, 2014). Se por um lado podem ser considerados cruciais para o perfil de sabor de certas cervejas especiais, dando origem a compostos com notas de “estábulo”, cravo, “cela de cavalo”, medicinal, picante e floral, por outro também podem ser considerados como microrganismos deteriorantes em outras bebidas, como o vinho (CRAUWELS *et al.*, 2016). A produção desses compostos fenólicos voláteis mais intensos está associada à sua capacidade de transformar ácidos fenólicos não voláteis, como o ácido ferúlico e ácido paracumárico, em 4-etilguaiacol e 4-etilfenol, respectivamente, por meio da ação das enzimas hidroxycinamato decarboxilase e vinilfenol redutase (LAFORGUE & LONVAUD-FUNEL, 2012).

Outras leveduras não convencionais têm sido utilizadas na produção de cervejas artesanais, despontando como nova ferramenta para incrementar o perfil sensorial (VANDERHAEGEN *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2016; OSBURN *et al.*, 2018), produzir cervejas com baixo teor alcoólico (MICHEL *et al.*, 2016; DE FRANCESCO *et al.*, 2015) ou para desenvolver produtos funcionais e de baixo valor calórico (HABSCHIED *et al.*, 2020).

Em um desses estudos, Osburn e colaboradores (2018) descobriram cepas de 5 (cinco) leveduras não convencionais — *Hanseniaspora viniae*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces japonicus* e *Wickerhamomyces anomalus* — que apresentavam atividade heterofermentativa, ou seja, foram capazes de transformar açúcares em ácido láctico, etanol e gás carbônico. Testes em larga escala demonstraram que algumas dessas leveduras apresentaram alta capacidade de consumo dos açúcares do mosto (boa produtividade em relação ao álcool), floculavam bem (agregação da biomassa para diminuir turbidez), produziam níveis de ácido láctico desejáveis e compostos de aroma e sabor prazerosos. Essas características únicas permitiriam, por exemplo, a produção de cervejas de estilos ácidos (catharina sour, berliner weise e outras) em uma única etapa, ao invés do processo tradicional em duas etapas (fermentação láctica seguida de fermentação alcoólica).

Essas leveduras não convencionais também têm sido utilizadas em co-fermentação ou fermentação sequenciada com espécies *Saccharomyces*, buscando possíveis efeitos sinérgicos. Em um estudo de co-fermentações entre diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com *Torulaspora delbrueckii*, para a fabricação de cerveja, Canonico *et al.* (2016) mostraram um efeito sinérgico entre as leveduras, capaz de aumentar a produção de ésteres e alcoóis superiores, mostrando-se uma estratégia eficaz para gerar diferenciais aromáticos perceptíveis quando comparado com as fermentações tradicionais.

Considerando a diversidade de microorganismos ainda inexplorados para a produção de cerveja, este artigo tem a finalidade de fazer um estudo exploratório da cinética fermentativa de leveduras não convencionais, seja em fermentação simples, mista ou sequenciada, em conjunto com uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Considerando que os consumidores estão buscando experiências cada vez mais complexas, é de se esperar que as cervejarias desenvolvam novos produtos para atender essa demanda de mercado. Uma das alternativas existentes é a utilização de leveduras não convencionais no processo de fabricação industrial de cerveja, seja para otimizar processos industriais como para adicionar complexidade sensorial aos produtos. Considerando que até o ano de 2005 apenas 1,5% das espécies de leveduras existentes foram descritas, ainda há uma biodiversidade considerável de leveduras inexploradas no planeta Terra. Assim, o uso de leveduras não convencionais para fermentar o mosto cervejeiro pode ser uma alternativa para descobrir novos microrganismos capazes de produzir cerveja, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos. Contudo, algumas questões precisam ser respondidas:

As leveduras não convencionais teriam viabilidade no mosto cervejeiro?

As cervejas produzidas com leveduras não convencionais apresentam características tecnológicas adequadas?

É possível selecionar leveduras não convencionais para fermentações isoladas e combinadas?

Existe sinergia ou competição entre as leveduras no processo de fermentação mista?

Hipótese: As cepas de leveduras não convencionais serão capazes de se adaptar ao meio fermentativo — apresentando boa viabilidade celular —, alta produtividade em relação a conversão dos subprodutos em etanol, além de apresentarem características tecnológicas adequadas. No processo de fermentação mista e sequenciada, a levedura *S. cerevisiae* irá competir com as leveduras não convencionais por nutrientes, dominando o meio fermentativo para realizar uma fermentação completa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cerveja no Brasil

Estima-se que a cerveja foi descoberta por acaso em algum lugar da Mesopotâmia há cerca de 10.000 anos. Alguem usou grãos úmidos e germinados para fazer um mingau que ficou doce ao ser aquecido. Ativadas pelo calor as enzimas dos grãos germinados converteram o amido em açúcares mais simples. Caso a fermentação do mingau não fosse interrompida, teríamos como resultado um nada saboroso exemplar de cerveja da antiguidade (OLIVER, 2012). Até os dias atuais a cerveja é uma das bebidas mais populares do mundo, cujo sabor e aroma final são a soma resultante de várias centenas de compostos ativos produzidos no decorrer de cada etapa da fabricação, no entanto, a grande maioria dessas substâncias é produzida pelas leveduras durante a fase de fermentação (PIRES et al., 2014).

Conforme definido no art. 36, do Decreto nº 6.871, de 2009, cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro. A legislação brasileira ainda permite a utilização de adjuntos no processo de fabricação, como cereais, maltados ou não, além de outros ingredientes como mel e carboidratos de origem vegetal — sacarose, frutose, glicose e maltose — aptos para o consumo humano como alimento. Esses cereais são capazes de substituir parcialmente o malte ou complementá-lo, porém o seu volume não pode ser superior a 45% do extrato primitivo, enquanto que o carboidrato vegetal utilizado não pode ser superior a 15% do extrato primitivo (BRASIL, 2019).

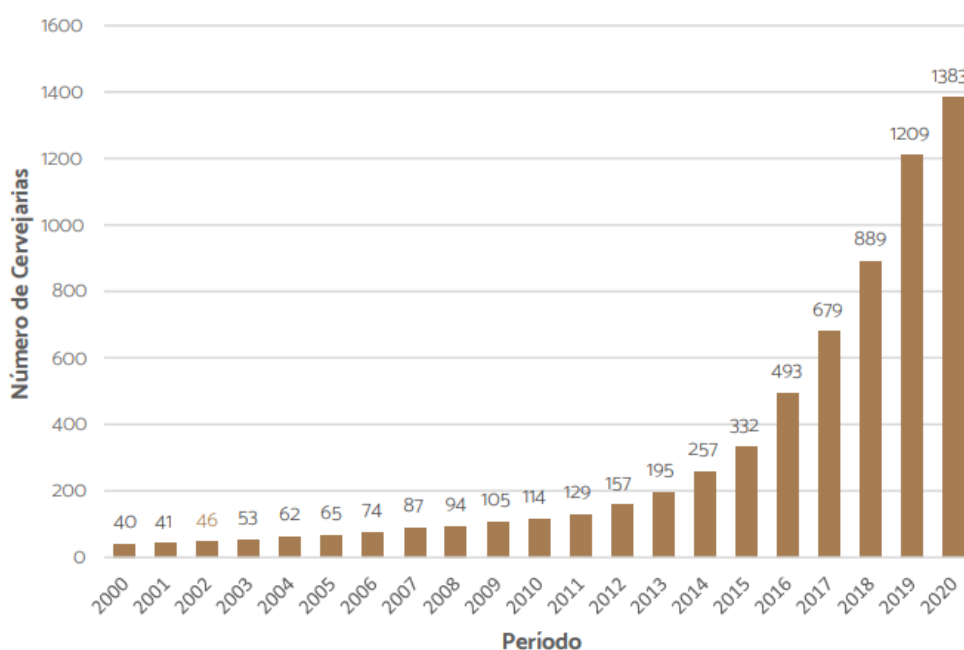
No aspecto nutricional, a cerveja apresenta importantes compostos como vitaminas do complexo B, polifenóis, fosfatos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, sendo também uma autêntica fonte de fibras solúveis e nutrientes. Alguns estudos têm mostrado os benefícios que o consumo moderado de cerveja pode fazer para

saúde, principalmente em virtude das interações entre os polifenóis e a microbiota intestinal (QUESADA-MOLINA et al., 2019 HERNANDEZ-QUIROZ et al., 2019).

Nos últimos anos, o mercado cervejeiro no Brasil vem se expandindo e diversificando paralelamente ao momento de crescimento econômico em que o país vem sofrendo (VALENTE JÚNIOR & ALVES, 2016). Segundo dados da fabricante de lúpulos alemã BarthHaas em 2019 a produção global de cerveja atingiu o montante de 1,9 milhões de hl, um crescimento de 0,5% em relação ao ano anterior. O Brasil se consolidou como terceiro maior produtor de cervejas do mundo, atingindo a marca de 145 milhões de hl no ano de 2019.

Ao final do ano de 2020, o Brasil registrou um total de 1383 cervejarias legalmente instaladas no país, um crescimento aproximado de 316% nos últimos 5 anos. A distribuição dos estabelecimentos ao longo do Brasil mostra que as regiões sudeste e sul detêm juntas 85,6% da concentração das cervejarias — 43,74% e 41,86%, respectivamente —, seguida pela região nordeste (7,59%), centro-oeste (4,91%) e norte com 1,9% da participação nacional (MAPA, 2020). Esse número reafirma a tendência de crescimento do número de estabelecimentos e consequentemente de seus produtos, já prevista em anos anteriores, como é mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Total de cervejarias por ano no Brasil



Fonte: MAPA, 2020

Segundo levantamento realizado pela consultoria Euromonitor Internacional, o Brasil foi considerado o terceiro maior mercado consumidor de cervejas em valores absolutos, atrás somente de China e estados Unidos, atingindo a marca de 13,3 bilhões de litros no ano de 2020. Considerando o consumo per capita, estima-se que o brasileiro consuma 60 litros de cerveja por ano, colocando-o na 28ª posição do ranking dos maiores consumidores, conforme dados levantados pela cervejaria Japonesa Kirin Holdings em 2018. Já a taxa de penetração do consumo de cerveja dentro de casa, considerando pessoas maiores de 18 anos, saltou de 58,90% em 2013 para 68,6% em 2020, segundo dados da consultoria Kantar, mostrando que a cerveja continua sendo a bebida alcoólica preferido do Brasileiro.

3.2 Leveduras

As leveduras são reconhecidas como fungos unicelulares eucarióticos que se reproduzem por brotamento ou fissão, e que não formam seus estados sexuais (esporos) dentro ou sobre um corpo frutífero (MICHAEL KNOP, 2011). As espécies de leveduras podem ser identificadas e caracterizadas de acordo com vários critérios baseados na morfologia celular, fisiologia, imunologia e biologia molecular (WALKER, 2009).

Apesar de diferir bastante em características fisiológicas, as leveduras de importância em alimentos têm algumas características em comum, como temperatura ideal para crescimento entre 25°C e 30°C, favorecimento em pH ácido e dependência do oxigênio para multiplicação, embora alguns tipos também se multipliquem em anaerobiose (FRANCO & LANDGRAF, 2005). Na maioria das vezes as leveduras habitam ambientes úmidos, incluindo a seiva de plantas e tecidos animais, onde há um suprimento pronto de nutrientes solúveis como açúcares e aminoácidos (CAMPBELL et al., 2015)

Suas células podem ser de formato esférica, ovoides, cilíndricas, elipsoides, dentre outras, sendo algumas bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores. O tamanho das células de levedura pode variar bastante, dependendo das espécies e condições de crescimento, algumas leveduras podem ter apenas 2 a 3 µm de comprimento, enquanto outras podem atingir comprimentos de 20 a 50 µm. Entretanto, a largura da célula parece

menos variável, entre 1 e 10 mm (FRANCO & LANDGRAF, 2005; WALKER, 2009).

De 1820 a 2011, o número de leveduras descritas aumentou dramaticamente. Acredita-se que apenas 1% de todas as espécies de leveduras existentes sejam conhecidas. Em 2011, existiam aproximadamente 1.500 espécies de leveduras reconhecidas, o que significa que o número esperado de espécies de leveduras na Terra seria de cerca de 150.000. Isso significa uma lacuna imensa em nosso conhecimento sobre a biodiversidade e o "pool genético" disponível de isolados naturais selvagens de leveduras. Várias técnicas biológicas moleculares são usadas para auxiliar na detecção de novas espécies de leveduras no ambiente natural e, juntamente com a contribuição de fisiologistas celulares, elas fornecem maneiras de conservar e explorar a biodiversidade de leveduras (WALKER, 2009). Além disso, uma ampla gama de estratégias está disponível para fornecer novas leveduras para a indústria de fermentação, tais como evolução experimental, mutagênese, reprodução e isolamento de levedura da natureza (STEENSELS et al., 2014; STEENSELS, SNOEK, et al., 2014).

As características tecnológicas das leveduras, principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, têm se mostrado adequadas para um amplo conjunto de processos fermentativos, incluindo vinho, cerveja, cidra, bioetanol e outros (VARELA, 2016; WALKER & STEWART, 2016; GSCHAEDEL, 2017; AZHAR et al., 2017)

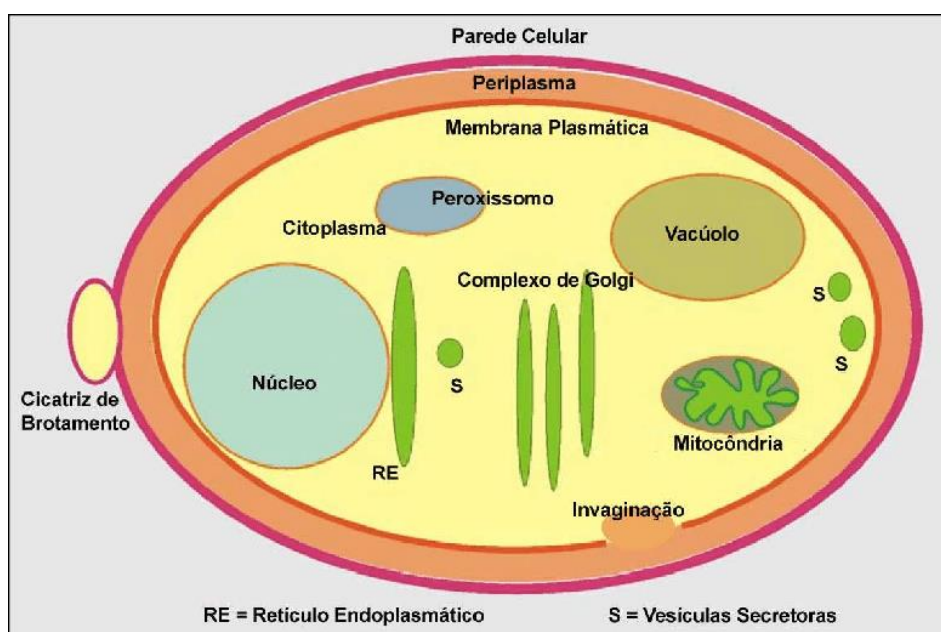
3.2.1 Citologia

As células de levedura contêm todas as estruturas subcelulares típicas dos eucariotos, incluindo o citoesqueleto, um núcleo e várias organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático (RE), vacúolo, complexo de Golgi e mitocôndrias, conforme figura 1. Assim como os vegetais, as células de levedura contêm um vacúolo e a membrana plasmática cercadas por uma parede celular rígida, chamada de citoesqueleto (VAN DER KLEI et al., 2011). O citoesqueleto eucariótico é uma rede de fibras que organiza estruturas e atividades na célula, tendo como principais funções a sustentação mecânica celular, mantendo sua forma, e garantia da mobilidade celular ou de suas estruturas internas (CAMPBELL et al., 2015). O núcleo contém cromossomos (complexos DNA-proteína), os quais passam informações genéticas para as células filhas durante

divisão celular, e o nucléolo, é o local de transcrição e processamento do RNA ribossômico (WALKER, 2009).

O retículo endoplasmático (RE) consiste em uma rede de túbulos e sacos membranosos chamados de cisternas, separados por duas regiões distintas que diferem em estrutura e função: RE liso e RE rugoso (CAMPBELL et al., 2015). O RE liso funciona em diversos processos metabólicos, que variam com o tipo celular. Esses processos incluem a síntese de lipídeos, o metabolismo de carboidratos, a desintoxicação de drogas e venenos e o armazenamento de íons cálcio. Além de produzir proteínas secretórias, o RE rugoso é uma fábrica de membrana para a célula, crescendo pela adição de proteínas e fosfolipídeos à própria membrana (VAN DER KLEI et al., 2011).

Figura 1. Organelas e compartimentos de uma célula de levedura.



Fonte: CAMPBELL et al., 2015.

Os vacúolos são grandes vesículas derivadas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, portanto, são uma parte integral do sistema de endomembranas da célula (CAMPBELL et al., 2015). O vacúolo é o principal local para reciclagem de materiais celulares danificados ou conteúdo redundante, por meio de um processo denominado autofagia (HUANG & KLIONSKY, 2002). O vacúolo também tem uma função importante no controle do pH e no

armazenamento intracelular de certas substâncias, como aminoácidos, íons e polifosfatos (VAN DER KLEI et al., 2011).

Geralmente, as mitocôndrias são responsáveis pela maior parte da produção de ATP em células eucarióticas em crescimento aeróbio. A síntese de ATP resulta da oxidação de fontes de carbono, como ácidos graxos e açúcares (WALKER, 2009). No entanto, quando as células de leveduras são cultivadas em altas concentrações de glicose, inicialmente fermentam a fonte de carbono independentemente da mitocôndria. Quando as concentrações de glicose diminuem, a fosforilação oxidativa mitocondrial torna-se cada vez mais importante para a geração de ATP, e um aumento concomitante na abundância mitocondrial é observado (VAN DER KLEI et al., 2011).

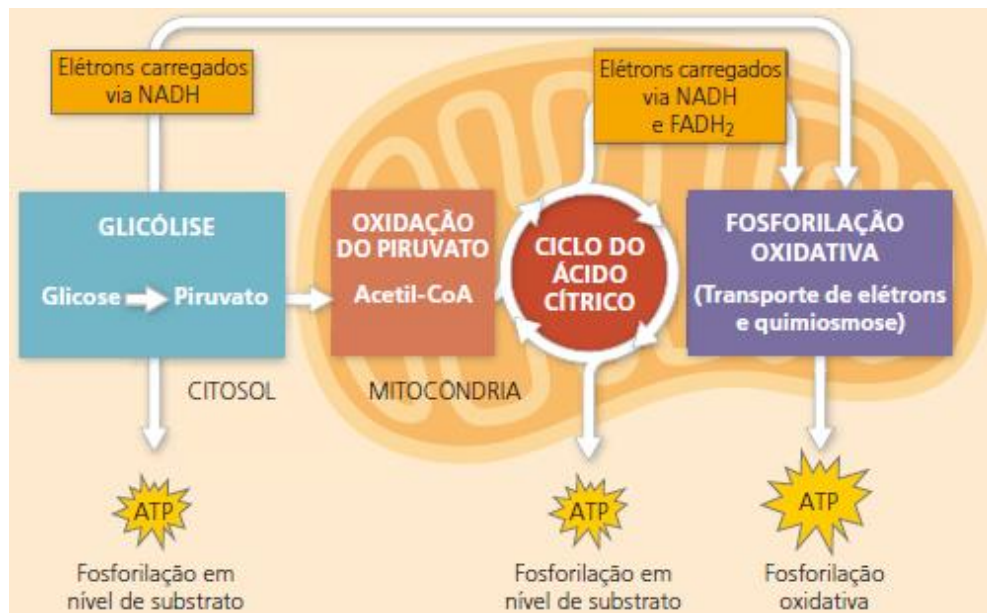
3.2.2 Metabolismo celular e Fermentação alcoólica

As células vivas requerem aporte de energia a partir de fontes externas para realizarem suas diversas tarefas, como por exemplo síntese de polímeros, bombeamento de substâncias através de membranas, movimento e reprodução. Por meio da atividade enzimática, uma célula degrada sistematicamente moléculas orgânicas complexas, ricas em potencial de energia, em produtos residuais mais simples com menos energia. Parte da energia retirada do estoque químico pode ser usada para realizar tais tarefas essenciais e o restante é dissipado como calor (CAMPBELL et al., 2015).

Dependendo das condições do ambiente onde esteja, as leveduras podem produzir energia por meio da rota respiratória, na presença de oxigênio como aceptor final de elétrons ou por meio da rota fermentativa (FLORES et al. 2000). A disponibilidade de oxigênio varia entre diferentes nichos, reduzindo ou eliminando completamente a atividade metabólica da rota respiratória. Como resposta a condições hipóxicas e anaeróbias, os organismos desenvolveram vários processos para otimizar a utilização de oxigênio e até reduzir a dependência da presença de oxigênio (COMPAGNO et al., 2014). De acordo com a dependência de oxigênio durante o ciclo de vida, as leveduras são classificadas como: (i) aeróbios obrigatórios, exibindo metabolismo exclusivamente respiratório, (ii) fermentativos facultativos (anaeróbios facultativos), exibindo metabolismo respiratório e fermentativo, e (iii) fermentativos obrigatórios, ou anaeróbio obrigatório (MÉRICO et al. 2007).

A respiração celular é um processo de obtenção de energia, representando a função cumulativa de três fases metabólicas: Glicólise, Ciclo do ácido cítrico e Fosforilação oxidativa, conforme ilustração da figura 2. Durante a glicólise, cada molécula de glicose é degradada em duas moléculas de um composto chamado piruvato, por meio de uma série de dez reações em cadeia. Nas células eucarióticas o piruvato entra na mitocôndria, onde é oxidado a acetil-CoA. Este, por sua vez, entra no ciclo do ácido cítrico, onde a degradação da glicose em dióxido de carbono é completada. Na terceira fase da respiração, a cadeia de transporte de elétrons aceita os elétrons dos produtos degradados das duas primeiras fases (a maioria deles via NADH) e passa esses elétrons de uma molécula a outra. No final da cadeia, os elétrons são combinados com uma molécula de oxigênio e íons de hidrogênio (H^+), formando água. Durante a fosforilação oxidativa, a cadeia de transporte de elétrons converte a energia química em uma forma usada para síntese de ATP em um processo chamado de quimiosmose (COMPAGNO et al., 2014; CAMPBELL et al., 2015).

Figura 2 – Visão geral da respiração celular



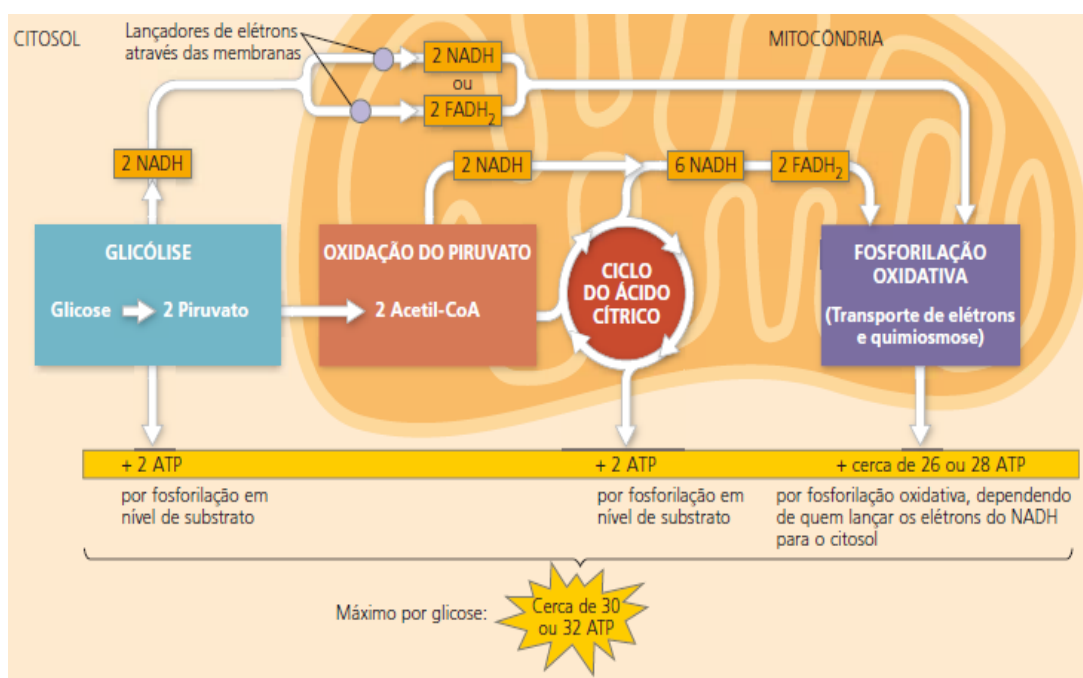
Fonte: Campbell et al., 2015

Cada uma das etapas da respiração celular produz um saldo líquido positivo de energia, calculado em termos de produção de ATP. Nas fases da glicólise e Ciclo do ácido cítrico, há a geração de 2ATP em cada uma delas,

enquanto que na etapa de fosforilação oxidativa há a geração de cerca de 26 a 28 ATP, totalizando um valor entre 30 ATP e 32 ATP por molécula de glicose ao fim da cadeia respiratória, conforme figura 3 (CAMPBELL et al., 2015).

Por outro lado, a fermentação surge para os microrganismos como uma maneira de obter energia química na ausência de oxigênio ou da cadeia de transporte de elétrons (WALKER, 2009). A glicólise é uma etapa comum à fermentação e à respiração celular, entretanto, a partir daí, há uma bifurcação na rota catabólica do piruvato, a depender da presença de oxigênio, de onde surgem a fermentação e a respiração celular (CAMPBELL et al., 2015). Cada piruvato perde uma molécula de CO_2 (gás carbônico), convertendo-se em acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase. Posteriormente, o acetaldeído é reduzido pelo NADH a etanol, regenerando o suprimento de NAD^+ necessário para a continuação da glicólise (WHITE & ZAINASHEFF, 2010; WALKER & WALKER, 2018).

FIGURA 3 - Rendimento de ATP por molécula de glicose em cada estágio da respiração celular

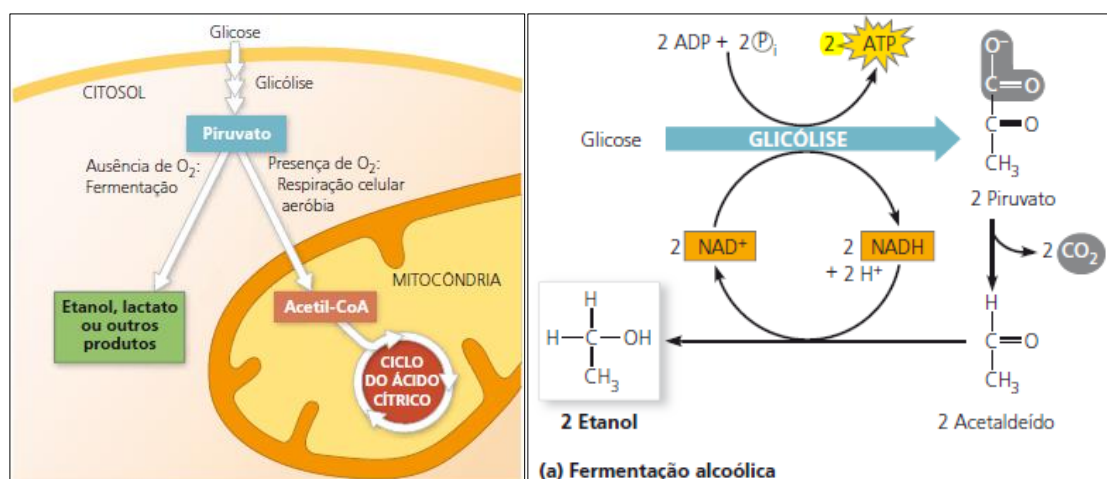


Fonte: Campbell et al., 2015

Visto que a obtenção de energia por meio da respiração celular é energeticamente mais favorável do que a fermentação, a maioria dos organismos usa a fermentação apenas quando a disponibilidade de oxigênio diminui. No

entanto, em várias espécies de levedura, como *S. cerevisiae*, o destino metabólico do piruvato, formado em altas taxas, é fortemente alterado da respiração para a fermentação, mesmo quando o oxigênio é abundante, conforme figura 4. Em outras palavras, *S. cerevisiae* pode fermentar açúcares também sob condições aeróbicas, mostrando o chamado fenótipo “Crabtree-positivo” (BARNET & ENTIAN, 2005; PISKUR et al. 2006). Por outro lado, leveduras “Crabtree-negativa” carecem de produtos fermentativos e, em condições aeróbicas, os únicos subprodutos são a biomassa celular e o dióxido de carbono (DASHKO et al., 2014). O rápido consumo de açúcar, a produção/tolerância ao etanol, e a capacidade de se propagar sem oxigênio, são provavelmente algumas das características “vencedoras” dessas leveduras, as quais são responsáveis pelo resultado da competição no meio fermentativo com outros microrganismos (PISKUR et al., 2006). Essa “invenção” metabólica (efeito Crabtree) representa na natureza uma forte ferramenta para superar outros microrganismos. Ambos os grupos de leveduras emergentes produtoras de etanol, incluindo *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, também podem catabolizar eficientemente o etanol e, portanto, seu estilo de vida correspondente foi denominado como “fazer- acumular-consumir” (PISKUR et al., 2006; ROZPEZDOWSKA et al., 2011).

Figura 4 – Papel do piruvato no catabolismo e fermentação alcoólica



Fonte: Campbell et al., 2015

Em suma, essa estratégia de vida baseia-se no fato de que as leveduras podem consumir muito mais açúcar do que outras espécies, convertê-lo em etanol para inibir o crescimento de concorrentes, especialmente bactérias, e depois

consumir o carbono restante, uma vez que tenham estabelecido um domínio competitivo no nicho (DASHKO et al.,2014).

3.3. Principais componentes do mosto cervejeiro e bioquímica da Fermentação Alcoólica

A bioquímica da fermentação é um processo complexo e muitos de seus aspectos ainda precisam ser elucidados. Ela envolve aspectos relacionados com os fatores que controlam o fluxo de carbono e outros nutrientes para a formação de biomassa, etanol e metabólitos secundários que contribuem para o aroma e sabor da cerveja (BOULTON & QUAIN, 2001). Podemos considerar três áreas gerais de discussão que podem influenciar a bioquímica da fermentação, as quais seriam a composição do mosto, as condições de fermentação e a cepa de levedura utilizada (HE et al.,2014)

O mosto é um meio de cultivo complexo que consiste em carboidratos (glicose, frutose, sacarose, maltose, maltotriose e dextrinas não fermentáveis), materiais nitrogenados (aminoácidos, peptídeos, amônia, proteínas, ácidos nucleicos), vitaminas, minerais, íons inorgânicos, ácidos graxos, oligoelementos e outros constituintes (STEWART et al., 2013). As fermentações exigem um fornecimento equilibrado de nutrientes, em quantidade suficiente como meio de crescimento adequado para a reprodução da levedura, ao mesmo tempo que atua como meio de fermentação na produção de níveis consistentes de etanol, dióxido de carbono e sub-produtos secundários (HE et al.,2014). Esse equilíbrio pode ser perturbado se a composição do mosto for modificada, por exemplo, alterando a proporção entre carbono e nitrogênio no mosto, ao aumentar o extrato fermentável com adjuntos de xarope de açúcar (BOULTON & QUAIN, 2001).

O genótipo de uma cepa de levedura é fundamental para o resultado da fermentação alcoólica, uma vez que o espectro de metabólitos secundários produzidos e a máxima tolerância ao etanol são determinados tanto pela levedura quanto pelas condições estabelecidas durante a fermentação, destacando-se entre essas condições as concentrações de açúcares e oxigênio (BOULTON & QUAIN, 2001).

A expressão fenotípica do genótipo da levedura é modulada pelas condições experimentadas durante a fermentação. Em grandes tanques fermentadores, em particular, a levedura é submetida a múltiplas tensões, como

alta pressão hidrostática, elevada concentração de dióxido de carbono, baixo pH (INGLEDEW, 2017) e reduzida atividade de água. Todos estes têm o potencial de desencadear respostas bioquímicas específicas da levedura (WALKER & VAN DIJCK, 2005; DEPARIS et al., 2017; WALKER & BASSO, 2020).

3.3.1 Carboidratos

As cepas de levedura utilizadas na produção para cerveja são organismos heterotróficos capazes de utilizar uma grande variedade de nutrientes para apoiar o crescimento e gerar energia. Uma propriedade de tais organismos é que eles devem ser capazes de realizar absorção seletiva. Assim, a assimilação de nutrientes individuais do mosto é complexa, devido à resposta da levedura à mistura dos componentes presentes. Portanto, não apenas alguns componentes são utilizados preferencialmente, mas também a presença de alguns nutrientes inibe a utilização de outros. Quando apresentadas com uma escolha de nutrientes, as células de levedura tendem a usar primeiro aqueles que são mais facilmente assimilados (BOULTON & QUAIN, 2001).

As leveduras produtoras de cerveja podem utilizar uma grande variedade de carboidratos; no entanto, existe alguma variabilidade entre cepas individuais. As cepas de levedura da família Ale (*S. cerevisiae*) são capazes de fermentar glicose, sacarose, frutose, maltose, galactose, rafinose, maltose e, ocasionalmente, trealose, enquanto que as cepas de levedura Lager (*S. cerevisiae*) são distinguidas por serem capazes de fermentar também o dissacarídeo melibiose (GIBSON et al., 2008). Os açúcares são transportados para as células de levedura através da membrana plasmática por vários mecanismos, como difusão líquida simples (um mecanismo passivo ou livre), difusão facilitada (catalisada) e transporte ativo (dependente de energia). O modo preciso da translocação dependerá do tipo de açúcar, das espécies de leveduras e das condições de crescimento. Por exemplo, *S. cerevisiae* absorve glicose por difusão facilitada e maltose por transporte ativo (WALKER, 2009).

Em um modelo de padrão de cinética de fermentação, a sacarose é consumida primeiro e a hidrólise resultante causa um aumento transitório na concentração de frutose. A frutose e a glicose são absorvidas mais ou menos simultaneamente, desaparecendo do mosto após cerca de 24 horas. Já a maltose e a maltotriose são os açúcares mais abundantes do mosto e normalmente

apenas serão absorvidos após o completo esgotamento dos monossacarídeos. Os polissacarídeos de maior peso molecular, como as dextrinas, não são assimilados pelas leveduras produtoras de cerveja, com exceção da cepa *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, contribuindo diretamente para a sensação de corpo da cerveja (HE et al., 2014).

Existem transportadores específicos para cada tipo de açúcar e frequentemente múltiplos carregadores para açúcares específicos. A atividade de transportadores individuais é modulada pelo espectro e concentração de açúcares presentes no mosto (BOULTON & QUAIN, 2001). Em particular, a glicose parece ser o substrato preferido e, quando presente no meio, sua presença inativa ou reprime os transportadores para a absorção de outros açúcares, como maltose e sacarose (HORAK, 2013)

3.3.2 Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados disponíveis para consumo pela levedura são conhecidos como nitrogênio assimilável, ou amino nitrogênio livre (ANL), constituídos por aminoácidos, íons amônio e pequenos peptídeos, os quais garantem o crescimento eficiente das células de levedura e, portanto, um desempenho de fermentação desejável (SANKH et al., 2011). Não são apenas usados como um nutriente essencial para o crescimento da levedura, mas também para a biossíntese de uma série de subprodutos da fermentação que afetam o sabor e a estabilidade da cerveja (PICKERELL, 1986). Em geral, os níveis desejados de FAN para mostos com densidade de 12 °P estão na faixa de 140–150 mg/L, enquanto que para mostos com densidades maiores que 18 °P há uma necessidade de FAN na casa de 280 mg/L (LEI et al., 2012).

Não é apenas a quantidade absoluta de nitrogênio assimilável que influencia o aroma da cerveja, mas também o tipo de aminoácido que pode levar a diferentes respostas da levedura - e, finalmente, aos perfis aromáticos finais da cerveja (HE et al., 2014). O mosto cervejeiro contém 19 dos 20 aminoácidos essenciais e, assim como no caso dos açúcares do mosto, a assimilação de compostos nitrogenados é ordenada (LEKKAS et al., 2007). Os aminoácidos do grupo A são assimilados imediatamente após a levedura entrar em contato com o mosto, os do B mais lentamente, enquanto os da classe C não são utilizados, conforme Tabela 1 (PIERCE, 1987). A prolina é o único aminoácido membro da

classe D e sua dissimilação requer a presença de uma oxidase mitocondrial não presente nas condições reprimidas e anaeróbicas da fermentação (WANG & BRANDRISS, 1987).

Tabela 1 – Classe de aminoácidos em ordem de assimilação durante a fermentação

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
<i>Absorção rápida</i>	<i>Absorção intermediária</i>	<i>Absorção lenta</i>	<i>Pequena ou nenhuma absorção</i>
Ácido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amônia	
Lisina			
Arginina			

Fonte: (Pierce,1987)

Adicionar xarope de açúcar como adjunto é uma abordagem popular na indústria cervejeira para aumentar a densidade do mosto. No entanto, essa adição promove a diluição da concentração de amino nitrogênio livre (FAN), já que esses adjuntos não contêm quantidades consideráveis de nitrogênio, podendo surgir um espectro de aminoácidos desequilibrado (LEI et al., 2012). Portanto, o aumento da gravidade inicial pela adição de xaropes ao mosto reduziria o conteúdo de aminoácidos disponíveis, e as taxas de crescimento específico mais baixas levam a taxas de absorção de aminoácidos mais baixas (LEKKAS et al., 2007). Em um estudo com cervejas de altas densidades para identificar os efeitos da alteração da proporção de açúcar e nitrogênio, Lei e colaboradores (2012) identificaram que a densidade do mosto e o nível de nitrogênio afetaram bastante a fisiologia da levedura e a formação de compostos voláteis. O mosto de alta densidade com maior nível de nitrogênio estimulou o crescimento celular, floculação, expressão genética e absorção de açúcares e aminoácidos, além de diminuir a produção de alcoóis superiores e ésteres.

3.3.3 Lipídeos

Os lipídeos são um grupo de moléculas diversas em que as únicas características em comum são a pouca solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos (CAMPBELL, 2015). A membrana plasmática, ou membrana celular, é uma bicamada lipídica entre a parede celular e o interior da célula. Devido à natureza anfipática dessas moléculas, elas espontaneamente formam bicamadas, e nas membranas biológicas existem proteínas integrais e periféricas envolvidas no transporte de nutrientes, na homeostase iônica e de pH, bem como na sinalização e transdução celular (HENDERSON & BLOCK, 2014). A membrana celular das leveduras é constituída em sua grande parte por compostos lipídicos, tais como os fosfolipídios, glicolipídios e o ergosterol, dando fluidez, flexibilidade e a capacidade de formar novas células por meio do processo de brotamento (DAUM et al., 1998).

A levedura pode assimilar esteróis do mosto ou fabricá-los, com a utilização de oxigênio para colocar ligações duplas nos ácidos graxos e controlar seu nível de saturação. Ao controlar o nível de saturação em suas membranas lipídicas, a levedura é capaz de manter a fluidez adequada da membrana em diferentes temperaturas, como a temperatura de fermentação desejada pelo cervejeiro. Sem a aeração adequada, a levedura é incapaz de controlar a fluidez da membrana até o final da fermentação, levando a fermentações paradas e sabores estranhos (WHITE & ZAINASCHEFF, 2010). Assim, a possibilidade de assimilação de lipídios do mosto tem o potencial de reduzir a necessidade de oxigênio durante a fermentação (BOULTON & QUAIN, 2001).

A cervejaria New Belgium Brewing Company, situada nos Estados Unidos, realizou um experimento no qual adicionou ácidos graxos insaturados em uma fermentação como um meio de eliminar a aeração do mosto. Ele escolheu o azeite como uma fonte rica em ácido oleico. O tempo de fermentação foi de 94 horas, apenas 11 horas a mais do que a fermentação com controle de oxigênio. Como a fermentação atingiu a densidade final, assumiu-se que a adição de azeite teve um efeito positivo nos níveis de ácidos graxos insaturados. A cerveja resultante tinha os esperados altos níveis de ésteres e níveis mais baixos de álcoois superiores, entretanto, os provadores não conseguiram detectar as diferenças (HULL, 2008).

3.3.4 Íons metálicos

Outro nutriente importante assimilado pela levedura no processo de fermentação são os íons metálicos, o qual exercem duas funções principais. Eles são considerados nutrientes essenciais, portanto, a ausência de alguns íons metálicos no meio de crescimento, como zinco, magnésio e cálcio, pode causar efeitos adversos no metabolismo celular, principalmente por exercerem o papel de co-fatores enzimáticos de alguns processos-chave (BROMBERG et al., 1997; WALKER & MAYNARD, 1997). As células de levedura são particularmente hábeis em remover íons metálicos do ambiente externo, independentemente de serem ou não necessários como nutrientes traço. Isso acaba ocasionando a concentração de muitos íons metálicos, podendo ter efeitos tóxicos nas células de levedura (BOULTON & QUAIN, 2001). Esta propriedade levou a propostas de que poderiam ser úteis para a remoção de poluentes em águas contaminadas ou como procedimento para recuperação de íons metálicos de valor econômico (SOARES & SOARES, 2012)

Além dos impactos sobre importantes enzimas metabólicas, os íons metálicos também podem afetar a estabilidade e a dinâmica das membranas celulares. No entanto, os papéis das membranas de levedura na manutenção do transporte de nutrientes, viabilidade celular, permeabilidade, tolerância ao estresse e eficiência de fermentação ainda precisam ser elucidados. Quando as leveduras encontram mudanças no ambiente, como depleção de nutrientes ou íons, acúmulo de metabólitos ou variação de temperatura, a membrana plasmática deve se adaptar antes das estruturas internas (WALKER et al., 2006).

A captação de íons metálicos pode ser um processo passivo, ativo ou uma combinação de ambos. Dentre eles, dois mecanismos podem ser identificados, denominados "biossorção" e "bioacumulação". O primeiro deles é um processo passivo no qual os íons metálicos se ligam principalmente à parede celular. Esse procedimento é relatado como rápido, insensível à temperatura, não requer energia metabólica e não é afetado por inibidores metabólicos. Já a bioacumulação é um processo mais lento, com todas as características de um processo regulado. Assim, é dependente da temperatura e pode ser bloqueado pelo uso de inibidores metabólicos (BOULTON & QUAIN, 2001).

3.3.5 Tolerância ao etanol

Durante a fermentação industrial, inúmeros estresses ambientais afetam negativamente as atividades das células de levedura e incluem fatores físicos, químicos e biológicos que, individual ou coletivamente, podem reduzir a eficiência da produção de álcool. Exemplos dos estresses mais importantes incluem altas concentrações de etanol, pressão osmótica induzida por glicose, pH extremos, choque de temperatura e metabólitos produzidos por bactérias contaminantes (WALKER & BASSO, 2019).

A capacidade de suportar altas concentrações de etanol é obviamente a chave para uma fermentação bem-sucedida, particularmente no caso de fermentação de alta densidade, usando um mosto muito concentrado. Vários fatores podem ser considerados como contribuintes para a tolerância ao etanol, tais como componentes genéticos da levedura, toxicidade do etanol, influências do ambiente físico, composição do mosto, bem como a condição fisiológica da levedura (BOULTON & QUAIN, 2001).

Na primeira etapa da fermentação, conhecida como fase latente ou fase *lag*, as células de levedura utilizam açúcar e outros nutrientes, particularmente nitrogênio, para obter energia e iniciar o crescimento celular; entretanto, eles também estão se adaptando às novas pressões e condições ambientais (ZAMORA, 2009). Após a adaptação, a levedura entra na fase de crescimento exponencial, onde começa a crescer a uma taxa elevada, estando limitada principalmente pela concentração de nitrogênio (VARELA et al., 2004). Durante esse mesmo período de crescimento, o oxigênio dissolvido no meio fermentativo é utilizado pela levedura para produzir ergosterol, o principal esteroide da levedura, e ácidos graxos insaturados que serão incorporados ao diacilglicerol (DAG), o precursor de todos os fosfolipídios que compõem a membrana celular de levedura (ZAMORA, 2009). Uma vez que o nitrogênio disponível foi totalmente consumido, as células de levedura começam a transição para o metabolismo de fase estacionária, onde a população de células de levedura atinge sua maior densidade. Durante o metabolismo da fase estacionária inicial, quantidades significativas de açúcar são convertidas em etanol e a viabilidade celular permanece relativamente alta, embora a fermentação comece a desacelerar (COLEMAN et al., 2007). Conforme a concentração de açúcar continua a cair (e

os níveis de etanol aumentam), a população de células de levedura viáveis não muda significativamente até que praticamente todo o açúcar tenha sido utilizado e as células de levedura comecem a morrer (HENDERSON & BLOCK, 2014)

Concentrações de etanol a partir de 10% (peso/volume) começam a reduzir significativamente a atividade fermentativa da levedura, no entanto, para a maioria das enzimas glicolíticas, desnaturação significativa só é observada em concentrações de etanol a partir de 15% p/v (CASEY & INGLEDEW, 1986). Além disso, em altas concentrações, a bicamada de membrana experimentará um aumento significativo na sua fluidez, resultando em uma redução drástica de até 30% na espessura da membrana (ROWE, 1992). A redução da espessura induzida pelo etanol nas membranas biológicas pode resultar em vazamento, agregação de proteínas e alterações na atividade das membranas proteicas (HENDERSON E BLOCK, 2014). Por fim, a exposição da membrana plasmática da célula de levedura ao etanol tem mostrado modular a atividade das proteínas da membrana, como Pma1, que é a H-ATPase primária responsável por manter o pH intracelular e o potencial da membrana plasmática na *S. cerevisiae* (AGUILERA et al., 2006). Esses exemplos destacam a evidência acumulada de que a membrana da célula de levedura é o alvo principal do efeito tóxico do etanol (BLOCK & BISSON, 2002; ALEXANDRE et al., 1994).

3.4 Formação de compostos secundários pelas leveduras

Uma infinidade de compostos contribui para o sabor da cerveja e muitos destes são derivados diretamente das matérias-primas usadas para produzir o mosto. No entanto, a etapa de fermentação tem o impacto mais significativo no desenvolvimento do aroma e sabor na cerveja. O caráter essencial de qualquer cerveja é determinado pela infinidade de metabólitos produzidos pela levedura durante a fermentação, dentre eles podemos citar ácidos orgânicos, alcoóis superiores, ésteres e fenóis (Boulton & Quain, 2001).

Todos esses componentes ativos produzidos pela levedura podem variar em sua concentração a depender de mudanças no nível de expressão dos genes envolvidos na síntese de aromas durante a fermentação (PROCOPIO et al., 2011), portanto, devem ser mantidos dentro de certos limites para que um único

composto ou grupo de compostos não altere o equilíbrio de sabor (PIRES *et al.*,2014). Previsivelmente, com uma gama tão ampla de componentes derivados dos resultados do metabolismo da levedura, não é possível atribuir um único fator que explique sua presença na cerveja. Mecanismos metabólicos potenciais são respostas à atividade de água reduzida, reações de equilíbrio redox celular, manutenção do pH intracelular, excreção de choque, respostas ao estresse e captação de nutrientes dos contra-ions (Boulton & Quain, 2001).

3.4.1 Alcool superior

Os álcoois superiores são os compostos organolépticos mais abundantes na cerveja. A levedura rouba o grupo amina dos aminoácidos absorvidos do mosto para que possam ser incorporados em suas próprias estruturas, em um processo conhecido como transaminação. O que resta do aminoácido (α -cetoácido) sofre uma reação química chamada descarboxilação, na qual um grupo carboxila é eliminado de um composto na forma de dióxido de carbono, gerando um aldeído, o qual posteriormente será reduzido e finalmente transformado em álcool superior (PIRES *et al.*,2014).

Sua contribuição sensorial para da cerveja ocorre por uma intensificação geral do sabor e aroma alcoólicos, além de conferir um caráter de aquecimento na boca (HE *et al.*,2014). Os principais álcoois superiores sensorialmente ativos responsáveis pelo aroma da cerveja são propanol, isobutanol, álcool isoamílico, 2-metil butanol e fenil etanol (MEILGAARD, 1975). Além disso, o álcool superior tem o importante papel secundário de fornecer a fração alcoólica necessária para a síntese de ésteres desejáveis, que representam o maior e possivelmente o mais importante grupo de compostos aromatizantes da cerveja (DACK *et al.*, 2017).

O controle da formação de álcool superior durante a fermentação pode ser realizado de três maneiras. Primeiro, pela escolha de uma cepa de levedura apropriada, segundo, pela modificação da composição do mosto e, terceiro, pela manipulação das condições de fermentação (TOKPOHOZIN *et al.*,2019). Como regra geral, qualquer alteração nas condições de fermentação que aumente a extensão do crescimento da levedura produz um aumento concomitante na concentração de álcool superior. Assim, o excesso de aminoácidos no mosto, alta concentração de oxigênio e altas temperaturas tendem a aumentar a expressão

dos genes associados à produção deste composto (PROCOPIO *et al.*, 2015; BOULTON & QUAIN, 2001).

3.4.2 Ésteres

De todos os metabólitos secundários responsáveis pelo sabor da cerveja, álcoois superiores e ésteres são considerados um grupo altamente significativo de compostos ativos de sabor e suas vias de formação bioquímica são essencialmente conhecidas. Os ésteres são compostos de sabor que geralmente são caracterizados por seus aromas frutados-florais na cerveja (HE *et al.*, 2014). Apesar de estarem presentes em pequenas concentrações na cerveja, os ésteres são os elementos aromáticos mais importantes produzidos pelas leveduras (Pires *et al.*, 2014). Isso porque além de terem um baixo limiar de detecção, podem definir seu aroma final (MEILGAARD, 1975).

Os ésteres são formados principalmente durante a fase vigorosa da fermentação primária por condensação química enzimática de ácidos e alcoóis orgânicos, portanto, a taxa de formação de ésteres está relacionada com a concentração desses dois substratos e da atividade total das enzimas envolvidas na síntese e quebra do respectivo éster (VERTREPEN *et al.*, 2003). Os ésteres voláteis da cerveja podem ser divididos em dois grupos principais: os ésteres de acetato e os ésteres etílicos de ácido graxo de cadeia média (MCFA). O primeiro grupo compreende ésteres sintetizados a partir de ácido acético (acetato) com etanol ou álcool superior. Na família dos ésteres etílicos, o etanol forma o radical álcool e o lado ácido é um ácido graxo de cadeia média (PIRES *et al.*, 2014). Os compostos de maior importância como constituintes aromáticos são o acetato de etila (aroma que lembra solvente), acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de isobutila (aroma frutado), acetato de feniletila (aroma de rosas e mel), hexanoato de etila (aroma de maçã doce) e etil octanoato (aroma de maçã verde) (VERTREPEN *et al.*, 2003).

Muitos trabalhos foram realizados para estabelecer um mecanismo unificado que explique a formação de ésteres durante a fermentação e como suas concentrações na cerveja podem ser reguladas (ZHANG *et al.*, 2013; HIRALAL *et al.*, 2014; PROCOPIO *et al.*, 2015; DACK *et al.*, 2017). Em grande medida, o equilíbrio de sabor, considerando a concentração geral dos metabólitos, é em

grande parte uma consequência da combinação da cepa de levedura e da composição do mosto. O mecanismo completo ainda está longe de ser claro, entretanto, há uma certeza de que a disponibilidade de acetil-CoA exerce uma influência reguladora na síntese de ésteres. Alterações nas condições de fermentação, como temperatura, taxa de oxigenação do mosto e composição do mosto — Tipos de carboidratos e aminoácidos —, bem como a relação Carbono/Nitrogênio, influenciam a extensão do crescimento de leveduras e consequentemente a disponibilidade de acetil-CoA (HE et al.,2014)

3.4.3 Compostos sulfurosos

Muitos compostos encontrados na cerveja contendo enxofre derivam diretamente das matérias-primas, malte e lúpulo, mas alguns são produzidos através do metabolismo da levedura (FERREIRA & GUIDO, 2018). Vários desses compostos contribuem direta e indiretamente para o sabor da cerveja, os quais podemos destacar o sulfeto de hidrogênio (H_2S), dióxido de enxofre (SO_2) e o dimetilsulfureto — DMS (BOEKHOUT & ROBERT, 2003). O dióxido de enxofre, por exemplo, atua como um antioxidante, o que retarda o processo de oxidação e da deterioração de sabor na cerveja. Por outro lado, o sulfeto de hidrogênio (H_2S) tem um aroma de ovo podre e também é precursor de outros compostos com características sensoriais indesejáveis (YOSHIDA *et al.*,2008). A formação desses compostos durante o processo de fabricação da cerveja pode ser derivada do metabolismo da levedura — sulfeto de hidrogênio e o dióxido de enxofre, da adição de agentes sulfitantes ou como componente de agentes clarificantes (ILETT, 1995). A levedura *S. cerevisiae* produz sulfito como um produto intermediário durante a redução de sulfato a sulfeto, que é importante para a biossíntese de aminoácidos contendo enxofre, como metionina e cisteína os quais são responsáveis pela estrutura aromática da cerveja (JAMES & STAHL, 2014)

Em baixas concentrações, elas podem dar uma contribuição positiva à cerveja, mas em níveis mais altos podem conferir sabores e aromas indesejáveis. Efeitos indiretos no sabor da cerveja podem surgir devido a capacidade dos compostos contendo enxofre, como o SO_2 , de formar adutos reversíveis com os compostos contendo grupos carbonila dando origem aos hidroxissulfonatos. Os

adutos formados são compostos do tipo não voláteis e, portanto, têm limiares de sabor muito mais altos do que as carbonilas livres (ILETT, 1995). Deste modo, a concentração total de sulfito presente se correlacionará com a estabilidade do produto, uma vez que podem se ligar a compostos associados ao aumento do sabor da cerveja, como acetaldeído e trans-2-nonenal (BOULTON & QUAIN, 2001).

Outro componente de aroma importante em termos de produção de cerveja é o dimetil sulfito (DMS), uma vez que em altas concentrações pode transmitir para a bebida um sabor desagradável de 'milho doce cozido' ou 'vegetal cozido', (MEILGAARD, 1975), enquanto que em baixas concentrações é considerado um componente essencial das cervejas da família lager (BRIGGS & BOULTON, 2004). Assim, uma meta particular é reduzir a concentração de DMS durante a produção do mosto, bem como evitar um aumento nas etapas seguintes, abaixo do limite definido (SCHEUREN *et al.*, 2016). O DMS surge na cerveja por duas rotas, onde na primeira, temos a degradação térmica do S-metil-metionina (SMM), durante a secagem do malte e nas fases quentes do processo de produção de cerveja (Fervura e clarificação do mosto). Já na segunda rota, temos a redução de dimetilsulfóxido (DMSO) propiciada pelo metabolismo celular durante a fermentação. (BOEKHOUT & ROBERT, 2003).

O DMS é volátil e, conseqüentemente, a maior parte presente no malte é perdida durante a mostura e a fervura, ao contrário do DMSO que é estável ao calor e persiste inalterado nessas etapas do processo. O SMM é convertido em DMS durante a elevação da temperatura, o qual já é prontamente expulso do mosto durante a fervura vigorosa (BOULTON & QUAIN, 2001). A cinética da decomposição de SMM em DMS é fortemente dependente da temperatura, podendo ser afetada também por outros parâmetros, tais como tempo, pH e extrato (SCHEUREN *et al.*, 2014). Nenhuma conversão adicional de SMM para DMS ocorre durante a fermentação, pois a temperatura é muito baixa para decomposição térmica. O SMM é assimilado por leveduras, onde é convertido em metionina. O DMSO no mosto é reduzido a DMS por levedura durante a fermentação (GIBSON *et al.*, 1985).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, F.; PEINADO, R.; MILLAN, C.; ORTEGA, J.; MAURICIO, J. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **Int. J. Food Microbiology**, v. 110, p. 34–42, 2006.

ALEXANDRE, H.; BERLOT, J.P.; CHARPENTIER, C. Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. **Biotechnol. Tech.**, v. 8, p. 295–300, 1994.

AZHARA, S. H. M.; ABDULLAA, R.; JAMBOA, S. A.; MARBAWIA, H.; GANSAU, A. J.; FAIKA, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, P. 52–61, 2017.

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

BARRIGA, E.J.C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In *Changing Diversity in Changing Environment*, Grillo O. (ed). **InTech**: Europe; 55-86, 2011.

BarthHass. BarthHaas Report Hops 2019/2020. Disponível em <https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/downloads/barth-berichte-broschueren/barth-berichte/englisch/2010-2020/barthhaas_report_2020_press_kit_en.pdf> Acesso em: 10 Junho 2021

BASSO, R. F.; ALCARDE, R. A.; PORTUGAL, C. B. Could non *Saccharomyces* yeast contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.

BLOCK, D.E.; BISSON, L.F. Ethanol tolerance in *Saccharomyces*, p 85–98. In Ciani M (ed), *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. **Research Signpost**, Trivandrum, India, 2002.

BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Yeasts in Food—Beneficial and Detrimental Aspects; **Woodhead Publishing: Sawston**, UK, pp. 363–370, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da União**. República Federativa do Brasil. Brasília, 11 dez. 2019. Edição:239 Seção 1, p. 31.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A. Malts, adjuncts and supplementary enzymes. In *Brewing Science and Practice*; **CRC Press: Boca Raton**, FL, USA, 2004.

CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B.; URRY, L.A.; CAIN, M.L.; WASSERMAN, S.A.; MINORSKY, P.V.; JACKSON, R.B. *Biologia*. 10a. ed. **Artmed**, Porto Alegre, pp. 1464, 2015.

CANONICO, L.; AGARBATI, A.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**, v. 56. 2016, p. 45-51, 2016.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 7-13, 2017.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M.M. Ethanol tolerance in yeasts. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 219–280, 1986.

COLEMAN, M.C.; FISH, R.; BLOCK, D.E. Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 73, p. 5875–5884, 2007.

COMPAGNO C., DASHKO, S.; PISKUR, J. Introduction to carbon metabolism in yeast. In: *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (Compagno C & Piskur J, eds), pp. 1–21. **Springer**, Heidelberg, 2014.

CRAUWELS, S.; STEENSELS, J.; AERTS, G.; WILLEMS, K. A.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B. *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. **BrewingScience**, v. 68, p. 110-121, 2015.

DAENEN, L.; STERCKX, F.; DELVAUX, F.R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunuscerasus*L.) used in the production of special fruit beers. **FEMS Yeast Research**. V. 8, p. 1103–14, 2008.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PISKUR, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? **FEMS Yeast Res**, v. 14, p. 826–832, 2014.

DAUM, G.; LEES, N. D.; BARD, M.; DICKSON, R., *Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.14, p. 1471–1510, 1998.

DE DEKEN, R.H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J Gen Microbiol**, v.44, p. 149–156, 1996.

DE FRANCESCO, G. D.; TURCHETTI, B., SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G. Screening of new strains of *saccharomycodes ludwigii* and *zigosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Journal of institute of Brewing**, v.121, p. 113-121, 2015.

DEPARIS, Q.; CLAES, A.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS Yeast Research**, v. 17, 2017.

DEQUIN S.; CASAREGOLA, S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 687–93, 2011.

DOMIZIO, P.; HOUSE, J.F.; JOSEPH, C.M.L.; BISSON, L.F.; BAMFORTH, C.W. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. **Journal Institute of Brewing**, v. 122, p. 599-604, 2016.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLESI, C.D.; SABATELLI, M. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 281–89, 2007.

European Food Research and Technology, v. 233, p. 721–729, 2011.

FLORES CL, RODRÍGUEZ C, PETIT T, GANCEDO C (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507–529, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: **Editora Atheneu**, pp 192, 2005.

GARRET, O. A mesa do mestre-cervejeiro: descobrindo os prazeres das cervejas das comidas verdadeiras. **Editora senac**, São Paulo, 2012.

GIBSON, B. R.; BOULTON, C. A.; BOX, W. G.; GRAHAM, N. S.; LAWRENCE, S. J.; LINFORTH, R. S. T.; SMART, K. A. Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation. **Yeast**, v. 25, p. 549-562, 2008.

GIBSON, R. M.; LARGE, P. J.; BAMFORTH, C. W. The use of radioactive labelling to demonstrate the production of dimethyl sulphide from dimethyl sulphoxide during fermentation of wort. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 397– 400, 1985.

GODDARD, M.R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. **Ecology**, v. 89, p.2077–2082, 2008.

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

HABSCHIED, K.; ŽIVKOVIĆ, A.; KRSTANOVIĆ, V.; MASTANJEVIĆ, K. Functional Beer—A Review on Possibilities. **Beverages**, v. 6, 2020.

HE, Y., DONG, J., YIN, H., ZHAO, Y., CHEN, R., WAN, X., CHEN, P., HOU, X., LIU, J., CHEN, L. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. **Journal of Institute Brewing**, v.120, p. 157–163, 2014.

HENDERSON, C. M.; BLOCK, D. E. Examining the Role of Membrane Lipid Composition in Determining the Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 2966–72, 2014.

HERNANDEZ-QUIROZ, F.; NIRMALKAR, K.; VILLALOBOS-FLORES, L.E.; MURUGESAN, S.; CRUZ-NARVAEZ, Y.; RICO-ARZATE, E.; HOYO-VADILLO, C.; CHAVEZ-CARBAJAL, A.; PIZANO-ZARATE, M.L.; GARCIA-MENA, J. Influence of moderate beer consumption on human gut microbiota and its impact on fasting glucose and beta-cell function. **Alcohol**, v. 85, p. 77-94, 2019.

HIRALAL, L.; OLANIRAN, A. O.; PILLAY, B. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 1, p. 57-64, 2014.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.

HORAK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current Genetics**, v. 59, p. 1–31, 2013.

HUANG, W. P.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. **Cell Structure and Function**, v. 27, p. 409–20, 2002.

HULL, G., Olive oil addition to yeast as an alternative to wort aeration. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, v. 45, p. 17-23, 2008.

Ilett, D.R. Aspects of the analysis, role, and fate of sulphur dioxide in beer: a review. **MBAA Technical Quarterly**, v. 32, p. 213- 221,1995.

INGLEDEW, W.M. Yeast stress and fermentation. In: The Alcohol Textbook 6th Edn. Walker G.M., Abbas C., Ingledew W.M..and Pilgrim C. (Eds.) **Ethanol Technology Institute**, Duluth, USA pp 273-285, 2017.

JAMES, N.; STAHL, U. Amino Acid Permeases and their Influence on Flavour Compounds in Beer. **Brew. Sci.**, v. 67, p. 120–127, 2014.

JOLLY, N.P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your ordinary yeast: non*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 215–237, 2014.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. Definition, classification and nomenclature of the yeasts, in: C.P. Kurtzman, J.W. Fell (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*, **Elsevier Science BV**, Amsterdam, 1998, pp. 3–5.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study. **Elsevier**, 2011.

LAFORGUE, R.; LONVAUD-FUNEL, A. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability. **Food Microbiology**, v. 32, p. 230-234, 2012.

LEI, H.; ZHAO, H.; YU, Z.; ZHAO, M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1562–1574, 2012.

LEKKAS, C.; STEWART, G. G.; HILL, A. E.; TAIDI, B.; HODGSON, J. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 113, p. 3 –8, 2007.

MAPA - Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da Cerveja, 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes>> Acesso em: 10 Junho 2021.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer Part I: flavor interaction between principal volatiles. **Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly**, v. 12, p. 107-117, 1975.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, p. 976–989, 2007.

MICHAEL KNOP. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. **C. R. Biologies**, v. 334, P. 599–606, 2011.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, p. 129–144, 2016.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S.R.; NICKENS, D.M.; ROGERS, C.M.; SAUSEN, C.; CAPUTO, R.; MILLER, J.; LI, H.; TENNESSEN, J.M.; BOCHMAN, M.L. Primary Souring: A novel bacteria-free method for sour beer. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76-84, 2018.

PICKERELL, A. T. W. The influence of free alpha-amino nitrogen in sorghum beer fermentations, **J. Inst. Brew.**, v. 92, p. 568–571, 1986.

PIERCE, J.S. The role of nitrogen in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 378-81, 1987.

PIRES, E.J., TEIXEIRA, J.A., BRÁNYIK, T. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 1937–1949, 2014.

PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends Genet**, v. 22, p.183–86, 2006.

PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces cerevisiae* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, p. 183–186, 2006.

PROCOPIO, S.; QIAN, F.; Becker, T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, v. 233, p.721-729, 2011.

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

PUGH, T. A.; MAURER, J. M.; PRINGLE, A. T. The impact of wort nitrogen limitation on yeast fermentation performance and diacetyl. **Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.**, v. 34, p. 185–189, 1997.

QUESADA-MOLINA, M.; MUÑOZ-GARACH, A.; TINAHONES, F.J.; MORENO-INDIAS, I. A New Perspective on the Health Benefits of Moderate Beer Consumption: Involvement of the Gut Microbiota. **Metabolites**, v.9, 2019.

ROWE, E. S., Effects of Ethanol on Membrane Lipids. In *Alcohol and neurobiology: receptors, membranes, and channels*. **Ed. CRC Press**, Inc.: Boca Raton, Florida, p. 239 – 268, 1992.

ROZPEZDOWSKA, E.; HELLBORG, L.; ISHCHUK, O.P.; ORHAN, F.; GALAFASSI, S.; MERICO, A.; WOOLFIT M, COMPAGNO, C.; PISKUR, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, v. 2, 302, 2011.

SANKH, S. N.; DESHPANDE, P. S.; ARVINDEKAR, A. U. Improvement of ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* by enhancement of biomass and nutrient supplementation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 1237–1245, 2011.

SCHEUREN, H.; BALDUS, M.; METHNER, F.-J.; DILLENBURGUER, M. Evaporation behaviour of DMS in NA aqueous solution at infinite dilution. **J.Inst.Brewing**, v.122, p. 181-190, 2016.

SCHEUREN, H.; TIPPMANN, J.; METHNER, F.-J.; SOMMER, K. Decomposition kinetics of dimethyl sulphide, **J.Inst.Brewing**, v. 120, p. 474–476, 2014.

SOARES, E.V.; SOARES, H.M.V.M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. **Environ Sci Pollut Res**, v. 19, p. 1066–1083, 2012.

SPITAEELS F.; WIEME, A.D.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.M.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L., VANDAMME, P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS One**, v. 9, 2014.

STEENSELS, J., MEERSMAN, E., SNOEK, T., SAELS, V., & VERSTREPEN, K. J. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6965–6975, 2014.

STEENSELS, J., SNOEK, T., MEERSMAN, E., PICCA NICOLINO, M., VOORDECKERS, K., & VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 947–995, 2014.

STEENSELS, J.; DAENEN, L.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H; VERSTREPEN, K. J. Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, P. 24-38, 2015.

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

STEWART, G. G., HILL, A. E., AND RUSSELL, I. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains, **Journal of Institute Brewing**, v.119, p. 202–220, 2013.

STEWART, G. Saccharomyces species in the Production of Beer. **Beverages**, v. 2, 2016.

TAPSOBA, F.; LEGRAS, J.L.; SAVADOGO, A.; DEQUIN, S.; TRAORE, A.S. Diversity of Saccharomyces cerevisiae strains isolated from Borassus akeassii palm wines from Burkina Faso in comparison to other African beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 128–133, 2015.

TOKPOHOZIN, S. E.; FISCHER, S.; BECKER, T. Selection of a new Saccharomyces yeast to enhance relevant sorghum beer aroma components, higher alcohols and esters. **Food Microbiology**, v. 83, p. 181–186, 2019.

VALENTE JUNIOR, A.S.; ALVES, F.C. Bebidas alcoólicas: Cerveja. **Banco do Nordeste**, ano 1, n. 2, out/ 2016.

VAN DER KLEI, I., VEENHUIS, M.; BRUL, S.; KLIS, F. M.; DE GROOT, P. W. J.; MULLER, W. H.; VAN DRIEL, K.G. A.; BOEKHOUT, T. Cytology, cell walls and septa: a summary of yeast cell biology from a phylogenetic perspective. Pp. 111–128 in C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout, eds. The yeasts, a taxonomic study, 5th edn. **Elsevier**, Amsterdam, 2011.

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

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

VARELA, C.; PIZARRO, F.; AGOSIN, E. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 70, p. 3392–3400, 2004.

WALKER, G. M. and WALKER, R. S. K. Walker. Enhancing yeast alcoholic fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v.105, 1-35, 2018.

WALKER, G. M. Yeasts. In M. Schaechter (Ed.), Desk encyclopedia of microbiology (2nd ed., pp. 1174-1187). **Academic Press/Elsevier**, 2009.

WALKER, G. M.; DE NICOLA, R.; ANTHONY, S.; LEARMONTH, R. Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations, In: Inst. Brew. Dist., **Asia Pac. Sec. Conv.** 2006, pp. 19-24.

WALKER, G. M.; STEWART, G.G. Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, v. 2, 2016.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. In **Advances in Applied Microbiology**, v. 105, 2018.

WALKER, G.M.; VAN DIJCK, P. Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. In: The Yeast Handbook – Yeasts in Foods and Beverages. Fleet G. and Querol A. (Eds.). **Springer**, Heidelberg, Germany vol 5 Chapter 5, p. 111-152, 2005.

WALKER, G.M; BASSO, T.O. Mitigating stress in industrial yeasts, **Fungal Biology**, v. 124, p. 387-397, 2020.

WANG, S. S.; BRANDRISS, M. C., Proline utilisation in Saccharomyces cerevisiae: sequence, regulation, and mitochondrial localisation of the PUT1 gene product. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 4431–4440, 1987.

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

ZAINASHEFF, J.; WHITE, C. Yeast: the practical guide to beer fermentation. **Brewer's publications**, Colorado, 205 pp, 2010.

ZHANG, C.; LIU, Y.; QI, Y.; ZHANG, J.; DAI, L.; LIN, X.; XIAO, D. Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains. **Eur Food Res Technol**, v. 236, p. 1009–1014, 2013.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS E NÃO COMERCIAIS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS POR FERMENTAÇÃO PURA, MISTA E SEQUENCIADA COM *SACCHAROMYCES CEREVISEA*

RESUMO

Leveduras de diversos gêneros e espécies são capazes de converter açúcares em etanol e dióxido de carbono, bem como em outros metabólitos menores, um processo químico conhecido como fermentação alcoólica. No passado, a fermentação espontânea era praticada e caracterizada por leveduras não *Saccharomyces* durante as primeiras fases da fermentação, enquanto as leveduras do gênero *Saccharomyces* dominavam as fases posteriores. Hoje, a inoculação de culturas de leveduras puras proporciona melhor controle do processo, entretanto, limitando a complexidade de sabor e aroma gerados por diversas linhagens e espécies. Diante do exposto, este artigo tem a finalidade de fazer um estudo exploratório da cinética fermentativa de leveduras não convencionais na produção de cerveja, seja em fermentação simples, mista ou sequenciada, em conjunto com uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Para avaliar o comportamento da fermentação e sua eficácia foram analisadas a produção de álcool, consumo de substrato, pH, crescimento celular e viabilidade dos microrganismos ao longo do processo. O estudo indicou que as leveduras não convencionais em fermentação pura apresentaram rendimento inferior, quando comparadas às cepas comerciais de *S. cerevisiae*, considerando os parâmetros fermentativos, com atenuação real variando entre 8,84% e 17,79%. Na etapa de fermentação mista entre leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* não foram observadas diferenças significativas em relação à fermentação simples (*S. cerevisiae*), considerando os parâmetros fermentativos. Na etapa de fermentação sequenciada, com 48 horas de diferença entre as inoculações, houve uma queda no rendimento do processo, com diferenças significativas em relação ao controle (*S. cerevisiae*) para os principais parâmetros fermentativos. Considerando que a maioria das cepas de leveduras não convencionais apresentou crescimento de biomassa e boa adaptabilidade ao meio fermentativo, *L. thermotolerans* e *W. anomalus* se mostraram promissoras para a produção de

cervejas de baixo teor alcoólico. Em fermentação mista e sequenciada, novos estudos são necessários para verificar possíveis impactos nas características sensoriais das cervejas.

Palavras-chaves: bioprocesso, cinética fermentativa, interação microbiana

ABSTRACT

Yeasts of several genera and species are capable of converting sugars to ethanol and carbon dioxide, as well as other minor metabolites, a chemical process known as alcoholic fermentation. In the past, spontaneous fermentation was practiced and characterized by non-Saccharomyces yeasts during the early stages of fermentation, while yeasts of the genus *Saccharomyces* dominated the later stages. Today, the inoculation of pure yeast cultures provides better process control, however, limiting the complexity of flavor and aroma generated by different strains and species. Given the above, this article aims to carry out an exploratory study of the fermentative kinetics of unconventional yeasts in beer production, whether in simple, mixed or sequenced fermentation, together with a commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To evaluate the fermentation behavior and its effectiveness, the alcohol production, substrate consumption, pH, cell growth and viability of microorganisms throughout the process were analyzed. The study indicated that the unconventional yeasts in pure fermentation showed lower yield when compared to commercial strains of *S. cerevisiae*, considering the fermentative parameters, with real attenuation varying between 8.84% and 17.79%. In the stage of mixed fermentation between unconventional yeasts and *S. cerevisiae*, no significant differences were observed in relation to simple fermentation (*S. cerevisiae*), considering the fermentation parameters. In the step of sequential fermentation, with 48 hours of difference between inoculations, there was a decrease in the yield of the process, with significant differences in relation to the control (*S. cerevisiae*) for the main fermentation parameters. Considering that most of the unconventional yeast strains showed biomass growth and good adaptability to the fermentation medium, *L. thermotolerans* and *W. anomalus* showed promise for the production of low-alcohol beers. In mixed and sequenced fermentation, further studies are needed to verify possible impacts on the sensory characteristics of beers.

Keywords: bioprocess, fermentation kinetics, microbial interaction

4.1 INTRODUÇÃO

Leveduras de diversos gêneros e espécies são capazes de converter açúcares em etanol e dióxido de carbono, bem como em outros metabólitos secundários importantes, como glicerol, acetato, succinato, piruvato, álcoois superiores e ésteres (ALBERGARIA & ARNEBORG, 2016). Esse processo bioquímico, conhecido como fermentação alcoólica, é responsável por alguns das mais importantes bebidas que a humanidade já conheceu, como vinho, cerveja, cidra, whisky, dentre outras (GUTIERREZ *et al.*, 2017).

No passado, o processo de fermentação não industrial era caracterizado pela fermentação espontânea, onde um *pool* de leveduras e bactérias presentes na superfície de frutas e grãos disputavam as fontes de carbono durante as primeiras fases da fermentação. Na fase final do processo as espécies do gênero *Saccharomyces* dominavam o meio fermentativo, devido ao rápido consumo de açúcar do meio, ao aumento da concentração de etanol e redução de pH (PISKUR *et al.*, 2006; TAPSOBA *et al.*, 2015). Esta espécie possui várias características que explicam seu status atual como microrganismo industrial predominante, tais como eficiência na produção de etanol, capacidade fermentativa em meios aeróbios e anaeróbios e alta tolerância ao etanol (GODDARD, 2008; STREENSELS & VERSTREPEN, 2014).

Com a industrialização e os avanços tecnológicos, as fermentações passaram a ser realizadas com leveduras selecionadas e funcionais. A inoculação de culturas de leveduras puras proporciona melhor controle do processo, garante uma fermentação rápida e completa e, com isso, melhora a reprodutibilidade do produto final e confere uma consistência nas suas características sensoriais (RAINIERI & PRETORIUS, 2000; DEQUIN & CASAREGOLA, 2011). No entanto, esta prática limita a complexidade do sabor e não produz os aromas e características únicos gerados por diversas linhagens e espécies. Dessa forma, os cervejeiros estão retornando à fermentação espontânea pela microflora local na tentativa de introduzir mais caráter e complexidade em seus produtos (DAENEN *et al.*, 2008; DOMIZIO *et al.*, 2007).

Entretanto até o ano de 2005, cerca de 2.500 espécies de leveduras foram descritas, representando quase 1,5% do total de espécies estimadas, ou seja, ainda há uma biodiversidade considerável de leveduras inexploradas no planeta Terra (BARRIGA *et al.*, 2011). Isso significa que existe uma lacuna imensa em

nosso conhecimento sobre a biodiversidade e o "pool genético" natural disponível de leveduras selvagens.

Recentemente, tem havido um interesse crescente no uso de leveduras não convencionais no setor de bebidas devido às suas propriedades incomuns e contribuições de metabólitos específicos (Jolly *et al.*, 2014; Gutierrez *et al.*, 2017). Na produção de vinhos, o uso de leveduras não convencionais puras ou em fermentação mista tem sido estudado para produção de bebidas de baixo teor alcoólico (Ciani *et al.* 2016), melhoria de processos nas vinícolas (Villalba *et al.*, 2016) e influência nas propriedades sensoriais (Hu *et al.*, 2016; Belda *et al.*, 2016). Na produção de cerveja, os estudos utilizando leveduras não convencionais começaram recentemente (BASSO *et al.*, 2016), focando nas contribuições dos microrganismos para adicionar metabólitos secundários (CANÔNICO *et al.*, 2016; CANONICO *et al.*, 2017), produção de cervejas com baixo teor alcoólico (MICHEL *et al.*, 2016; FRANCESCO *et al.*, 2015) ou para desenvolver produtos funcionais e de baixo valor calórico (STEENSELS *et al.*, 2015).

Uma das principais leveduras não convencionais utilizadas na fabricação de cervejas artesanais são os microrganismos do gênero *Brettanomyces*, como no caso das belgas *lambic* e *gueuze*, onde o resfriamento do mosto em tanques abertos dá origem à fermentação espontânea, responsável pela complexidade sensorial do produto. (SPITAEELS *et al.*, 2014). Se por um lado podem ser considerados cruciais para o perfil de sabor de certas cervejas especiais, dando origem a compostos com notas de “estábulo”, cravo, “cela de cavalo”, medicinal, picante e floral, por outro também podem ser considerados como microrganismos deteriorantes em outras bebidas, como o vinho (CRAUWELS *et al.*, 2016).

Em um desses estudos para identificar novas cepas capazes de produzir cerveja, Osburn e colaboradores (2018) descobriram cepas de 5 (cinco) leveduras não convencionais — *Hanseniaspora viniae*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces japonicus* e *Wickerhamomyces anomalus* — que apresentavam atividade heterofermentativa, ou seja, foram capazes de transformar açúcares em ácido lático, etanol e gás carbônico. Testes em larga escala demonstraram que algumas dessas leveduras apresentaram alta capacidade de consumo dos açúcares do mosto (boa produtividade em relação ao álcool), floculavam bem (agregação da biomassa para diminuir turbidez),

produziam níveis de ácido láctico desejáveis e compostos de aroma e sabor prazerosos.

Essas leveduras não convencionais também têm sido utilizadas em co-fermentação ou fermentação sequenciada com espécies *Saccharomyces*, buscando possíveis efeitos sinérgicos. Em um estudo de co-fermentações entre diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com *Torulaspora delbrueckii*, para a fabricação de cerveja, Canonico *et al.* (2016) mostraram um efeito sinérgico entre as leveduras, capaz de aumentar a produção de ésteres e alcoóis superiores, mostrando-se uma estratégia eficaz para produzir diferenciais aromático perceptíveis quando comparado com as fermentações tradicionais. Em um estudo conduzido por Holt e colaboradores (2017), a fermentação sequenciada de leveduras não convencionais com posterior inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* também apresentou resultados promissores na produção de cerveja. Houve um acréscimo na produção de compostos fenólicos desejáveis, de acordo com a espécie de levedura não convencional utilizada, tais como acetato de isoamila (*Pichia kluyveri*), compostos etil-fenólicos (*Brettanomyces*) e 4-vinil guaiacol (*Torulaspora delbrueckii*).

Diante do exposto, este artigo tem a finalidade de fazer um estudo exploratório da cinética fermentativa de leveduras não convencionais na produção de cerveja, seja em fermentação simples, mista ou sequenciada, em conjunto com uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As matérias-primas (Água mineral, extrato de malte seco, levedura comercial) foram adquiridas em comércio local especializados em produtos para cervejarias. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química (Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em 03 etapas, a saber:

1ª Etapa: Seleção de microrganismos e solicitação de exemplares aos bancos de levedura, conforme estudos similares realizados por outros autores.

2ª Etapa: Ensaios fermentativos e seleção preliminar das leveduras não convencionais

3ª Etapa: Estudo do comportamento cinético das leveduras não convencionais em culturas puras e mistas (Co-fermentação e fermentação sequenciada).

4.2.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Para a seleção das leveduras foram consideradas as espécies não convencionais utilizadas em trabalhos realizados por Domizio et al. (2016) e Osburn et al. (2018), na produção de cerveja e vinho, tanto em fermentação simples como em fermentação mista. Os bancos de leveduras das instituições fundação André Tosello, Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), Micoteca URM (CCB-UFPE), Coleção de cultura de Microbiologia Agrícola (CCMA-UFLA) e *Agriculture Research Service Culture Collection* (NRRL), foram consultados com o fim de verificar a disponibilidade dos micro-organismos para a presente pesquisa.

Na tabela 1, estão as espécies de leveduras solicitadas (n = 28) e seus respectivos bancos de origem. As cepas de levedura das espécies *Hansenula anomala* (E.C.Hansen) e *Candida pelliculosa* Redaelli são sinônimos da espécie *Wickerhamomyces anomalus*, assim como a cepa de levedura *Torulopsis dattila* (Kluiver) Lodder é um sinônimo para *Lachancea thermotolerans*, de acordo com a classificação de Kurtzman e outros (2008).

Uma cepa de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* da marca Safeale US-05 (Fermentis, Lesaffre, France) foi utilizada para realizar a fermentação mista.

4.2.2 ENSAIOS FERMENTATIVOS E SELEÇÃO PRELIMINAR DAS LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS

4.2.2.1. Replicação das leveduras, manutenção e armazenamento

As leveduras selecionadas para este estudo foram replicadas em 4 (quatro) tubos de ensaio por meio de técnicas estéreis de transferência, com repique em meio de cultura contendo Agar Sabouraud® e extrato de levedura. O meio de

cultura foi preparado com 1L de água destilada, 20g de Ágar bacteriológico, 5g de extratos de levedura, 40g de dextrose e 10g de Peptona. A peptona, dextrose e o extrato de levedura foram dissolvidos na água destilada. Posteriormente o ágar foi adicionado à solução e levada ao aquecimento até dissolver completamente. O meio de cultura foi dispensado em tubos de ensaio hermeticamente fechados e levados à autoclave por 15 minutos a 121°C.

Tabela 1 - Espécies, substratos e respectivos bancos de origem das leveduras

Cepa	Espécie	Substrato	Banco de origem
URM 814	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	Desconhecido	CCB-UFPE
URM 2631	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	Desconhecido	CCB-UFPE
URM 2653	<i>Torulopsis dattila</i> (Kluiver) Lodder	Polpa de Mangaba	CCB-UFPE
URM 2654	<i>Torulopsis dattila</i> (Kluiver) Lodder	Polpa de Mangaba	CCB-UFPE
URM 3964	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de acerola	CCB-UFPE
URM 3971	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de maracujá	CCB-UFPE
URM 3981	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de graviola	CCB-UFPE
URM 3983	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de goiaba	CCB-UFPE
URM 3987	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de goiaba	CCB-UFPE
URM 3989	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de acerola	CCB-UFPE
URM 3992	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Polpa de cupuaçu	CCB-UFPE
URM 206	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	Desconhecido	CCB-UFPE
URM 815	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	Desconhecido	CCB-UFPE
URM 1424	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	Desconhecido	CCB-UFPE
URM 3974	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	Desconhecido	CCB-UFPE
CCMA-820	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Silagem de milho	CCMA-UFLA
CCMA-0358	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Café natural	CCMA-UFLA
CCMA-0485	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Grão de café	CCMA-UFLA
Y-30	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Fermento de pão	ARS-NRRL
y-407	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Cogumelos	ARS-NRRL
Y-12664	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Geleia de ameixa	ARS-NRRL
Y-2231	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uvas	ARS-NRRL
Y-6175	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Desconhecido	ARS-NRRL
Y-6178	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Desconhecido	ARS-NRRL
Y-5599	<i>Lachancea fermentati</i>	Desconhecido	ARS-NRRL
Y-17054	<i>Lachancea fermentati</i>	Carvalho	ARS-NRRL
Y-17529	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Solo de vinícola	ARS-NRRL
Y-1274	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Desconhecido	ARS-NRRL

O crescimento celular das réplicas ocorreu em estufa (Modelo Quimis® Q317M) por um período de 15 dias, com a temperatura controlada de 27°C ± 2°C.

As espécies de leveduras foram armazenadas em meio de manutenção a temperatura controlada de $2^{\circ}\text{C} \pm 0,15^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.2. Preparo do mosto

O mosto cervejeiro foi preparado em um Becker graduado de 2000 mL a partir da adição de extrato de malte seco (DME) *DryBrew* (Liotécnica) em água mineral a $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, até a completa dissolução. O mosto foi levado à fervura por um período de 20 minutos com a utilização de um ebulidor mergulhão de 1000W (Cherubino), a fim de promover a isomerização dos alfa-ácidos do lúpulo. No início da fervura foi adicionado o lúpulo Saaz a 3,75% de alfa-ácidos (Barth Haas / LNF). Em seguida, o mosto foi esterilizado a em autoclave (Prismatec®) a $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo até atingir a temperatura de $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. No fim do processo, o mosto cervejeiro apresentou uma densidade original de 1,038 SG e 16 IBU (*International Bittering Units*).

4.2.2.3. Preparo do inóculo e pré-fermentação

Para ativação das leveduras foi utilizado como meio de propagação o mosto fermentativo (item 2.2.2). Em tubos de ensaios contendo 10 mL do meio de propagação foram adicionadas uma alçada de cada uma das leveduras replicadas conforme método descrito no item 2.2.1. Os tubos de ensaio foram mantidos sob agitação em uma incubadora com mesa agitadora orbital (Quimis®) durante 48 horas em temperatura controlada de 19°C , para que houvesse a aeração e aceleração do crescimento celular (White & Zainasheff, 2010).

4.2.2.4. Estudo do perfil cinético fermentativo

Após a etapa de propagação dos microrganismos (item 2.2.3), as leveduras foram inoculadas em Erlenmeyer contendo 200 mL de mosto cervejeiro (item 2.2.2). A fermentação foi conduzida por um período de 15 (quinze) dias a temperatura de $19^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando refrigerador acoplado a um controlador de temperatura (Modelo STC-1000). Durante a fermentação, diariamente, 1 (uma) amostra foi retirada para a determinação do pH, consumo de substrato (glicose), concentração de álcool, °Brix e viabilidade celular, com vistas a estabelecer o perfil

cinético fermentativo. As cepas que apresentaram os melhores resultados em relação ao perfil cinético foram selecionadas e reservadas para a próxima etapa.

4.2.3 FERMENTAÇÃO MISTA E SEQUENCIADA

4.2.3.1 Preparo do mosto

O mosto cervejeiro foi preparado em um tanque de alumínio de 20 litros acoplado a uma resistência elétrica de 2000 W, através da diluição de extrato de malte seco (DME) em água mineral à temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Após a fervura, o mosto foi resfriado com um trocador de calor de alumínio (Chiller) até atingir a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o mosto foi distribuído entre os tanques de fermentação com volume de 3L, os quais foram hermeticamente fechados e colocados sob refrigeração até atingirem a temperatura de fermentação ($19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). No fim do processo, o mosto cervejeiro atingiu a densidade original de 1,050 SG e 18 IBU (*International bittering units*).

4.2.3.2 Preparo do inóculo e pré-fermentação

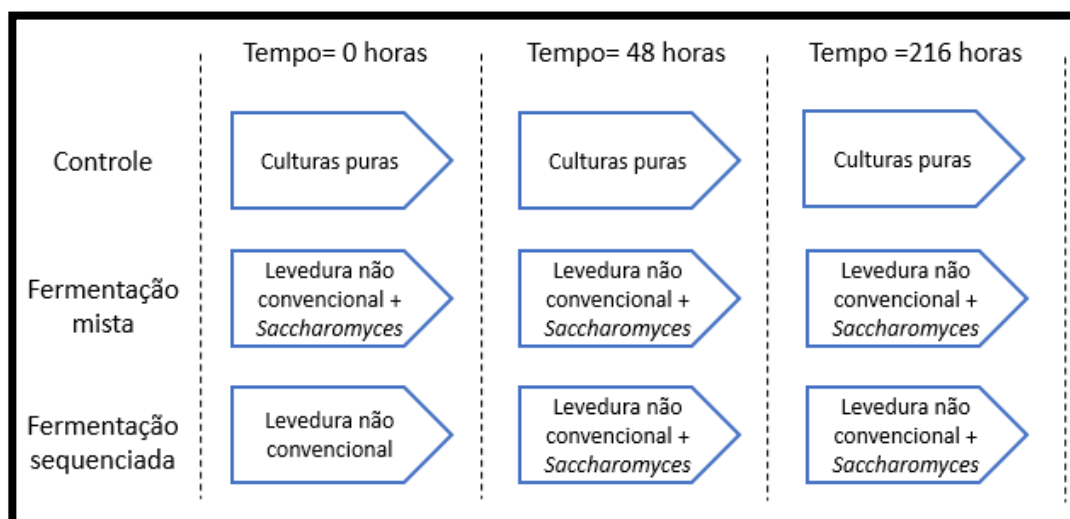
Para ativação das leveduras foi utilizado como meio de propagação o mosto fermentativo, obtido conforme descrito no item 2.2.2. Em tubos de ensaios contendo 10 ml do meio de propagação foram adicionadas uma alçada de cada uma das leveduras replicadas como descrito no item 2.2.1. Os tubos de ensaio foram mantidos sob agitação em uma incubadora com mesa agitadora orbital (Quimis) durante 48 horas em temperatura controlada de $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para que houvesse a aeração e aceleração do crescimento celular (White & Zainasheff, 2010).

Para garantir uma quantidade de leveduras satisfatória, considerando que a fermentação mista foi realizada em tanques de fermentação com volume de 3L, foi realizada uma segunda etapa de propagação de microrganismos. Após a primeira etapa de propagação, as leveduras constantes nos tubos de ensaio foram colocadas em Erlenmeyer contendo 100 ml de mosto cervejeiro (item 2.2.2). Os Erlenmeyer foram mantidos sob agitação em uma incubadora com mesa agitadora orbital (Quimis) durante 48 horas em temperatura controlada de $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para que houvesse a aeração e aceleração do crescimento celular (White & Zainasheff, 2010).

4.2.3.3 Estudo do Comportamento Cinético

As cepas de leveduras que apresentaram os melhores resultados em relação à cinética de fermentação foram selecionadas para o processo de fermentação mista e sequenciada (item 2.2.3), juntamente com *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira parte dos ensaios ocorreu por fermentação simultânea entre culturas não convencionais selecionadas na etapa anterior e a *Saccharomyces cerevisiae*. A segunda parte ocorreu por fermentação sequenciada entre os microrganismos selecionados na pesquisa e *Saccharomyces cerevisiae*, com uma diferença de 48h entre as inoculações, conforme fluxograma apresentado na figura 1. Este critério foi adotado para estudar a interação entre as diferentes espécies de leveduras e seus possíveis benefícios nos parâmetros fermentativos, conforme estudos em fermentação mista e sequenciada na produção de cervejas e vinhos (GOBBI et al., 2013; TRISTEZZA et al., 2016; CANONICO et al., 2017; CAPECE et al., 2018).

Figura 1 - Fluxograma de fermentação mista e sequenciada



As culturas puras de leveduras não convencionais e *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas como controle. Foram realizados estudos comparativos entre as culturas puras e mistas, considerando como parâmetros fermentativos o pH, viabilidade celular, concentração de sólidos solúveis totais (Brix), produção de álcool e concentração de substrato. Após a etapa de

propagação dos microrganismos (item 2.3.2), as leveduras foram inoculadas em tanques de fermentação de 3L contendo 1,8L de mosto cervejeiro (item 2.3.1). A fermentação foi conduzida por um período de 9 (nove) dias a temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando refrigerador acoplado a um controlador de temperatura (Modelo STC-1000), com a retirada de 1 (uma) amostra a cada 48 horas. As amostras foram retiradas com 3 repetições.

4.2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.2.4.1. pH

O pH foi medido usando um eletrodo, acoplado a um pHmetro digital (TECNOPON mPA 210^a), previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0.

4.2.4.2. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada por contagem de levedura em Câmara de Neubauer espelhada, por microscopia ótica (Nikon Eclipse E200). A solução de azul de metileno 0,02 % p/v foi utilizada para a identificação de células viáveis ou não, e o percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a formula abaixo:

$$Viabilidade\ celular(\%) = \frac{células\ vivas \times 100}{células\ totais}$$

4.2.4.3 Concentração do substrato

Os açúcares redutores foram quantificados por método de espectrofotométrico, no comprimento de onda de 540 nm, utilizando como reagente de redução o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como proposto por Miller (1959). Para a determinação utilizou-se espectrofotômetro (Astral Científica, Paraná, Brasil) e cubetas de vidro, com percurso ótico de 10 mm.

4.2.4.4 Determinação do teor de álcool

Para a determinação da formação de álcool foram utilizando os dados obtidos da análise dos sólidos solúveis, os quais foram confrontados com a

respectiva concentração de álcool exibida no site Brewer's Friend (<https://www.brewersfriend.com/>).

4.2.4.5 Determinação de Sólidos Solúveis Totais

A medida de concentração de sólidos solúveis no mosto foi determinada em refratômetro de bancada e expressa em °Brix (ABBE-RMT; Bel Engineering).

4.2.5 Análise de dados

A análise da variância (ANOVA) foi aplicada aos dados experimentais para as características principais das cervejas. As médias foram analisadas usando o software STATISTICA 7. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Estudo do perfil cinético das leveduras não convencionais

Na tabela 2 temos os 11 exemplares que foram utilizados na segunda etapa do estudo — ensaios fermentativos e seleção preliminar das leveduras não convencionais —, uma vez que parte dos 28 exemplares solicitados não puderam ser enviados pelos bancos de leveduras.

Tabela 2 - Cepas, espécies, sinônimos e respectivos bancos de origem das leveduras utilizadas no estudo

Cepa	Espécie	Sinônimo	Banco de origem
URM 814	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 2631	<i>Hansenula anomala</i> (E.C. Hansen)	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 2653	<i>Torulopsis dattila</i> (Kluiver) Lodder	<i>L. thermotolerans</i>	CCB-UFPE
URM 2654	<i>Torulopsis dattila</i> (Kluiver) Lodder	<i>L. thermotolerans</i>	CCB-UFPE
URM 3964	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3971	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3981	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3983	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3987	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3989	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE
URM 3992	<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	<i>W. anomalus</i>	CCB-UFPE

Na Tabela 3 estão apresentadas as características dos microrganismos utilizados na fase preliminar de seleção de leveduras não convencionais, como teor alcoólico, atenuação, pH final, viabilidade celular e concentração populacional das leveduras ao longo da fermentação. Evidencia-se que esses microrganismos apresentaram boa adaptação ao meio fermentativo, mostrando crescimento populacional e viabilidade celular acima de 92% ao fim do processo, com exceção da cepa URM 3992 que apresentou viabilidade de 85,77%.

Em relação à atenuação do mosto, a qual mede o consumo percentual de substrato em relação à densidade original, e produção de álcool, as leveduras apresentaram baixa capacidade fermentativa, comparado às cepas comerciais *S. cerevisiae*, provavelmente devido a sua incapacidade de consumir açúcares mais complexos como maltose e maltotriose. Apesar do exposto, destacamos as cepas URM 2631 e URM 2654 com os melhores resultados, atingindo a marca aproximada de 1% de álcool e uma atenuação do mosto próximo à 18%.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos obtidos ao fim do processo

Cepa	Teor Alcoólico	Atenuação	pH final	Viabilidade celular	Concentração celular (Células/ml)	
				Final	Inicial	Final
URM 814	0,77%	13,68%	4,48	92,42%	2,00E+07	4,16E+07
URM 2631	0,98%	17,79%	4,45	98,04%	1,70E+07	3,06E+07
URM 2653	0,34%	8,84%	4,48	92,59%	1,10E+07	1,22E+07
URM 2654	0,98%	17,79%	4,58	94,44%	1,60E+07	5,40E+07
URM 3964	0,77%	13,68%	4,57	96,78%	5,10E+07	1,89E+08
URM 3971	0,34%	8,84%	4,6	94,14%	9,30E+07	5,76E+07
URM 3981	0,55%	9,68%	4,57	98,62%	5,30E+07	6,50E+07
URM 3983	0,55%	9,68%	4,58	97,72%	4,10E+07	4,93E+07
URM 3987	0,77%	13,68%	4,45	97,54%	6,10E+07	6,39E+07
URM 3989	0,34%	8,84%	4,52	97,12%	3,50E+07	4,16E+07
URM 3992	0,34%	8,84%	4,53	85,77%	8,20E+07	1,08E+08

** (V/V)

***pH inicial= 4,84

Observa-se que as cepas URM 814, URM 2631, URM 2653 e URM 2654 promoveram redução do pH em torno de 9% durante a fermentação. As demais cepas promoveram uma redução menor no pH, variando entre 6% a 7%. A redução do pH está relacionada com a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação, derivada diretamente do ciclo do ácido tricarboxílico ramificado, que

é característico da fisiologia anaeróbica reprimida na levedura de cerveja (Boulton; Quain, 2001).

Dentre as leveduras testadas, as cepas URM 2631 (*W. anomalus*) e URM 2654 (*L. thermotolerans*) foram selecionadas em função da melhor performance fermentativa agregada, considerando conjuntamente a produção de álcool, consumo de açúcares, viabilidade celular e densidade populacional. Essas cepas e uma levedura da espécie *S. cerevisiae* foram utilizadas para etapa subsequente de fermentação em cultura pura e mista.

Em um estudo conduzido por Domizio e colaboradores (2016), 3 cepas distintas de *L. thermotolerans* foram utilizadas na fabricação de cerveja. As 3 cepas de levedura produziram resultados satisfatórios em relação à produção de álcool (apenas 6-12% menos do que as cepas de *S. cerevisiae*), viabilidade celular e pH, quando comparados as cepas comerciais. Apesar do exposto, foi identificado que este comportamento era fortemente dependente da cepa de levedura e não um comportamento inato da espécie.

Em um estudo sobre a utilização de leveduras não convencionais para produção de cerveja, Osbourn e colaboradores (2018) identificaram que algumas cepas de *L. thermotolerans* e *W. anomalus* apresentaram atenuação do mosto de 40%-60% e 83%, respectivamente, resultado satisfatório comparados às cepas de *S. cerevisiae*. Além disso, essas espécies foram capazes de reduzir o pH das cervejas para valores entre 3,21-3,42.

Por fim, em um estudo conduzido por Canonico e colaboradores (2019) foram utilizadas 5 cepas de *L. thermotolerans* e 12 cepas distintas de *W. anomalus* para identificar novos microrganismos capazes de produzir cerveja. Desse total, apenas 2 cepas de *L. thermotolerans* se mostraram competitivas comparadas com cepas comerciais de *S. cerevisiae*, enquanto que o melhor desempenho dentre todas as cepas de *W. anomalus* foi capaz de atenuar apenas 22% do mosto.

Esses resultados mostram que a capacidade de fermentar os açúcares mais complexos do mosto para produzir cerveja não é característica inata das espécies, mas um comportamento individual das cepas, uma vez que os exemplares foram obtidos de substratos e bancos distintos.

4.5.2 Fermentação mista e sequenciada entre *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans*

A cinética de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans*, em fermentação pura, mista e sequenciada são mostradas na Figura 2. Em relação dinâmica da população, verifica-se redução da concentração celular tanto de *S. cerevisiae* quanto de *L. thermotolerans*, no cenário de fermentação mista (Figura 2B), mostrando algum grau de competição nutricional entre ambas as cepas, influenciando negativamente o crescimento individual de cada uma. Apesar do exposto, houve a coexistência de *S. cerevisiae* e as espécies de leveduras não convencionais, com dominância de *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação, haja vista que a fermentação foi completa. Em relação às determinações analíticas, a cerveja produzida em fermentação mista atingiu um teor alcoólico de 4,91% (V/V) e um pH final de 4,11. Não houve diferença significativa em relação à produção de etanol, açúcares redutores, densidade específica e pH, quando comparados ao controle (Tabela 4). Esses resultados podem ser explicados pela menor atividade fermentativa da cepa de *L. thermotolerans* em comparação com cepas de levedura *Saccharomyces*, como já mostrado neste estudo.

Um estudo recente, realizado por Canonico e colaboradores (2019), obteve-se resultados semelhantes ao presente estudo. Na fermentação mista entre *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* para fabricação de cerveja não houve diferença significativa para os principais parâmetros de fermentação (álcool, açúcar residual e pH), com exceção da densidade final, quando comparados ao controle. Além disso, houve co-existência entre as leveduras, mas com prevalência de *S. cerevisiae* sobre *L. thermotolerans*, em relação à dinâmica populacional.

No cenário de fermentação sequenciada, onde há um intervalo de 48h entre as inoculações, as concentrações celulares de ambas as leveduras se mantiveram praticamente inalteradas até 96h após o início da fermentação. Posteriormente, foi identificada uma tendência de declínio na biomassa das leveduras até o fim da fermentação, tanto no caso da levedura *L. thermotolerans* quanto de *S. cerevisiae*, entretanto, em grau bem superior ao apresentado na fermentação mista (Figura 2C). Em relação às determinações analíticas, a cerveja produzida em fermentação mista atingiu um teor alcoólico de 3,65% (V/V), um pH

final de 4,15 e uma concentração de açúcares redutores de 37,98 g/L. Não houve diferença significativa em relação à produção de etanol, açúcares redutores, densidade específica e pH, quando comparados ao controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Determinações analíticas das cervejas produzidas com *L. thermotolerans* em fermentação pura, mista e sequenciada

Determinação Analítica	Cultura pura <i>S. cerevisiae</i> (Controle)	Cultura pura <i>L. thermotolerans</i>	Fermentação mista	Fermentação sequenciada (48h)
Etanol*	4,93 ± 0,09 ^a	1,06 ± 0,05 ^c	4,91 ± 0,08 ^a	3,65 ± 0,15 ^b
Açúcares redutores**	26,40 ± 2,73 ^c	60,08 ± 3,97 ^a	27,45 ± 3,89 ^c	37,98 ± 3,28 ^b
Densidade final***	3,49 ± 0,18 ^c	10,62 ± 0,08 ^a	3,61 ± 0,18 ^c	5,38 ± 0,12 ^b
pH final****	4,03 ± 0,02 ^c	4,76 ± 0,01 ^a	4,11 ± 0,03 ^c	4,15 ± 0,01 ^b

Os dados com letras diferentes dentro da mesma linha apresetam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

* (V/V)

** Concentração iniical de açúcares redutores = 62g/L

***Concentração inicial de substratos = 12,5 ° Brix

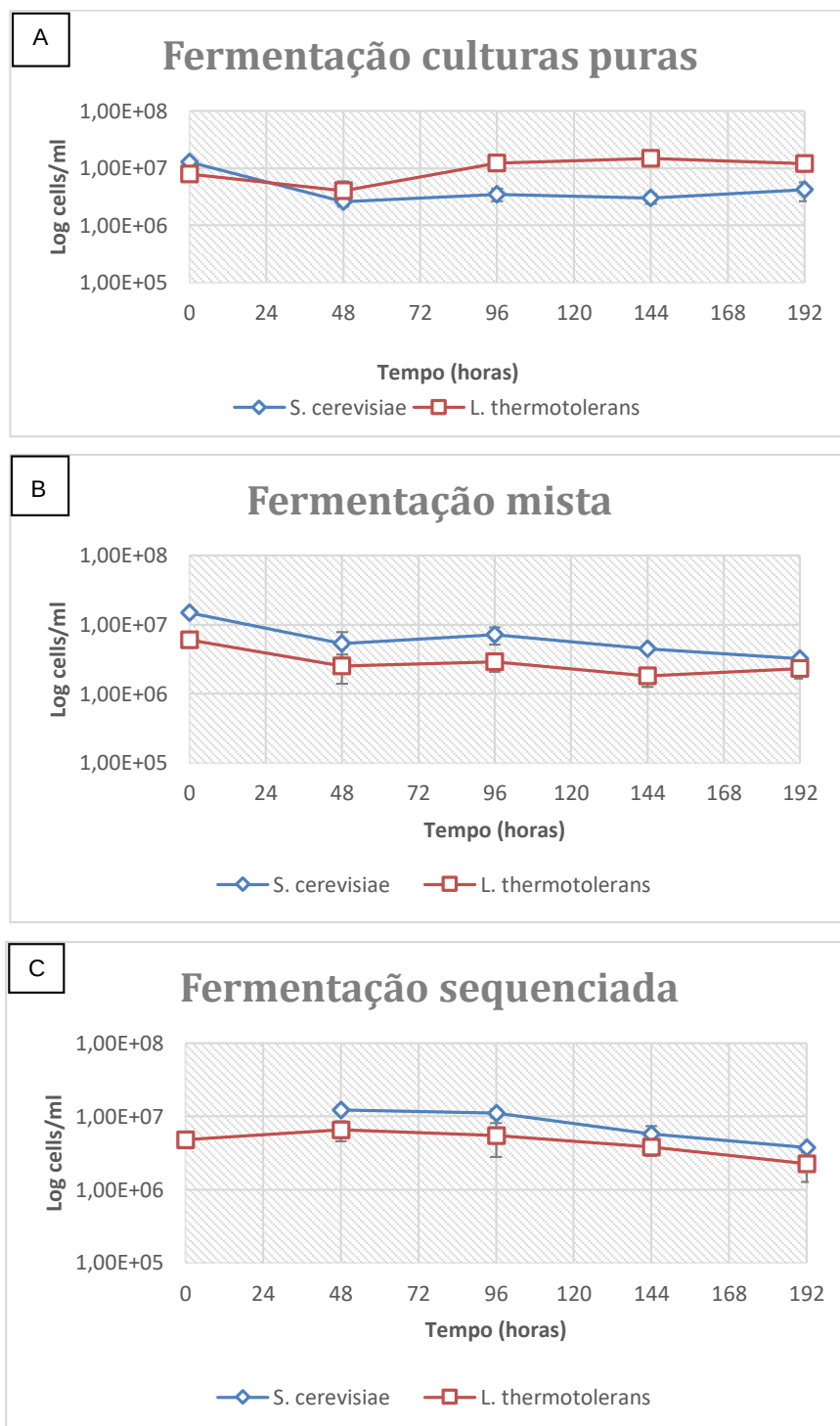
****pH inicial= 5,24

No cenário de fermentação sequenciada, a inibição mútua das leveduras provavelmente levou a diferenças significativas nos parâmetros de fermentação supracitados, causando uma fermentação incompleta, em comparação com o controle. Esses resultados podem ser explicados pela baixa capacidade fermentativa das leveduras não convencionais, como mostrado no presente estudo, bem como pelo fato de que algumas cepas de *S. cerevisiae* secretam peptídeos antimicrobianos que inibem a atividade de leveduras não convencionais (KEMSAWASD et al., 2015; ALBERGARIA & ARNEBORG, 2016)

As cepas de *L. thermotolerans* têm sido utilizadas majoritariamente nos estudos sobre produção de vinho, onde foi identificada sua capacidade de realçar a acidez dos vinhos (GOBBI et al., 2013; JOLLY ET AL., 2014), influenciar aroma e sabor (BALIKCI et al., 2016) além de alterar sua cor (ESCOTT et al., 2016). Em relação à fermentação sequenciada entre *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans*, Korenika e colaboradores (2021) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, onde houve redução do teor alcoólico dos vinhos, comparados à fermentação simples com *S. cerevisiae*. Por outro lado, outros estudos (BENITO et al., 2016; BINATI et al., 2020) demonstraram uma forte redução

na concentração celular de *L. thermotolerans* após a inoculação de *S. cerevisiae*, chegando ao completo desaparecimento ao longo da fermentação.

Figura 2 - Cinética de crescimento de *L. thermotolerans* em fermentação pura e mista. *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* em fermentação pura (A), mista (B) e sequenciada (C)



4.5.3 Fermentação mista e sequenciada entre *S. cerevisiae* e *W. anomalus*

A cinética de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *W. anomalus*, em fermentação pura, mista e sequenciada são mostradas na Figura 3. No cenário de fermentação mista, onde as leveduras são inoculadas ao mesmo tempo no mosto, verifica-se uma tendência declinante na concentração celular de ambas as leveduras até 96h de fermentação. A partir deste momento, percebe-se uma estabilidade na biomassa de *W. anomalus*, atingindo a concentração celular de $1,38 \times 10^6$ células/ml ao fim do processo fermentativo. Para *S. cerevisiae* há um aumento da concentração celular entre 96h-144h, seguido de um decréscimo entre 144h-192h, atingindo a concentração de $2,23 \times 10^6$ células/ml após 192h de fermentação (Figura 3B).

Em relação às determinações analíticas, a cerveja produzida em fermentação mista atingiu um teor alcoólico de 4,90% (V/V) e um pH final de 4,04. Não houve diferença significativa em relação à produção de etanol, açúcares redutores, densidade específica e pH, quando comparados ao controle (Tabela 5). Esses resultados podem ser explicados pela menor atividade fermentativa da cepa de *W. anomalus* em comparação com cepas de levedura *Saccharomyces*, como já mostrado neste estudo.

Um estudo recente, realizado por Canonico e colaboradores (2019), obteve-se resultados semelhantes ao presente estudo. Na fermentação mista entre *S. cerevisiae* e *W.* para fabricação de cerveja, com diferentes proporções de inoculação, não houve diferença significativa para os principais parâmetros de fermentação (álcool, açúcar residual e pH), com exceção da densidade final, quando comparados ao controle. Além disso, houve co-existência entre as leveduras, mas com prevalência de *S. cerevisiae* sobre *L. thermotolerans*, em relação à dinâmica populacional.

Na fermentação sequenciada, onde há um intervalo de 48h entre as inoculações, a levedura *W. anomalus* apresentou crescimento da concentração celular ao longo das primeiras 96h de fermentação, com posterior declínio, até atingir $1,95 \times 10^6$ células/ml ao fim do processo fermentativo. Por outro lado, *S. cerevisiae* apresentou acentuada tendência declinante ao longo de todo o processo fermentativo, atingindo a concentração celular de $1,70 \times 10^6$ células/ml

após 192h de fermentação (Figura 3C). Em relação às determinações analíticas, a cerveja produzida em fermentação sequenciada atingiu um teor alcoólico de 3,15% (V/V) e um pH final de 4,41. Houve diferença significativa em relação à produção de etanol, açúcares redutores, densidade específica e pH, quando comparados ao controle (Tabela 5). No cenário de fermentação sequenciada, a inibição mútua das leveduras provavelmente levou a diferenças significativas nos parâmetros de fermentação supracitados, causando uma fermentação incompleta, em comparação com o controle.

Tabela 5 - Principais determinações analíticas das cervejas produzidas com *W. anomalous* em fermentação pura, mista e sequenciada

Determinação Analítica	Cultura pura <i>S. cerevisiae</i> (Controle)	Cultura pura <i>W. anomalous</i>	Fermentação mista	Fermentação sequenciada (48h)
Etanol*	4,93 ± 0,09 ^a	0,97 ± 0,06 ^c	4,9 ± 0,09 ^a	3,15 ± 0,05 ^b
Açúcares redutores**	26,40 ± 2,73 ^c	63,76 ± 7,78 ^b	26,40 ± 3,15 ^c	49,55 ± 0,91 ^a
Densidade final***	3,49 ± 0,18 ^c	10,77 ± 0,15 ^a	3,53 ± 0,16 ^c	6,75 ± 0,13 ^b
pH final****	4,03 ± 0,02 ^c	4,82 ± 0,01 ^a	4,04 ± 0,03 ^c	4,41 ± 0,03 ^b

Os dados com letras diferentes dentro da mesma linha apresetam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

* (V/V)

** ** Concentração iniical de açúcares redutores = 62g/L

***Concentração inicial de substratos = 12,5 ° Brix

****pH inicial= 5,24

Embora tradicionalmente esteja associado a excessiva produção de acetato de etila, que representa uma séria desvantagem para o seu uso na produção de vinho, *W. anomalous* ganhou considerável importância recentemente, uma vez que apresenta características fisiológicas e metabólicas potencialmente exploráveis (PADILLA et al., 2018). Tais características incluem a produção de enzimas responsáveis por potencializar aroma e sabor (PADILLLA et al., 2016), bem como biocontrole sobre outras leveduras não convencionais através da produção de toxinas (FERNANDEZ DE ULIVARRI et al., 2018).

Resultados distintos foram encontrados na literatura. Chen e colaboradores (2021) apresentaram um estudo para avaliar as características físico-químicas de vinhos de arroz produzidos por *W. anomalous* e *S. cerevisiae* em fermentação sequenciada, onde os vinhos tiveram resultados inferiores aos produzidos apenas com *S. cerevisiae*, apresentando diferenças significativas para a produção de

álcool, açúcares residuais e pH. Por outro lado, não houve aparente inibição entre os microrganismos, considerando sua dinâmica populacional. Por outro lado, CAÑAS e colaboradores (2014) não encontraram diferenças significativas para a produção de álcool e pH, comparando vinhos produzidos em fermentação simples (*S. cerevisiae*) com outros produzidos em fermentação sequenciada (*W. anomalus* e *S. cerevisiae*). Além disso, ambas as leveduras apresentaram valores similares para sua concentração celular, não apresentando sinais de competição por nutrientes.

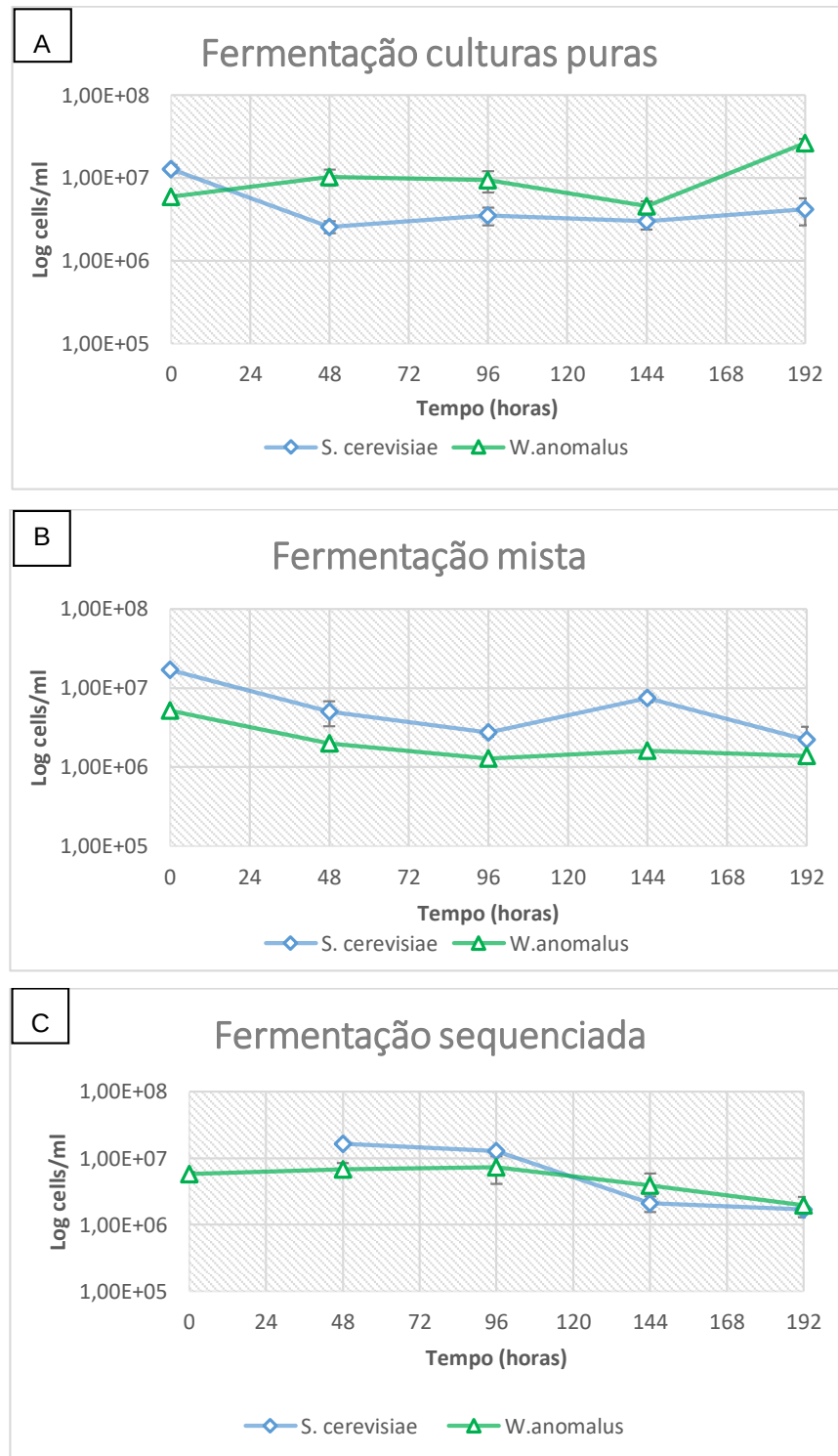
4.6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que a produção de cerveja comerciais por meio da utilização das cepas de leveduras *L. thermotolerans* (URM-2654) e *W. anomalus* (URM-2631) em fermentação pura não apresentaram parâmetros fermentativos satisfatórios, comparados às cepas comerciais de *S. cerevisiae*. Por outro lado, a maioria das cepas apresentou crescimento de biomassa e boa adaptabilidade ao meio fermentativo, se mostrando uma opção promissora na produção de cervejas de baixo teor alcoólico.

Considerando a fermentação mista, para as cepas estudadas não foram observadas diferenças significativas dos parâmetros fermentativos, em relação ao controle. Além disso, ocorreu redução da concentração celular tanto de *S. cerevisiae* quanto das leveduras não convencionais. Na fermentação sequenciada, houve redução de rendimento em comparação com a fermentação simples (*S. cerevisiae*), além de considerável redução na concentração celular das leveduras.

Nesse sentido, trabalhos adicionais são necessários para entender o comportamento dessas leveduras não convencionais no processo de fabricação de cerveja, verificando suas contribuições para a melhoria dos processos nas cervejarias ou na obtenção de perfis sensoriais diferenciados.

Figura 3 - Cinética de crescimento de *W. anomalus* em fermentação pura e mista. *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* em fermentação pura (A), mista (B) e sequenciada (C)



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 2035–2046, 2016.

BALIKCI, E.K.; TANGULER, H.; JOLLY, N.P.; ERTEN, H. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. **Yeast**, v. 33, p. 313–321, 2016.

BARRIGA, E.J.C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In *Changing Diversity in Changing Environment*, Grillo O. (ed). **InTech**: Europe; 55-86, 2011.

BASSO, R. F.; ALCARDE, R. A.; PORTUGAL, C. B. Could non *Saccharomyces* yeast contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**. V. 86, p. 112-120, 2016.

BELDA, I., RUIZ, J., NAVASCUES, E.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased beta-lyase activity. **Int J Food Microbiol**, v. 225, p. 1–8, 2016.

BENITO, A., CALDERON, F., PALOMERO, F., BENITO, S. Quality and composition of airen wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 54, p. 135-144, 2016.

BINATI, R.L.; LEMOS JUNIOR, W.J.F.; LUZZINI, G.; SLAGHENAUF, D.; UGLIANO, M.; TORRIANI, S. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 318, 2020.

CAÑAS, P.M.I.; GARCÍA-ROMERO, E., HERAS MANSO, J.M. Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. **Eur Food Res Technol**, v. 239, p. 279–286, 2014.

CANONICO, L.; AGARBATI, A.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**. v. 56, p. 45-51, 2016.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**. V. 259, p. 7-13, 2017.

CANONICO, L.; GALLI, E.; CIANI, E.; COMITINI, F.; CIANI, M. Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process. **Microorganisms**, v. 7, p. 11, 2019.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; SIESTO, G.; ROMANO, P. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation**, v. 4(2), p. 38, 2018.

CHEN, L.; LI, D.; REN, L.; SONG, S.; MA, X.; RONG, Y. Effects of simultaneous and sequential cofermentation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on physicochemical and flavor properties of rice wine. **Food Sci. Nutr.**, v. 9, p.71–86, 2021.

CIANI, M.; MORALES, P.; COMITINI, F.; TRONCHONI, J.; CANONICO, L.; CURIEL, J.A.; ORO, L.; RODRIGUES, A.J.; GONZALEZ, R. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. **Front Microbiol** v.7, 2016.

CRAUWELS, S.; STEENSELS, J.; AERTS, G.; WILLEMS, K. A.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B. *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. **BrewingScience**. V. 68, p. 110-121, 2015.

DAENEN, L.; STERCKX, F.; DELVAUX, F.R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunuscerasus*L.) used in the production of special fruit beers. **FEMS Yeast Research**. V. 8, p. 1103–14, 2008.

DE FRANCESCO, G. D.; TURCHETTI, B., SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G. Screening of new strains of *saccharomyces ludwigii* and *zigosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Journal of institute of Brewing**, V.121, p. 113-121, 2015.

DEQUIN S.; CASAREGOLA S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **Comptes Rendus Biologies**. V. 334, p. 687–93, 2011.

DOMIZIO, P.; HOUSE, J.F.; JOSEPH, C.M.L.; BISSON, L.F.; BAMFORTH, C.W. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. **Journal Institute of Brewing**. v. 122 , p. 599-604, 2016.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLESI, C.D.; SABATELLI, M. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 281–89, 2007

ESCOTT, C.; MORATA, A.; LOIRA, I.; TEFAYE, W.; SUAREZ-LEPE, J.A. Characterization of polymeric pigments and pyranoanthocyanins formed in microfermentations of non-*Saccharomyces* yeasts. **J. Appl. Microbiol.**, v. 121, p. 1346–1356, 2016.

FERNÁNDEZ DE ULLIVARRI, M.; MENDOZA, L.M.; RAYA, R.R. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. **Biol. Control**, v. 121, 223–228, 2018.

GOBBI, M.; COMITINI, F.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine, **Food Microbiology**. V. 33, p. 271–281, 2013.

GODDARD, M.R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. **Ecology**. V. 89, p.2077–2082, 2008.

GUTIÉRREZ, A.; BOEKHOUT, T.; GOJKOVIC, Z.; KATZ, M. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. **J. Inst. Brew.** V. 124: p. 389–402, 2018.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer. **Food Microbiology**. v. 72, p. 55-66, 2018.

HU, K.; QIN, Y.; TAO, Y-S.; ZHU, X-L.; PENG, C-T.; ULLAH, N. Potential of glycosidase from non-*Saccharomyces* isolates for enhancement of wine aroma. **J Food Sci**, v. 81, p. 935–943, 2016.

JOLLY, N.P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**. V. 14, p. 215–237, 2014.

KEMSAWASD, A.; BRANCO, P.; ALMEIDA, M. A.; CALDEIRA, J.; ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, p. 1-8, 2015.

KORENIKA, A.J.; TOMAZ, I.; PREINER, D.; LAVRIĆ, M.; ŠIMIĆ, B.; JEROMEL, A. Influence of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* Commercial Yeast Sequential Inoculation on Aroma Composition of RedWines (Cv Trnjak, Babic, Blatina and Frankovka). **Fermentation**, v. 7, 2021.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study. **Elsevier**, pp. 2354, 2011.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**. v. 33, P. 129–144, 2016.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S.R.; NICKENS, D.M.; ROGERS, C.M.; SAUSEN, C.; CAPUTO, R.; MILLER, J.; LI, H.; TENNESSEN, J.M.; BOCHMAN, M.L. Primary Souring: A novel bacteria-free method for sour beer. **Food Microbiology**. v. 70, p. 76-84, 2018.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. **Front. Microbiol.**, v.7, p. 411, 2016.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. **Fermentation** p. 82-95, 2018.

PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends Genet.** V. 22, p.183–86, 2006.

RAINIERI, S., PRETORIUS, I. S. Selection and improvement of wine yeasts, **Ann. Microbiol.**, v. 50, p. 15–31, 2000.

SPITAEELS F.; WIEME, A.D.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.M.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L., VANDAMME, P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS One**. V. 9, 2014.

STEENSELS, J.; DAENEN, L.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H; VERSTREPEN, K. J. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. V. 206, P. 24-38, 2015.

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

TAPSOBA, F.; LEGRAS, J.L.; SAVADOGO, A.; DEQUIN, S.; TRAORE, A.S. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from *Borassus akeassii* palm wines from Burkina Faso in comparison to other African beverages. **International Journal of Food Microbiology**. v. 211, p. 128–133, 2015.

TRISTEZZA, M.; TUFARIELLO, M.; CAPOZZI, V.; SPANO, G.; MITA, G.; GRIECO, F. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 670, 2016.

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

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

VILLALBA, M.L.; SUSANA SÁEZ, J.; DEL MONACO, S.; LOPES, C.A.; SANGORRÍN, M.P. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. **Int J Food Microbiol**, v. 217, p. 94–100, 2016.

ZAINASHEFF, J.; WHITE, C. Yeast: the practical guide to beer fermentation. **Brewers publications**, Colorado, 205 pp, 2010.

ZHANG, B-Q.; LUAN, Y.; DUAN, C-Q.; YAN, G-L. Use of *Torulaspora delbrueckii* Co-fermentation With Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains With Different Aromatic Characteristic to Improve the Diversity of Red Wine Aroma Profile. **Front. Microbiol.** , v.9, p. 606, 2018.