

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TAÍS SUHRE

**Controle de qualidade em microcervejarias:  
avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**

**PORTO ALEGRE  
2014**

*Taís Suhre*

**Controle de qualidade em microcervejarias:  
avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

**Porto Alegre**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Assim como nossa estimada levedura, que precisa de todo o carinho e dedicação do cervejeiro para produzir um produto de qualidade, eu não teria realizado muito bem este trabalho sem o carinho e dedicação de algumas pessoas.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus maravilhosos pais, que deram origem a esse “broto” e todas as condições para que crescesse saudável.

Ao meu irmão e amigos (especialmente Pikis, The lonely hearts, Zitas e pessoal de Três Passos) que emprestaram o “gás” para que meus sonhos se multiplicassem.

Ao meu orientador Diego Bonatto, minha inspiração acadêmica, que abriu gentilmente as portas de seu laboratório e compartilhou seu doce conhecimento, para que eu “fermentasse” as ideias e produzisse este trabalho.

Aos meus colegas de faculdade e de laboratório (especialmente ao Victor que compartilhou alguns finais de semana fazendo experimentos), que dividiram os nutrientes desse grande mosto chamado UFRGS e jamais desistiram de “fermentar” por mais que as condições estivessem complicadas.

Agora já está chegando a hora de trocar de mosto para fermentar novas ideias.

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho, vamos brindar com uma cerveja!

*“Era um homem sábio aquele  
que inventou a cerveja.”  
Platão*

## RESUMO

O crescente número de microcervejarias e de cervejeiros caseiros no Brasil vem impondo uma exigência pela melhor qualidade das cervejas consumidas. Apesar do interesse dos cervejeiros brasileiros nos diferentes aspectos do controle de qualidade de leveduras, tais como presença de contaminantes microbianos, a viabilidade e a vitalidade celulares, são escassas as empresas de biotecnologia que, atualmente, disponibilizam serviços desse gênero no país. As leveduras são responsáveis pela fermentação do mosto cervejeiro, o que é um passo crucial do processo de produção cervejeira. Assim, a fim de avaliar o interesse de microcervejarias e cervejeiros caseiros acerca de serviços para análises de leveduras, foi feito um levantamento. Além disso, foram estabelecidos alguns métodos microbiológicos e moleculares para avaliar a viabilidade e vitalidade das células de levedura, para avaliações da biomassa de leveduras fornecidas por três microcervejarias de Porto Alegre e cidades vizinhas (Rio Grande do Sul, Brasil). Para a análise de viabilidade, foi utilizado o método de coloração com azul de metileno básico, enquanto a vitalidade foi determinada através do método do poder de acidificação. O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado para a identificação de contaminantes microbianos, geralmente associados às leveduras cervejeiras. Os resultados da pesquisa indicaram um grande interesse dos cervejeiros caseiros e de microcervejarias por métodos de controle de qualidade das leveduras. Além disso, os dados obtidos a partir da análise da biomassa de amostras de leveduras reutilizadas a partir de três microcervejarias indicaram a presença de células com viabilidade e vitalidade variável, que podem influenciar na qualidade do produto final. Finalmente, pode-se observar que há uma forte demanda do mercado por serviços de avaliação da qualidade da biomassa de leveduras de microcervejarias e cervejeiros caseiros, gerando um nicho promissor para novas empresas e pesquisas acadêmicas que podem oferecer esses serviços para o público.

Palavras-chave: Leveduras cervejeiras. Controle de qualidade. Microcervejarias.

## **ABSTRACT**

The growing number of microbreweries and home brewers in Brazil is imposing a consumers' demand for higher quality of beers. In this sense, the quality of beers is directly associated with the adequate management and care of the yeasts used during brewing. Despite the interest of Brazilian brewers in the different aspects of yeast quality control, such as the detection of microbial contaminants, as well as methods for viability and vitality evaluation of yeast biomass, there are few biotechnology companies that currently provide these services. Yeasts are responsible for beer wort fermentations, which is a crucial step of brewing process. Thus, in order to evaluate the interest of microbrewers and artisanal brewers for yeast analysis services, a survey was made. In addition, some microbiological and molecular methods for assessing yeast cell viability and vitality were established for evaluations of yeast biomass provided by three microbreweries from Porto Alegre and neighbor cities (Rio Grande do Sul, Brazil). For viability analysis, the method of basic methylene blue staining was used, while vitality was accessed with the power acidification assay. The method of polymerase chain reaction (PCR) was used for the identification of microbial contaminants usually associated with brewer's yeast. The results from survey indicated a high repressed demand for yeast quality control methods. Furthermore, the data obtained from the analysis of reused yeast biomass samples from three microbreweries indicated the presence of cells with variable viability and vitality, which can influence the quality of final product. Finally, it can be observed that there is a strong market demand for yeast biomass quality evaluation services for microbreweries and artisanal brewers, generating a promissory niche for new companies and academic laboratories that can offer these services for the public.

**Keywords:** Brewer's yeast. Quality control. Microbreweries.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura simplificada de uma levedura com broto. As organelas, como vacúolo, núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e centríolos são indicadas na figura.....	12
Figura 2 - Típica curva de crescimento de levedura demonstrando as diferentes fases observadas durante a fermentação. ....	14
Figura 3 - Os quatro ingredientes principais da cerveja. No caso do malte, o mesmo pode ser proveniente da cevada (*) ou qualquer outro cereal que passou pelo processo de malteação. ....	19
Figura 4 - Preparo de pré-cultura e culturas de WLP 500 ao longo de 5 gerações...28	
Figura 5 -Teste de viabilidade de leveduras com azul de metileno básico em câmara de Neubauer indicando células viáveis (4A) e não viáveis (4B). Aumento do microscópio de 40x. ....	29
Figura 6 - Porcentagem de viabilidade da levedura WLP500 mensurada durante quatro gerações. * Aumento de viabilidade estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado à primeira geração. ....	38
Figura 7 – Formação de flocos de células durante quinta geração da cultura da levedura WLP500.....	39
Figura 8 - Poder de acidificação da cepa WLP500 em meio de cultura YPD, indicando a vitalidade, mensurado durante quatro gerações. *Aumento de vitalidade estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado à primeira geração. ....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos iniciadores senso (iniciador_F) e antisenso (iniciador_R) usados na identificação de <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pediococcus damnosus</i> em amostras de leveduras cervejeiras. A sequência dos iniciadores, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons) são indicados na tabela. ....	32
Tabela 2 - Resultados das análises de viabilidade e vitalidade das leveduras de diferentes estilos de cerveja e diferentes gerações de microcervejarias da mesorregião metropolitana de Porto Alegre.....	43



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 DA MAGIA À BIOTECNOLOGIA: AS LEVEDURAS .....	11
1.2 O PROCESSO FERMENTATIVO NA FABRICAÇÃO DE CERVEJA .....	13
1.3 A CERVEJA TRANSFORMANDO A HUMANIDADE .....	15
1.4 DEFINIÇÃO E ESTILOS DE CERVEJA .....	18
1.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO .....	20
1.6 CONTROLE DE QUALIDADE .....	21
1.7 MERCADO CERVEJEIRO.....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 COLETA DE DADOS PARA PESQUISA DE OPINIÃO .....	26
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE MICROCERVEJARIAS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE .....	26
4.3 PREPARO DE CULTURAS, CEPA DE LEVEDURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	27
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE AZUL DE METILENO BÁSICO 28	
4.5 ENSAIO DE VITALIDADE PELO MÉTODO DO PODER DE ACIDIFICAÇÃO DO MEIO .....	30

4.6 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE AMOSTRAS DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS .....	30
4.7 DESENHOS DOS INICIADORES DE DETECÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS .....	31
4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS .....	32
4.9 GRÁFICOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1 PESQUISA DE OPINIÃO PARA ANALISAR O INTERESSE DOS CERVEJEIROS ARTESANAIS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS .....	34
5.2 AVALIAÇÃO DE CONTAMINANTES EM LEVEDURAS CERVEJEIRAS.....	36
5.3 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE VIABILIDADE DO AZUL DE METILENO BÁSICO PARA AVALIAR A VIABILIDADE DE DIFERENTES GERAÇÕES DA LEVEDURA WLP500 .....	37
5.4 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE VITALIDADE PARA DIFERENTES GERAÇÕES DE LEVEDURA WLP500.....	40
5.5 VIABILIDADE E VITALIDADE DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE MICROCERVEJARIAS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE .....	42
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DA MAGIA À BIOTECNOLOGIA: AS LEVEDURAS

Microscópicas e tão importantes, as leveduras são responsáveis pela produção de um dos produtos biotecnológicos mais clássicos: a cerveja. Na indústria cervejeira, geralmente, as leveduras utilizadas são do gênero *Saccharomyces* (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). São duas as principais espécies de leveduras cervejeiras, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus*, que parece ter evoluído de uma hibridização entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus* (LIBKIND et. al., 2011; BING et al., 2014).

Sabemos que leveduras são eucariotos unicelulares, com aproximadamente 5 a 10 µm de diâmetro, pertencentes ao reino Fungi, e fazem fermentação alcóolica mesmo em presença de oxigênio atmosférico, condição esta chamada de repressão catabólica (SHERMAN, 1998), mas nem sempre foi assim. No passado, por muito tempo, a fermentação alcoólica (que é o processo que origina a cerveja) foi considerada divina e mágica (MORADO, 2009). Posteriormente, a fermentação alcoólica foi explicada como uma reação química espontânea promovida pelo contato com o ar, onde a levedura era considerada um mero subproduto (SCHLENK, 1985).

Com os estudos de Louis Pasteur, em meados de 1800, foi concluído que as leveduras estavam diretamente envolvidas na fermentação (SCHLENK, 1985). Os avanços obtidos na pesquisa com cerveja e vinho impulsionaram muitos outros avanços na pesquisa científica, inclusive criaram a oportunidade para os químicos participarem da exploração da atividade celular e mesclar seus recursos com a experiência dos biólogos para a criação de um dos ramos mais importantes da ciência: a bioquímica (SCHLENK, 1985).

Atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada como um modelo de célula eucariota em diversos estudos de biologia, por ser um organismo simples e com aspectos genéticos conhecidos (SHERMAN, 2002). Nesse sentido, a estrutura simples da levedura (WHITE; ZAINSCHEFF, 2010) é definida pela presença de uma parede celular (formada principalmente por glicanos, quitinas e

manoproteínas), citoplasma, mitocôndria, vacúolo, retículo endoplasmático, núcleo e complexo de Golgi (Figura 1).

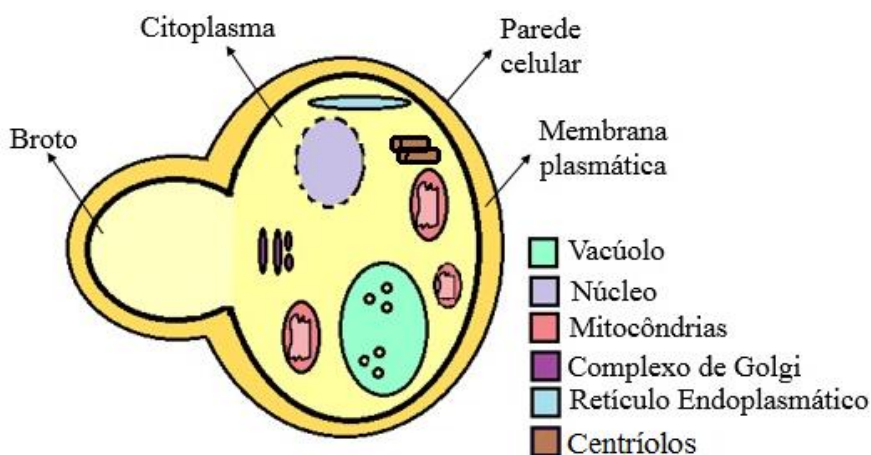


Figura 1 - Estrutura simplificada de uma levedura com broto. As organelas, como vacúolo, núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e centríolos são indicadas na figura.

As leveduras cervejeiras se reproduzem por brotamento. Durante o brotamento, o núcleo se divide e uma porção dele penetra no broto juntamente com outras organelas (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). O número de brotos de uma espécie e/ou cepa de leveduras é bastante variável. Enquanto as leveduras cervejeiras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de brotar aproximadamente 30 vezes, leveduras *Saccharomyces pastorianus* não brotam mais que 20 vezes (WHITE; ZAINSCHEFF, 2010).

É interessante que, mesmo antes de reconhecer as leveduras como os organismos responsáveis pela fermentação, os cervejeiros já contribuíam para sua seleção artificial, retirando a “espuma mágica” das melhores cervejas e reaproveitando a mesma para fazer novas cervejas. Atualmente, sabe-se que a espuma que fica acumulada durante a fase ativa da fermentação cervejeira contém leveduras e as mesmas podem ser coletadas e armazenadas para posterior reaproveitamento em outra fermentação. Assim, leveduras cervejeiras foram diferenciando-se de leveduras selvagens (WHITE; ZAINSCHEFF, 2010).

A seleção artificial promovida pelos cervejeiros no passado fez com que as leveduras perdessem a capacidade de formar esporos e a capacidade de acasalar, diminuindo a variabilidade genética ao longo das gerações, garantindo que as

características das cepas se tornassem consistentes (WHITE; ZAIN SHEFF, 2010; SICARD; LEGRAS, 2011).

Neste sentido, algumas cervejarias consideram tão valiosas as características de suas leveduras que as protegem como um segredo industrial, não compartilhando suas cepas. Por outro lado, existem leveduras que são indesejáveis para o processo cervejeiro, produzindo compostos de aromas indesejáveis.

Existem mais de 600 espécies de leveduras atualmente identificadas e amplamente distribuídas em diversos nichos ecológicos e áreas geográficas (SICARD; LEGRAS, 2011), e dentro de cada espécie, centenas de cepas de leveduras diferentes. Assim, qualquer levedura que não seja aquela escolhida para a fermentação é chamada de “levedura selvagem” e, geralmente, o cervejeiro as considera um tipo de contaminação (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006; WHITE; ZAIN SHEFF, 2010). Em menor escala, algumas cervejarias fermentam suas cervejas de forma espontânea, a partir de leveduras selvagens e bactérias presentes no ar (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

## 1.2 O PROCESSO FERMENTATIVO NA FABRICAÇÃO DE CERVEJA

O processo fermentativo para a produção de cerveja depende fortemente de mecanismos celulares que controlam a mitose e o metabolismo de nutrientes presentes no mosto cervejeiro, sendo estes influenciados por fatores externos como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, disponibilidade de açúcares e outros nutrientes (CARVALHO; BENTO; SILVA., 2006).

Podemos dividir o processo fermentativo em três fases: adaptativa (lag), exponencial (log) e estacionária (HELD, 2010). O desenvolvimento de uma cultura de levedura pode ser monitorado utilizando um espectrofotômetro para medir a absorbância da suspensão celular a 600 nm e gerar uma curva de crescimento (Figura 2).

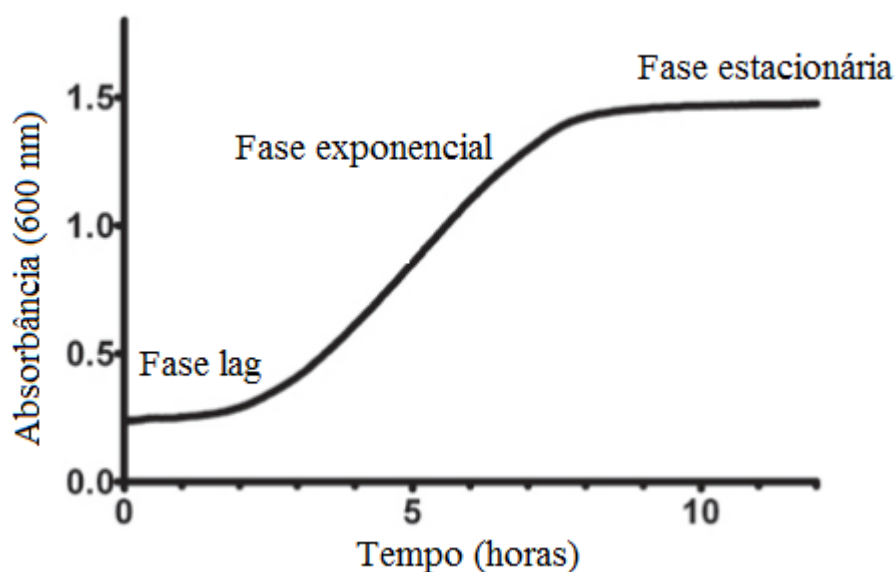


Figura 2 - Típica curva de crescimento de levedura demonstrando as diferentes fases observadas durante a fermentação em laboratório.

Inicialmente, no mosto cervejeiro, as leveduras vão passar por um período de adaptação ao ambiente, chamado de fase lag (Figura 2) e vão, então, iniciar o ciclo celular. É uma fase importante para obtenção de leveduras saudáveis para a fermentação. Nesta fase, o controle de temperatura e da taxa de inoculação são fundamentais. Temperatura mais quentes resultam em mais células e a rapidez do crescimento pode gerar precursores de aromas indesejáveis (WHITE; ZAIN SHEFF, 2010). Por sua vez, taxas de inoculação altas (promovendo uma rápida fermentação e diminuição da fase lag) ou baixa (promovendo um aumento da fase lag) diminuem a vitalidade da levedura.

O pH do mosto é outra variável muito importante que deve ser controlada pelo cervejeiro, sendo que crescimento da população de leveduras cervejeiras se dá em um pH entre 4 e 5. O baixo pH também diminui a possibilidade de microrganismos contaminantes se desenvolverem na cerveja (PALMER, 2010; WHITE; ZAIN SHEFF, 2010).

Durante a fase exponencial, a levedura busca uma maneira de conseguir energia para se multiplicar utilizando, para isso, as reservas de glicogênio, bem como utiliza o oxigênio disponível no mosto para promover a formação de ergosterol, um componente essencial de membranas celulares (PUT, 2012). Durante esta fase, a população de leveduras aumenta rapidamente e ativamente converte os açúcares do mosto, especialmente mono e dissacarídeos, em etanol pela via fermentativa

(WHITE; ZAINSCHEFF, 2010). Os açúcares mais simples são fermentados primeiro, utilizando glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, nesta ordem (PALMER, 2006).

A capacidade de fermentar diferentes açúcares, que é variável entre diferentes cepas de levedura, e a quantidade de nutrientes e açúcares no mosto, irão determinar a atenuação (taxa de fermentação) da levedura, refletindo no teor alcoólico da cerveja (WHITE; ZAINSCHEFF, 2010).

Durante a fermentação alcoólica, a levedura vai degradar os carboidratos do mosto, produzindo etanol, gás carbônico e diversos compostos como ésteres, álcoois superiores e compostos sulfurados que, mesmo em quantidades definidas em partes por milhão (ppm) ou partes por bilhão (ppb), tem uma enorme influência no sabor e aroma da cerveja (PIRES *et al.*, 2014). Em determinadas quantidades, esses compostos podem ocasionar graves defeitos sensoriais na cerveja.

Durante a fase estacionária o crescimento da população cessa, a atividade fermentativa diminui e as leveduras reabsorvem grande parte dos compostos de aroma indesejáveis, “amadurecendo” e equilibrando o aroma da cerveja (PALMER, 2006). Nesta fase, o cervejeiro determina que a fermentação está em baixa atividade observando a diferença na medida da gravidade original (medida da quantidade sólidos presentes originalmente no mosto) e da gravidade final (medida extrato aparente da cerveja após a fermentação) de acordo com cada estilo (PALMER, 2006).

### 1.3 A CERVEJA TRANSFORMANDO A HUMANIDADE

Analisando a história da humanidade, é evidente a importância das bebidas e alimentos fermentados na maioria das sociedades por conta dos seus impactos econômicos e culturais. O desenvolvimento das tecnologias de fermentação teve (e ainda possui) um papel crucial nessa história.

Evidências da produção de bebidas fermentadas que datam 6.000 antes da era comum (A.E.C.) e 3.000 A.E.C. indicam que foi na região da Mesopotâmia (atual Irã e Egito) que a história da cerveja iniciou (SICARD; LEGRAS, 2011). Também alguns dos escritos mais antigos da história da humanidade, como o código de Hamurabi, referem-se à produção e distribuição de cerveja, bem como as punições decorrentes no caso de fraudes na cerveja (FASOLI *et al.*, 2010).

Provavelmente, devido aos movimentos migratórios, a cultura cervejeira do crescente fértil influenciou os povos germânicos e celtas, que se tornaram os maiores produtores e consumidores de cerveja da era comum (SICARD; LEGRAS, 2011).

Até o início da Idade Média, as mulheres eram responsáveis pela fabricação das cervejas, que passaram a ser bastante consumidas e valorizadas (BARNETT, 2010). Essas cervejas provavelmente eram bem diferentes das que conhecemos hoje, sendo escuras, geralmente feitas de trigo, com adição de uvas, tâmaras e especiarias, de baixo teor alcoólico e fermentação espontânea (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). Sabe-se que, durante esta época, além de ser utilizada como remédio e “lubrificante social” nas festas, a cerveja esteve presente como uma fonte de vitaminas e água (já que essa nem sempre era potável). Também foi durante a Idade Média que os monges trapistas aprimoraram seus processos de fabricação cervejeira e introduziram a conservação a frio da cerveja. Nos mosteiros trapistas foram desenvolvidas técnicas e o registro de receitas que são utilizadas até hoje (MORADO, 2009).

Nesta fase, por conta da descoberta das propriedades bacteriostáticas e aromáticas do lúpulo (*Humulus lupulus*), a cerveja que até então era produzida com uma mistura de ervas denominada de *gruit* tornou-se mais parecida com a que conhecemos atualmente (OJO, 2010). As cervejas eram fermentadas a temperatura ambiente e deram origem à família de estilos que chamamos de Ale (MORADO, 2009).

Assim, simultaneamente com a sociedade, a cerveja foi se aprimorando. De uma atividade artesanal, expandiu-se para negócio industrial. Foi quando em 1040, o mosteiro de Weihenstephan, em Freising, na Alemanha, conseguiu licença do bispo Engelberto de Frisinga para produzir cerveja comercialmente, tornando-se como a cervejaria mais antiga em atividade no mundo (MORADO, 2009).

Com a preocupação de estabelecer padrões que garantissem a qualidade na fabricação da bebida, em 1516, foi lavrada a mais famosa lei sobre padronização de processo de fabricação da história, a chamada “Lei da Pureza Alemã” ou *Reinheitzgebot*. Essa lei obrigava que os únicos ingredientes utilizados na fabricação de cerveja fossem água, cevada e lúpulo (a levedura ainda não era conhecida). Em 1993, essa lei se transformou na *Vorläufiges Deutsches Biergesetz* (Lei Provisória da



Cerveja Alemã) e é mantida até hoje na Alemanha (VENTURINI *et al.*, 2008; MORADO, 2009).

No século 16 surgem as cervejas da família Lager, conhecidas antigamente como “cervejas de baixa fermentação” (MORADO, 2009). Esse tipo de cerveja foi descoberto quando algumas cervejarias alemãs foram proibidas de produzir cerveja do final da primavera até o início do outono, e eram armazenadas em adegas frias para maturar durante o verão. Estas cervejas apresentavam-se mais leves e claras do que as cervejas da família Ale, ganhando popularidade (SICARD; LEGRAS, 2001).

Contudo, as cervejas produzidas nesta época ainda não tinham as mesmas características das cervejas atuais. A estabilidade organoléptica da cerveja somente começou a ganhar forma a partir de 1859, quando Carl Von Linde desenvolveu a refrigeração artificial (DAMASCENO, 2013) e em 1883, quando o cientista Emil Christian Hansen isolou as primeiras culturas puras de levedura, iniciando sua produção controlada (WHITE, 1998).

Com as preocupações geradas pelo alcoolismo que era crescente na população, o início do século 20 foi marcado pelos movimentos de repressão ao consumo do álcool, o que culminou no estabelecimento da “Lei Seca” nos Estados Unidos<sup>1</sup>, proibindo a produção e comercialização de bebidas alcóolicas no país. Nos Estados Unidos foram 1.269 microcervejarias que sofreram com a Lei Seca, obrigando-as a encerrar os seus negócios. Neste período, somente algumas grandes empresas cervejeiras, que também comercializavam outros produtos, como extrato de malte, conseguiram sobreviver (MORADO, 2009). Com o fim da Lei Seca, em 1933 e o fim da Segunda Guerra Mundial, em 1945, houve uma grande transformação na indústria cervejeira americana. Um mercado consumidor pouco habituado ao amargor e a necessidade de produzir e vender ao menor custo possível, obrigou as cervejarias a utilizarem arroz e milho (mais baratos que cevada) e produzir cervejas claras com pouco aroma e sabor. Assim, os estilos hoje conhecidos como *American Standard Lagers* e *American Light Lagers* dominaram o mercado (MORADO, 2009).

Porém, a partir do final da década de 70, a produção de cerveja artesanal foi legalizada, o que estimulou a recuperação da cultura cervejeira e ocorreu um grande

---

<sup>1</sup> Também chamada, em inglês, de “Prohibition” ou “The Volstead Act”, ratificada em 16 de janeiro de 1919 pelo 65º Congresso Nacional norte-americano.

aumento no número de cervejeiros artesanais. Alguns desses cervejeiros deram início a grande onda de microcervejarias que cresceu durante os anos de 1990 nos Estados Unidos e mais tarde tomou o mundo todo, iniciando uma revolução cervejeira que perdura e ganha cada vez mais adeptos nos dias atuais (MORADO, 2009).

No Brasil, a bebida chegou provavelmente no século 17, com a colonização holandesa na região do Nordeste, pela Companhia das Índias Ocidentais (SANTOS, 2004). Após a expulsão dos Holandeses, a cerveja não esteve presente no Brasil durante um século e meio, até o início da importação de cervejas europeias, principalmente realizado por ingleses, em barris, a partir de 1808 (SANTOS, 2004). Com o início da produção de cerveja no Brasil, a cultura da cerveja inglesa entrou em crise e somente no final do século a importação voltou a crescer, com as cervejas alemãs que vinham em garrafas (SANTOS, 2004).

Atualmente, em busca de novos aromas e sabores, o Brasil vive uma revolução semelhante à das décadas de 70 e 80 dos Estados Unidos.

Assim, mesmo que a maioria das cervejas consumidas ainda sejam as cervejas de massa e ainda que boa parte das cervejas artesanais consumida é importada, rapidamente uma nova filosofia está surgindo entre os brasileiros, que é a de fabricar a sua própria cerveja.

Além disso, excelentes microcervejarias estão surgindo e conquistando não só o mercado brasileiro, mas também o exigente mercado internacional, como a mineira *Wäls* que conquistou medalha de ouro na categoria de cervejas belgas do estilo Dubbel e prata na categoria de cervejas belgas do estilo Quadrupel, na edição de 2014 da *World Beer Cup*, considerada a premiação mais importante da indústria cervejeira mundial (FARIA, 2014).

#### 1.4 DEFINIÇÃO E ESTILOS DE CERVEJA

De acordo com a legislação brasileira, o decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997<sup>2</sup>, define cerveja como sendo “uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação da

---

<sup>2</sup> BRASIL. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei No 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 132, n. 146, p. 19549, 5 set. 1994. Seção 1, pt. 1.

levedura, com adição de lúpulo, podendo o mesmo ser substituído por seus respectivos extratos” (Figura 3).



Figura 3 - Os quatro ingredientes principais da cerveja. No caso do malte, o mesmo pode ser proveniente da cevada (\*) ou qualquer outro cereal que passou pelo processo de malteação.

Dentro desta definição de cerveja encontram-se vários estilos que variam de acordo com fatores como a gravidade original, a cor, o teor alcoólico, a proporção de malte de cevada e o tipo de fermentação (BJCP, 2014).

As cervejas, de uma forma geral, podem ser classificadas em três grandes famílias: Ales, Lagers e Lambics. Há ainda quem considere uma quarta família, das cervejas híbridas, que são fermentadas de forma mista (BJCP, 2014).

As cervejas da família Ale são produzidas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e possuem uma temperatura de fermentação entre 15 e 25 °C, sendo antigamente consideradas como “cervejas de alta fermentação” (AMORIM, 2013). Neste tipo de cerveja, as leveduras sobem para a superfície do líquido e os aromas e sabores são mais complexos, devido a maior quantidade de ésteres e outros compostos aromáticos gerados, principalmente, pela temperatura da fermentação (VIDGREN *et al.*, 2010).

Por outro lado, as cervejas Lager que geralmente tem um perfil menos aromático, são fermentadas pela levedura *Saccharomyces pastorianus* numa faixa de temperatura entre 6 a 14 °C e são conhecidas como “cervejas de baixa fermentação” na terminologia mais antiga, tendo o acúmulo de leveduras no fundo do líquido (VIDGREN *et al.*, 2010).

Ainda, existem as cervejas de fermentação espontânea, que são fermentadas geralmente em barris de madeira com leveduras do gênero *Brettanomyces* e bactérias lácticas e acéticas existentes no ambiente, desenvolvendo um aroma ácido acentuado (BJCP, 2014). Os estilos de cerveja podem ser classificados de acordo com as quatro maiores escolas cervejeiras, alemã, belga, americana e inglesa (BJCP, 2014).

## 1.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO

O processo de fabricação de cerveja exige várias etapas. Inicialmente, o malte, que é a cevada ou outro grão que passou pelo processo de germinação controlada do grão para ativação das enzimas responsáveis pela quebra do amido, como a alfa- e a beta-amilases, é moído (para disponibilizar o amido) e, então, misturado com o liquor quente (água em temperaturas que variam de 64 °C até 74 °C). A mistura de malte moído e de liquor quente forma uma espécie de “mingau” que promove a conversão do amido do malte em açúcares simples (mono e dissacarídeos) e oligossacarídeos. A solução é, então, fervida na presença de lúpulos que conferem amargor (pela isomerização de uma classe de substâncias chamadas de alfa-ácidos em altas temperaturas) e, no final da fervura, com lúpulos aromáticos (que possuem maior conteúdo de óleos essenciais, como citronelol, e que confere um caráter “cítrico” para a cerveja). Esta solução, agora contendo açúcares, iso-alfa-ácidos e óleos essenciais (e outros elementos dissolvidos, como aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, oligonucleotídeos e bases nitrogenadas, bem como íons metálicos), é resfriada para originar o “mosto”, onde uma determinada quantidade de leveduras é adicionada para começar a fermentação (PALMER, 2006). Quando se completa o processo fermentativo, a levedura que precipitou pode ser retirada e utilizada para fermentar uma nova cerveja.

A cerveja pode ser filtrada ou não (conforme o estilo da cerveja), e a mesma pode ser engarrafada, mantida em *casks* (termo inglês usado para pequenos barris

de aço inoxidável ou de madeira) ou em *kegs* (recipientes de aço inox onde é feita a maturação e a carbonatação da cerveja). Algumas cervejarias fazem pasteurização para inativar e eliminar microrganismos indesejáveis, tais como bactérias gram-positivas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), bactérias gram-negativas (*Pectinatus* e *Megasphaera*) e leveduras selvagens, e inativar eventuais leveduras que ainda estejam presentes (SEGURANÇA ALIMENTAR, 2008).

## 1.6 CONTROLE DE QUALIDADE

Para garantir a qualidade da cerveja, o cervejeiro precisa manter um rigoroso controle da fermentação, ficando atento a todos os fatores internos e externos anteriormente citados e também à fisiologia da levedura.

A fermentação só pode ser realizada por leveduras viáveis e metabolicamente ativas. Conseqüentemente, quanto maior o número de leveduras viáveis e fisiologicamente competentes na biomassa, maior será a taxa de produção de álcool ou de atenuação. Assim, os ensaios de viabilidade e vitalidade são absolutamente essenciais para avaliar a qualidade das leveduras.

Atualmente, uma das formas mais comuns de analisar a viabilidade de leveduras é através do método de coloração com azul de metileno (SAMI; IKEDA; YABUUCHI, 1994). Por outro lado, um dos métodos mais utilizados para análise da vitalidade de leveduras é o ensaio de acidificação do meio (KAKA; SIMPSON; HAMMOND, 1988). Estes dois procedimentos são utilizados em conjunto para atestar a qualidade da biomassa de leveduras.

O controle de contaminantes também é importante industrialmente. A cerveja pode conter contaminantes microbianos provenientes de uma variedade de fontes (OJO, 2010). Esses contaminantes podem ser classificados em: (i) primários, quando são provenientes de matérias-primas e materiais utilizados na fabricação da cerveja ou (ii) contaminantes secundários, que foram introduzidos na cerveja durante o engarrafamento. Enquanto uma parcela menor dos problemas é atribuída a contaminações secundárias, as conseqüências da contaminação primária podem ser catastróficas, como a perda completa de uma produção de cerveja em escala industrial.

Um exemplo de contaminante são as chamadas “leveduras selvagens” e que podem ser de diversos gêneros, tais como *Brettanomyces*, *Debaryomyces* e *Pichia*

(DRAGONE *et al.*, 2007). Essas leveduras podem causar inúmeros defeitos, como a formação de película na superfície da cerveja, produção de turbidez, desenvolvimento de odor e sabores estranhos e fermentação com desvio de atenuação (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

A contaminação ainda pode ocorrer por bactérias. As bactérias que mais trazem problemas para as microcervejarias são as bactérias do gênero *Lactobacillus*, bem como as bactérias do gênero *Pediococcus*, que podem produzir diversos aromas indesejados nas cervejas (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

Atualmente, o método mais utilizado para detectar contaminantes microbianos é por meio do crescimento dos microrganismos em meios de cultura apropriados, como o MRS ágar (para detecção de bactérias lácticas) e NBB-B (para detecção de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* e *Megasphaera*). Porém, dependendo da espécie de microrganismo, o crescimento pode ser bastante lento tanto em meios sólidos quanto em meios de cultura líquidos, resultando na comercialização de cervejas que, ao longo do tempo, podem apresentar os típicos sinais de contaminação microbiana, neste caso, as cervejas ficam turvas, ácidas e com odores desagradáveis. O odor desagradável mais importante relacionado à contaminação por bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* é o de manteiga, fornecido pelo diacetil (2,3-butanodiona). Por isso, há um crescente interesse em pesquisar métodos novos de detecção de contaminantes que sejam mais rápidos e específicos (SAKAMOTO *et al.*, 2001).

Portanto, a utilização de métodos para controle da viabilidade e vitalidade de leveduras, além de métodos mais apropriados para detecção dos principais contaminantes cervejeiros, podem ser adequados para garantir um controle de qualidade eficiente nesses estabelecimentos.

## 1.7 MERCADO CERVEJEIRO

A indústria de cerveja é o maior setor da indústria de bebidas alcóolicas, sendo um dos setores de maior contribuição econômica do país, respondendo por 1,7% do PIB. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, com produção de 12,4 bilhões de litros e o consumo oscila em torno dos 60 litros per capita/ano (CERVBRASIL, 2014).

Apesar do clima tropical brasileiro ser favorável ao consumo de cervejas geladas, leves e refrescantes, o mercado cervejeiro brasileiro, que possui marcas nacionais líderes bem estabelecidas, tem sofrido uma transformação profunda com o aumento da oferta de estilos e marcas de cerveja, oferecendo aos clientes cervejas mais alcoólicas e com maior complexidade sensorial.

Atualmente, na tentativa de reviver histórias e sabores, o universo das cervejas artesanais no Brasil vive uma forte expansão de mercado e atrai muitos empreendedores. O crescimento do mercado de cervejas artesanais deve ser exponencial nos próximos anos e a expectativa é que respondam por 2% do negócio de cerveja no País em até uma década (BARBOSA, 2014).

A cada ano surgem novas microcervejarias que disputam o mercado nacional, atualmente são aproximadamente 270 microcervejarias funcionando no País, concentradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O número de cervejeiros caseiros também teve um aumento significativo (BRATT, 2013; BARBOSA, 2014).

Por outro lado, os desafios de mercado para o futuro são grandes. Com a explosão do consumo e a produção de cervejas especiais em crescimento exponencial, em pouco tempo o mercado terá tantas opções que começará a exigir uma melhor qualidade dos produtos, pressionando as empresas no sentido de profissionalizar as suas atividades, buscando métodos padronizados de produção e o uso de boas práticas industriais.

Nesse contexto, o acesso a serviços e métodos de controle de qualidade de cervejas, em todos os aspectos da produção, ainda é bastante restrito e a pesquisa na área deve ser incentivada, pois são escassas as empresas de biotecnologia que possuam esse foco no Brasil. Como exemplos de empresas que atuam no controle de qualidade da indústria cervejeira podem ser citadas a empresa paranaense Bio4 de Curitiba<sup>3</sup> e a mineira Cervlev<sup>4</sup> de Ouro Preto que trabalham com serviços de consultoria em processos fermentativos.

---

<sup>3</sup> Disponível em: <http://www.bio4.com.br/>

<sup>4</sup> Disponível em: <http://www.cerlev.com.br/>

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos que nortearam o trabalho seguem abaixo e estão divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e aplicar um conjunto de métodos microbiológicos e moleculares para analisar a vitalidade, a viabilidade e contaminantes de amostras de leveduras provenientes de microcervejarias e de cervejeiros artesanais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar uma pesquisa de opinião para verificar o interesse de cervejeiros artesanais e relacionados à microcervejarias referente ao controle de qualidade de biomassa de leveduras;
- b) Estabelecer a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a avaliação de contaminantes microbianos (*Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus brevis*) em amostras de leveduras cervejeiras;
- c) Padronizar o método de viabilidade do azul de metileno básico utilizando a levedura WLP500 e avaliar a viabilidade de diferentes gerações desta levedura;
- d) Padronizar o método de vitalidade do poder de acidificação do meio utilizando a levedura WLP500 e avaliar a vitalidade de diferentes gerações desta levedura;
- e) Avaliar a viabilidade e vitalidade das amostras de leveduras provenientes de microcervejarias e de cervejeiros caseiros da mesorregião metropolitana de Porto Alegre.



### 3 JUSTIFICATIVA

Com a explosão do mercado e da cultura cervejeira no Brasil, é crescente o número de microcervejarias e cervejeiros artesanais no país. Entretanto, são poucos que realizam o acompanhamento microbiológico de suas produções. Neste sentido, haverá cada vez mais uma exigência maior da qualidade dos produtos e também da profissionalização das atividades empregadas na indústria microcervejeira.

Assim, torna-se necessário padronizar um conjunto de ferramentas microbiológicas e moleculares que poderão ser utilizadas para avaliar a qualidade das leveduras usadas na produção de cervejas artesanais na mesorregião metropolitana de Porto Alegre. Estes procedimentos poderão servir para, posteriormente, estabelecer um serviço inédito para a mesorregião metropolitana de Porto Alegre e consolidar o conceito de controle de qualidade dentro do universo das cervejas artesanais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE DADOS PARA PESQUISA DE OPINIÃO

Uma pesquisa de opinião foi realizada para levantar dados que refletissem o nível de interesse dos cervejeiros no controle de qualidade de suas produções. O questionário contendo apenas cinco perguntas foi aplicado a 100 cervejeiros artesanais e associados à microcervejarias por meio da página *SurveyMonkey*<sup>5</sup>. As respostas foram analisadas considerando a porcentagem em relação ao total. Questionou-se aos entrevistados: (i) o tipo de relação com a cerveja (cervejeiro artesanal ou relacionado à microcervejaria), (ii) se consideravam importante o controle de qualidade de seus produtos, (iii) se utilizavam algum método para controle de qualidade dos seus produtos (e quais), (iv) se reaproveitavam leveduras (e quantas vezes) e (v) quais informações a respeito do controle de qualidade da levedura seriam de seu interesse.

### 4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE MICROCERVEJARIAS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE

Amostras de 300 mL de cerveja ou *slurry* provenientes de três microcervejarias da mesorregião metropolitana de Porto Alegre foram cedidas gentilmente (fornecedores não divulgados) para os testes de viabilidade e vitalidade de leveduras. Solicitou-se aos cervejeiros que as amostras fossem coletadas em recipientes sanitizados com solução de iodoform (15 ppm) e armazenadas sob refrigeração (2 a 4 °C) até o transporte ao laboratório. No laboratório, as amostras foram centrifugadas por 3000 rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos e lavadas com água destilada três vezes (novamente 3000 rpm durante 5 minutos). Foram adicionados 300 mL de água destilada estéril nas amostras e estas foram armazenadas por um curto período de tempo (sempre que possível, os ensaios foram realizados no mesmo dia do recebimento da amostra) no refrigerador para análises posteriores de viabilidade e vitalidade.

---

<sup>5</sup> Disponível em: <https://pt.surveymonkey.com>.

### 4.3 PREPARO DE CULTURAS, CEPA DE LEVEDURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A cepa cervejeira de *Saccharomyces cerevisiae* WLP500 proveniente da White Labs (San Diego, Eua)<sup>6</sup>, foi utilizada para a padronização dos ensaios de viabilidade, vitalidade e detecção de contaminantes. De acordo com seu fornecedor, esta levedura é originária de uma das cervejarias trapistas da Bélgica e é utilizada por cervejeiros do mundo para a fabricação de cervejas de alta gravidade, como Dubbles e Trippels.

Para o cultivo e a manutenção de rotina da cepa de levedura usada neste trabalho foi empregado o meio de cultura YPD, o qual é constituído de 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de dextrose e água destilada 1 L. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para preparação do meio sólido foi acrescentado 15 g/L de bacto-ágar e o meio resultante também esterilizado em autoclave nas mesmas condições acima descritas.

Para os ensaios de vitalidade e viabilidade, foram utilizadas culturas da cepa de levedura WLP500 crescidas em condições controladas de temperatura e agitação. Inicialmente, uma pré-cultura da cepa WLP500 foi obtida em 200 mL de meio YPD líquido após a incubação dos frascos de Erlenmeyer sob agitação a 200 rpm e 25 °C por aproximadamente 48 horas. Para determinar o número de células por mL, 1 mL da pré-cultura foi retirado para a contagem em câmara de Neubauer, seguido da padronização do número de células para  $5 \times 10^7$  células/mL. A partir do volume determinado na contagem, três novas culturas (triplicata biológica) foram feitas em erlenmeyers de 2000 mL esterelizados contendo 200 mL de meio YPD. Os erlenmeyers foram incubados em incubadora com agitação a 200 rpm e 25 °C por aproximadamente 24 horas, até as células entrarem na fase estacionária (aproximadamente  $10^8$  células/ mL). Uma vez obtidas as culturas, o número de células foi novamente determinado através de contagem em câmara de Neubauer e ajustado para a realização dos experimentos de viabilidade e vitalidade. O procedimento de reinoculo das leveduras em novos meios de cultura foi repetido, as células foram incubadas nas mesmas condições que as culturas anteriores e novamente os experimentos de viabilidade e vitalidade foram realizados, durante 5 gerações (Figura 4).

---

<sup>6</sup> Disponível em: <http://www.whitelabs.com/yeast/wlp500-trappist-ale-yeast-0>

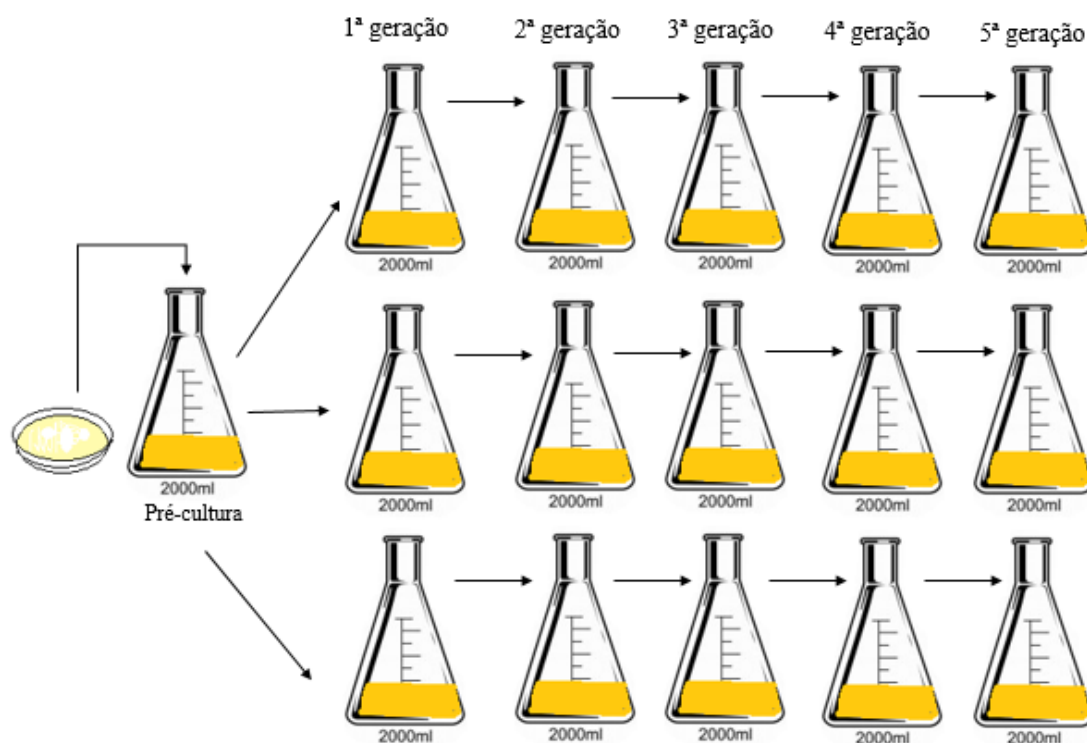


Figura 4 - Preparo de pré-cultura e culturas de WLP 500 ao longo de cinco gerações (reutilizações).

#### 4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE AZUL DE METILENO BÁSICO

Para analisar a viabilidade das leveduras cervejeiras, foi utilizado o método de coloração com azul de metileno básico (SAMI *et al.*, 1994). Neste caso, todas as células vivas não são coradas com azul de metileno (Figura 5A), enquanto que as células não viáveis ficaram coradas (Figura 5B).

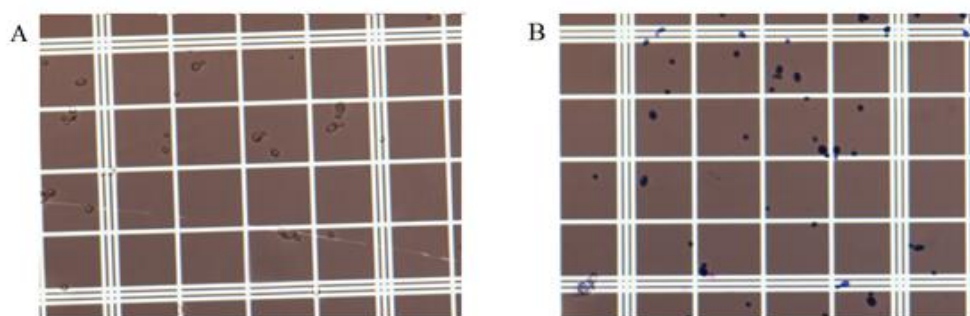


Figura 5 -Teste de viabilidade de leveduras com azul de metileno básico em câmara de Neubauer indicando células viáveis (4A) e não viáveis (4B). Aumento do microscópio de 400x.

Para a realização do ensaio, uma solução aquosa de 0,1% (p/v) de azul de metileno foi diluída 10x em tampão glicina 0,1 M e com pH ajustado para 10,6 (solução de coloração). Uma suspensão celular, contendo  $2 \times 10^7$  células/mL, foi lavada três vezes com água destilada estéril e misturada com um volume igual da solução de coloração e incubada a 25 °C por 15 minutos. Uma alíquota de 10  $\mu$ L desta suspensão foi aplicada em câmara de Neubauer para contagem do número de células coradas (definidas como células inviáveis) e células não coradas (células viáveis). Cerca de 150 células totais em três réplicas técnicas (totalizando 450 células) foram contadas por amostra. A viabilidade da amostra foi determinada, de acordo com a seguinte equação:

$$Viabilidade(\%) = \frac{\sum_{i \geq 150} tc - \sum cm}{\sum_{i > 150} tc \times 100}$$

(1)

Onde  $\sum_{i \geq 150} tc$  é o somatório do número total de células (tc) obtido em câmara de Neubauer (contendo um número igual ou superior a 150 células) e  $\sum cm$  é o somatório de células não-viáveis (coradas com azul de metileno) visto em câmara de Neubauer.

#### 4.5 ENSAIO DE VITALIDADE PELO MÉTODO DO PODER DE ACIDIFICAÇÃO DO MEIO

O ensaio de vitalidade ou teste de acidificação do meio foi realizado conforme descrito por Kaka et al (1988) com adaptações. Para a realização deste ensaio, uma alíquota de 1 mL das amostras foi retirada e o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Uma alíquota contendo  $1 \times 10^8$ /mL células foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O precipitado celular foi lavado três vezes com água destilada estéril e misturado com 10 mL de água destilada estéril (pH ajustado para 6,3) a uma temperatura de 25 °C. O pH inicial da suspensão celular foi registrado por 10 minutos e, então, 500 µL de uma solução de 20% (p/v) de glicose estéril foi adicionado e o pH registrado por mais 10 minutos. O poder de acidificação (PA), que indica a vitalidade da levedura foi calculado por meio da equação algébrica (2):

$$PA=(pH0-pH10)+(pH10-pH20)$$

Onde pH0 é o valor de pH observado no início do experimento (tempo 0 min), pH10 é o valor de pH em 10 min após o início do experimento e pH20 é o valor de pH observado após a adição de glicose nos 10 min finais do experimento.

#### 4.6 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE AMOSTRAS DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS

Para detecção de contaminantes e/ou presença de microrganismos em cervejas pela técnica de PCR, o DNA total das seguintes amostras de levedura cervejeiras foi extraído, purificado e quantificado: cultura de levedura WLP 500 (controle para PMA1), da cerveja de fermentação espontânea Lindemans Faro (controle para *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus damnosus*) e de uma amostra de microcervejaria contendo levedura *Saccharomyces cerevisiae* Para tanto, uma suspensão celular (2 mL) de cada amostra foi macerada na presença de microesferas de vidro de 400 µm

de diâmetro, provenientes da empresa Sigma-Aldrich<sup>7</sup>, o sobrenadante foi coletado e a extração do DNA total foi realizada através do método de termólise adaptado (Zhang *et al.*, 2010).

Uma alíquota contendo 100 µL do sobrenadante e 100 µL de água destilada estéril foi centrifugada a 10.000 rpm durante 1 minuto. Após o sobrenadante proveniente da centrifugação ter sido cuidadosamente descartado, 100 µL de uma solução de lise (50 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 1 mmol/L de EDTA e 5% de glicerol) foram adicionados. A mistura foi incubada a 85 °C em um Thermomixer proveniente da empresa Eppendorf<sup>8</sup> durante 30 minutos.

O DNA assim extraído foi purificado em dois passos. No primeiro passo, foi utilizado 100 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos e foi coletado o sobrenadante. No segundo processo de purificação, foram utilizados 200 µL de etanol e 10 µL de acetato de potássio 3 M com pH 5,5, as amostras foram incubadas no gelo por 10 minutos, centrifugadas novamente a 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado.

A qualidade do DNA total extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1×, sendo a concentração de DNA total determinada por espectrofotometria por meio da  $A_{260}$ . A presença de proteínas nas amostras de DNA total foi determinada pela  $A_{280}$ , sendo a pureza da amostra calculada pela razão  $A_{260}/A_{280}$ , onde valores entre 1,5 e 2,0 (inclusive) indicaram amostras suficientemente livres de contaminantes proteicos.

#### 4.7 DESENHOS DOS INICIADORES DE DETECÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS

Na literatura foram buscados marcadores moleculares que pudessem identificar os potenciais microrganismos contaminantes em amostras de leveduras cervejeiras. Para *Lactobacillus brevis* foi utilizada região intergênica do rDNA 16 S (GUARNERI; ROSSETTI; GIRAFFA, 2011), correspondendo as sequências de 761 a 1028 pb. Para *Pediococcus damnosus* o plasmídeo pF8001 (BENEDUCE *et al.*, 2004) foi usado como molde para os desenhos dos iniciadores e a região

---

<sup>7</sup> Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com>

<sup>8</sup> Disponível em: <http://www.eppendorf.com/>

correspondente às sequências de 4025 e 4255 pb foi amplificada. Para *S. cerevisiae*, o gene PMA1 (SERRANO; KIELLAND-BRANDT; FINK, 1986) foi utilizado e a região correspondentes às sequências de 612 a 814 pb foi amplificada. Os iniciadores utilizados, desenhados através da página Primer3Plus<sup>9</sup> e sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia<sup>10</sup>, utilizando a escala de síntese de 25mM.

Tabela 1 - Lista dos iniciadores senso (iniciador\_F) e antisenso (iniciador\_R) usados na identificação de *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pediococcus damnosus* em amostras de leveduras cervejeiras. A sequência dos iniciadores, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons) são indicados na tabela.

Microrganismo	Tamanho do amplicon	Iniciador_F	Iniciador_R
<i>Lactobacillus brevis</i>	267 pb	cagctcgtgtcgtgagatgt	ttcatgtaggaggagttgcag
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	205 pb	ggttactgccgttgcgaat	ttcccagtgaccttcacctc
<i>Pediococcus damnosus</i>	390 pb	tgagcgtcaagcccttagtt	gaccggtttttcgctgttta

#### 4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) foi utilizado para a detecção de contaminantes microbianos na biomassa de leveduras cervejeiras. Para isso, foram preparadas 12 reações de PCR contendo 10 ng de DNA cada, sendo quatro reações diferentes (Controle sem DNA, DNA extraído de leveduras proveniente de microcervejaria, DNA extraído da cultura de WLP500 e DNA extraído de cerveja Lambic) para cada um dos três conjuntos de iniciadores.

Cada reação de PCR incluiu 5 µL de tampão 1x específico para a enzima Taq DNA polimerase, proveniente da empresa BioLabs<sup>11</sup>, 1 µL de dNTPs 25 mM, proveniente da empresa Thermo Scientific<sup>12</sup>, 1 µL de cada iniciador, 0,1 µL de Taq DNA polimerase também proveniente da empresa BioLabs e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar 25 µL.

<sup>9</sup> Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cbi-bin/primer3plus.cgi/>

<sup>10</sup> Disponível em: <http://www.sintesebiotecnologia.com.br/>

<sup>11</sup> Disponível em: <http://www.cellbiolabs.com/>

<sup>12</sup> Disponível em: <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>



As condições de PCR incluíram 40 ciclos com um passo de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, um passo de anelamento a 55 °C por 1 minuto e um passo de extensão a 72 °C por 1 minuto.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão TAE 1x e foi avaliada a presença ou não de amplicons referentes aos diferentes microrganismos avaliados.

#### 4.9 GRÁFICOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e a análise estatística dos resultados dos testes de viabilidade e vitalidade da levedura WLP500 foram realizados utilizando o software Excel 2013 proveniente da empresa Microsoft (<http://microsoft-excel.softonic.com.br/>). Médias e desvios padrões das triplicatas técnicas e biológicas foram determinados e o gráfico foi plotado. O teste estatístico t-student foi utilizado para comparar as médias de viabilidade e vitalidade das gerações subsequentes com a média da primeira geração. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PESQUISA DE OPINIÃO PARA ANALISAR O INTERESSE DOS CERVEJEIROS ARTESANAIS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS

A partir da observação dos dados apresentados que indicam um crescimento exponencial do mercado das cervejas artesanais no Brasil (CERVBRASIL, 2014) e da constatação da escassez de métodos e serviços disponíveis no país para o controle de qualidade de leveduras cervejeiras, surgiu a ideia de fazer uma pesquisa de opinião entre os cervejeiros caseiros e relacionados à microcervejarias para mostrar a existência do interesse e da necessidade do uso desse tipo de métodos e serviços.

Na pesquisa de opinião realizada neste trabalho, 84% dos entrevistados declararam ser cervejeiros caseiros e 16% declararam trabalhar com microcervejaria. A maioria destes entrevistados (94%) considera o controle de qualidade do produto um fator importante, enquanto os outros 6% consideram este fator sem importância ou indiferente. De fato, com o crescimento do mercado, apenas as empresas que investirem em melhorar a qualidade de seus produtos irão sobreviver ao aumento da competição entre as microcervejarias (REVISTA DA CERVEJA, 2014). Mesmo para os cervejeiros caseiros que não fazem parte deste mercado, porque produzem cerveja para o consumo próprio, o controle da qualidade aparece como um fator importante, pois estes estão cada vez mais bem informados acerca dos detalhes do processo fermentativo, querendo entender melhor sobre o seu produto e produzir cervejas de boa qualidade.

Quando questionados sobre a utilização de algum método ou serviço para controle de qualidade dos seus produtos, a maioria (72%) manifestou que não utiliza nada desse gênero, mas gostaria de utilizar. Enquanto que 16% dos entrevistados responderam que utilizam algum método ou serviço para o controle de qualidade de seus produtos, citando os usos de refratômetros e hemocitômetros, o controle da temperatura na fermentação, análise sensorial, contagem de viabilidade de fermento reutilizado e análise de contaminação por microscópio, como algumas técnicas utilizadas. Por outro lado, a minoria (12%) declarou que não utiliza nenhum tipo de

método ou serviço para o controle de qualidade e mesmo assim está satisfeita com sua produção.

Dos cem entrevistados, 66% informaram que não reaproveitam leveduras, enquanto 10% reaproveitam pelo menos uma vez, 7% reaproveitam de duas a quatro vezes e 17% reaproveitam mais do que quatro vezes suas leveduras.

Quando nos referimos ao reaproveitamento de leveduras, estamos abordando um procedimento vantajoso, considerando a situação atual de que a maioria das leveduras utilizadas no Brasil é proveniente de outros países, porque aqui são escassas as empresas que possuem bancos de leveduras (a empresa Bio4 tem produção própria de leveduras, e as empresas BodeBrown (Curitiba – Paraná), Arte Brew (Campinas – São Paulo) e Lamas Brew Shop (Campinas – São Paulo) importam leveduras cervejeiras de empresas do exterior).

Muitas vezes por falta de métodos de controle de qualidade de suas leveduras, os cervejeiros não reaproveitam suas leveduras, ou reaproveitam de maneira inadequada. No exterior, em alguns países da Europa e principalmente nos EUA o controle de qualidade aparece como um fator bastante desenvolvido e empresas americanas como a Wyeast (Hood River- Oregon) e a White LABS (San Diego, Califórnia) se destacam nesse segmento.

Por fim, 82 cervejeiros manifestaram o interesse em saber sobre a vitalidade de suas leveduras, 81 cervejeiros gostariam de poder detectar os contaminantes de seu produto e 80 cervejeiros gostariam de saber a viabilidade de suas leveduras. O interesse em saber outro tipo de informação acerca das leveduras cervejeiras foi manifestado por 9 cervejeiros, que citaram como assuntos relevantes métodos de manipulação, propagação e armazenamento, além de informações sobre mutações que possam afetar a fermentação (técnica para detectar mutações já foi desenvolvida no Seibel Institute em Illinois, Chicago e está disponível para os cervejeiros Americanos).

Nesse contexto, os métodos existentes para detecção de contaminantes e monitoramento da viabilidade e vitalidade de leveduras exigem conhecimentos de bioquímica, microbiologia, biologia molecular e equipamentos que não são acessíveis para todos os cervejeiros. Mesmo assim, alguns métodos como a determinação de viabilidade a partir da coloração com azul de metileno, poder de acidificação do meio e detecção a partir de meios de cultura já são bastante utilizados por cervejeiros artesanais dos EUA e de países da Europa que possuem a

cultura cervejeira mais desenvolvida. Para realizar adequadamente o controle de qualidade da sua produção, o cervejeiro precisaria ter um laboratório exclusivo para essa função, o que de acordo com Allen (1994) para uma produção pequena como a de uma microcervejaria ou de um cervejeiro caseiro é economicamente inviável. Allen também divide as microcervejarias em dois grupos, aqueles que já sofreram com algum tipo de contaminação em suas produções e os cervejeiros que ainda vão sofrer. Destaca que mesmo cervejeiros que mantêm boas práticas de sanitização e a produção de ótimas cervejas por vários anos sem nenhum controle microbiológico, estão sujeitos a perder uma produção inteira em algum momento.

Por isso, empresas que ofereçam essas análises para os cervejeiros, são de extrema importância para o desenvolvimento da cerveja artesanal no Brasil.

## 5.2 AVALIAÇÃO DE CONTAMINANTES EM LEVEDURAS CERVEJEIRAS

A avaliação de contaminantes em leveduras cervejeiras é uma questão de grande interesse entre os cervejeiros artesanais. Isso porque, responsáveis por aproximadamente 70% das contaminações em cervejarias, bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* conseguem crescer no mesmo pH de crescimento das leveduras cervejeiras e produzir odores desagradáveis, comprometendo lotes inteiros de cerveja. Algumas cervejarias utilizam a análise sensorial como forma de controle (Minicursos CRQ-IV, 2010), mas esta não é uma forma totalmente segura. Outros métodos utilizados atualmente para detecção de contaminantes, como meios de cultura específicos, também são pouco eficientes e o resultado é demorado (DRADONE *et al.*, 2007). Assim, a pesquisa de métodos rápidos e com eficiência elevada torna-se bastante necessária e o método de PCR, que detecta a presença do DNA de microrganismos contaminantes a partir de uma pequena quantidade de amostra, mesmo antes que qualquer alteração seja percebida na produção, aparece como uma boa alternativa aos métodos convencionais. De acordo com Zindulis (2002), a técnica de PCR está gradualmente ganhando aceitação como uma ferramenta de controle de qualidade na indústria de alimentos e já vem sendo utilizada na indústria cervejeira nos Estados Unidos e na Europa. Uma das melhores instituições de ensino e pesquisa em cerveja do mundo, o Seibel Institute<sup>13</sup> utiliza

---

<sup>13</sup> Disponível em: <http://www.siebelinstitute.com/>

PCR para identificar e diferenciar cepas de levedura, para detecção de contaminantes e além de mutações. Neste trabalho, o método de PCR foi utilizado para a tentativa de detecção dos contaminantes *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus damnosus*, que foram descritos na literatura como as principais espécies contaminantes de leveduras cervejeiras (CARVALHO; BENTO; SILVA 2006).

Porém, a padronização do método e detecção de microrganismos a partir dos iniciadores desenhados não foi realizada com sucesso. O DNA total extraído das amostras parece ter sofrido algum tipo de degradação e a amplificação não pode ocorrer.

Portanto, as etapas envolvidas no método para detecção de contaminantes em leveduras cervejeiras, como extração do DNA total, purificação e reação de PCR precisam ser revisadas e repetidas.

### 5.3 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE VIABILIDADE DO AZUL DE METILENO BÁSICO PARA AVALIAR A VIABILIDADE DE DIFERENTES GERAÇÕES DA LEVEDURA WLP500

Para a prática de reutilização de leveduras, é de fundamental importância o conhecimento da porcentagem de células vivas, para determinar a taxa de inoculação na próxima cerveja. A viabilidade das leveduras depende de diversos fatores, como a disponibilidade de nutrientes e temperatura de armazenamento (NICHOLSON; PEARSON, 2014).

Para análise de viabilidade, um método usualmente utilizado pelos cervejeiros é a coloração com azul de metileno clássico (solução de corante com água) (ALLEN, 2014). O azul de metileno possui carga negativa, que é a mesma carga da membrana da célula da levedura. Por isso quando as células estão vivas, o corante não entra, mantendo as células incolores (SAMI; IKEDA; YABUUCHI, 1994). Neste trabalho, nós utilizamos a coloração com azul de metileno básico (solução de corante com tampão glicina), que de acordo com Sami, Ikeda e Yabuuchi (1994) é mais eficiente do que a coloração clássica.

Para tanto, foi escolhida a levedura WLP500, pois já veio sendo utilizada em outros trabalhos no laboratório. Os resultados dos testes de viabilidade de WLP500 (Figura 6) ao longo de quatro gerações indicam uma diminuição estatisticamente não significativa na viabilidade da segunda e da terceira geração e um aumento

estatisticamente significativa na viabilidade da quarta geração em relação à primeira. A diminuição da viabilidade, seguida do aumento significativo talvez possa ser explicada por um interessante comportamento altruísta observado em leveduras *S. cerevisiae* de laboratório. De acordo com Salamon (2014), as leveduras podem secretar uma série de enzimas, como por exemplo a invertase, que liberam precursores de moléculas de nutrientes utilizáveis no meio e isso tem um custo de energia, fazendo com que a população capaz de produzir invertase tenha uma baixa taxa de crescimento. Porém, nem todas as células secretam invertase e estas crescem em monossacarídeos que são liberados por células produtoras de invertase, sem custo de energia. No entanto, assim que as células produtoras de invertase morrem e a fonte de energia seca, as células que não produzem invertase vão morrer também, o que talvez fosse observado nas próximas gerações.

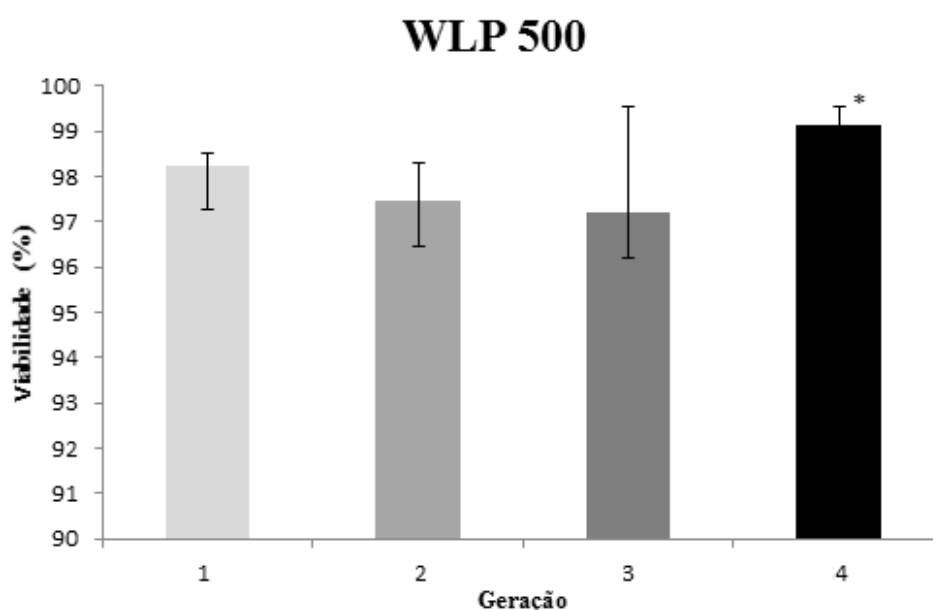


Figura 6 - Porcentagem de viabilidade da levedura WLP500 mensurada durante quatro gerações. \* Aumento de viabilidade estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparado à primeira geração.

Na quinta geração, observamos no microscópio a flocculação das células de levedura (Figura 7).

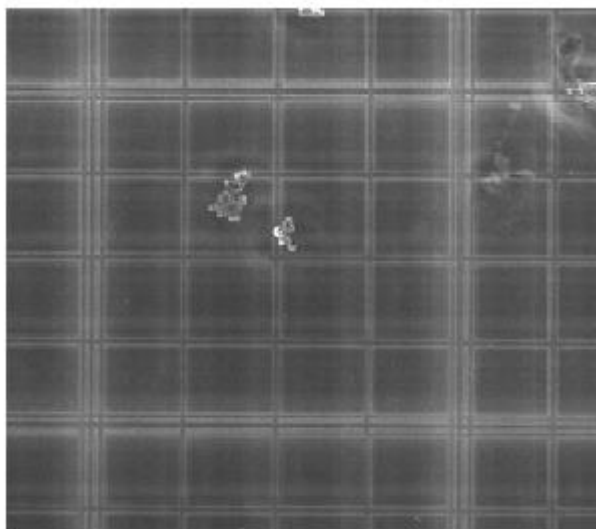


Figura 7 – Formação de flocos de células durante quinta geração da cultura da levedura WLP500.

Floculação é uma característica adquirida através da seleção artificial, geralmente importante para a indústria cervejeira. Por outro lado, floculações prematuras podem ter consequências ruins, gerando problemas na atenuação da cerveja, por conta da diminuição da atividade fermentativa e podem gerar graves *off-flavors* (DE CLERCK, 1984). As leveduras floculam quando o final da fermentação se aproxima, formando aglomerados de células que sedimentam (em cervejas Lager) ou sobem à superfície (em cervejas Ale), permitindo a coleta das leveduras para o reaproveitamento (DE CLERCK, 1984). A floculação de leveduras cervejeiras é um fenômeno complexo e pouco estudado que parece depender de parâmetros como disponibilidade de nutrientes, oxigênio dissolvido, pH, temperatura de fermentação, manuseio e condições de armazenamento (VERSTREPEN *et al*, 2003; BUTTNER *et al*, 2006). Segundo Verstrepén *et al* (2003), a floculação é específica da espécie, o que torna difícil prever respostas específicas. Além disso, alguns genes envolvidos na floculação são bastante variáveis, o que causa frequentes mudanças no perfil de floculação de algumas cepas.

Portanto, durante o reaproveitamento de leveduras além da viabilidade e da vitalidade, as características de floculação particulares de cada cepa devem ser observadas e os parâmetros envolvidos conhecidos devem ser controlados para tentar evitar variação do perfil de floculação ao longo das gerações.

#### 5.4 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO DE VITALIDADE PARA DIFERENTES GERAÇÕES DE LEVEDURA WLP500

Da mesma forma que a viabilidade, a análise da vitalidade das leveduras cervejeiras é de extrema importância para garantir um reaproveitamento adequado das mesmas na indústria microcervejeira. A vitalidade também é dependente de vários fatores, tais como controle de temperatura de armazenamento, taxa de inoculação no mosto e mutações deletérias que surgem espontaneamente na população de leveduras. Para evitar perda da vitalidade, após a coleta as leveduras, as mesmas devem ser armazenadas a baixas temperaturas (2 °C a 4 °C) em água destilada, diminuindo a atividade metabólica, até a reinoculação em um meio com nutrientes, e essa reinoculação não deve exceder 24 horas. Quando os tempos de armazenamento excedem 24 horas, tem sido relatado um aumento na frequência de mutações *petit* (GOLDRING *et al*, 1971) Esse tipo de mutação leva a perda de função respiratória, resultando na má utilização dos açúcares fermentáveis, floculação imprópria de células, redução do etanol e defeitos sensoriais (POWELL *et al*, 2000).

Durante a fermentação, Sigler *et al* 1981 mostrou que a capacidade das células de levedura de acidificar o meio pode ser proveniente da produção de CO<sub>2</sub> e da extrusão de H<sup>+</sup> pela proteína PMA1 (H<sup>+</sup>-ATPase da membrana de *S. cerevisiae*). Assim, uma forma eficiente e rápida de estimar a vitalidade de leveduras cervejeiras é através do uso de métodos capazes de medir a extrusão de H<sup>+</sup> pelas células de levedura (Kara *et al*, 2008). Por sua vez, Nicholson & Pearson (2014) atentam para a diminuição da eficiência de produção de CO<sub>2</sub> durante a fermentação de leveduras que foram armazenadas por mais tempo e em temperaturas mais altas, mas não demonstram como essa vitalidade decai ao longo do tempo.

Nesse contexto, neste trabalho, a vitalidade da levedura WLP500 foi analisada pelo método de acidificação do meio (Kara *et al*, 2008) durante quatro gerações (Figura 2), onde verificamos que ocorre um decaimento estatisticamente significativo da vitalidade da segunda (1,01), da terceira (0,97) e da quarta geração em relação à primeira (1,07), mas não vemos diferenças estatisticamente significativas na vitalidade comparando a segunda, a terceira e a quarta geração, indicando que a vitalidade da levedura WLP500 tem uma diminuição e depois parece se estabilizar por algumas gerações. Para obter melhores conclusões da



análise de vitalidade de WLP500 também seria necessário analisar mais gerações.

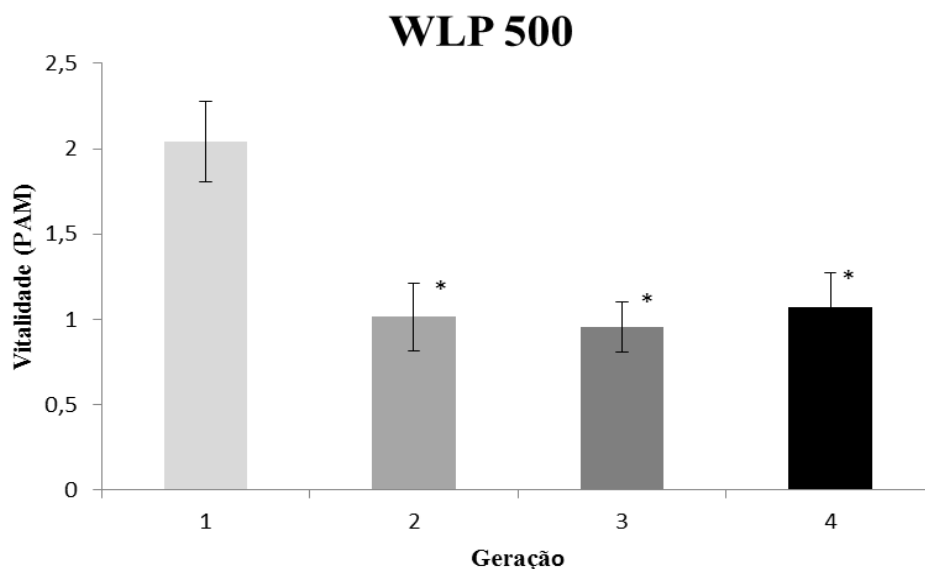


Figura 8 - Poder de acidificação da cepa WLP500 em meio de cultura YPD, indicando a vitalidade, mensurado durante quatro gerações. \*Aumento de vitalidade estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparado à primeira geração.

É importante salientar que o poder de acidificação do meio é uma forma indireta de avaliar a vitalidade da levedura que ignora uma variedade de outros atributos como atenuação, reabsorção de diacetil, produção de off flavors e floculação, fazendo apenas uma estimativa da vitalidade das células.

Existem outros métodos para medir a vitalidade das células, utilizados por empresas nos EUA e na Europa, como: (i) citometria de fluxo para medir o nível de alguns compostos como trealose, (ii) ensaios para medir atividades de enzimas (álcool desidrogenase, piruvato descarboxilase, piruvato desidrogenase, maltase, protease), (iii) capacidade de redução de O<sub>2</sub> e (iv) formação de etanol (HUTZLER; MÜLLER-AUFFERMANN; JACOB, 2012). Contudo, o método do poder de acidificação do meio ainda aparece como uma forma mais prática de medir a vitalidade das leveduras cervejeiras. Porém, de acordo com Sigler (2013), os resultados a partir deste método estão sujeitos à variações que podem ser mascaradas por diferentes taxas de inoculação, composição do mosto, tipo de tanque de fermentação e diversos outros fatores.

Outro fator importante é que ainda não existe uma escala padrão de vitalidade para avaliar amostras de leveduras e inferir se a vitalidade está adequada ou não

para uma determinada cepa. Para tanto, culturas de diversas gerações e diferentes cepas de leveduras cervejeiras devem ser analisadas.

## 5.5 VIABILIDADE E VITALIDADE DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE MICROCERVEJARIAS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE

Apesar de não terem sido encontrados na literatura dados que comprovem, é de conhecimento popular que a mesorregião metropolitana de Porto Alegre vem se estabelecendo como um polo cervejeiro expressivo no País. De acordo com Schardong (2012), existem poucas informações sobre o mercado de microcervejarias no Rio Grande do Sul e estas dificilmente derivam de fontes confiáveis.

Foi em Porto Alegre que surgiu a primeira microcervejaria brasileira em 1995, a Dado Bier (que hoje faz suas cervejas em Santa Maria). Em 2010, um polo cervejeiro no bairro Anchieta, na Zona norte da cidade de Porto Alegre, começou a surgir e conta hoje com sete microcervejarias (Babel cervejaria, Microcervejaria Irmãos Ferraro, Cervejaria Lagom, Cerveja Tupiniquim, Baldhead Craft Beers, Távola Cervejas Especiais e Seasons Craft Brewery). Além disso, microcervejarias fora do bairro Anchieta como Anner Cervejas Especiais, Barley, Cervejaria Abadessa, Cervejaria Schmitt, Rasen Bier e diversas outras garantem o atual destaque do Rio Grande do Sul no cenário cervejeiro brasileiro.

Apesar de várias dessas microcervejarias reaproveitarem suas leveduras, não são empregados métodos para o controle de qualidade na maioria destes estabelecimentos e não existe na mesorregião metropolitana nenhuma empresa que ofereça esse tipo de serviço para estes estabelecimentos.

Nesse contexto, buscou-se analisar a viabilidade e vitalidade de leveduras provenientes de algumas dessas microcervejarias, para verificar a qualidade do que vem sendo reaproveitado.

Foram quatro microcervejarias da mesorregião metropolitana de Porto Alegre que reaproveitam leveduras e que cederam gentilmente amostras de diferentes estilos de cerveja e diferentes gerações para as análises (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das análises de viabilidade e vitalidade das leveduras de diferentes estilos de cerveja e diferentes gerações de microcervejarias da mesorregião metropolitana de Porto Alegre.

Estilo de cerveja	Geração	Viabilidade	Vitalidade
Pilsen	4	80%	0,6
Weizen	2	78%	0,3
Amber Ale	2	42%	0,7
Weizen	4	89%	1,4
Trapista	8	8%	0,7
Pale Ale	1	83%	0,7
Weizen	2	94%	0,9
Pale Ale	1	83%	0,6

A partir destes resultados, podemos observar que leveduras de viabilidades e vitalidades variáveis vem sendo utilizadas pelas cervejarias, podendo comprometer a qualidade das cervejas produzidas, a partir da geração de off flavors e problemas na atenuação (NICHOLSON; PEARSON, 2014). Na tabela, valores maiores de poder de acidificação do meio, indicam melhores vitalidades. Também verificamos que as viabilidades das leveduras não possuem relação com as vitalidades ao longo das gerações. Se as leveduras estão vivas, não necessariamente estão fermentando adequadamente e as características desejadas de determinadas cepas, podem ser comprometidas por mutações que vão se acumular ao longo das gerações (POWELL; QUAIN; SMART, 2000), ou por diversos outros fatores. Por isso são fundamentais os usos de métodos para verificar tanto a viabilidade, quanto a vitalidade das leveduras cervejeiras provenientes de microcervejarias, evitando o reaproveitamento de leveduras que já estão com a capacidade fermentativa comprometida.

## 6 CONCLUSÃO

Ao término do trabalho, conclui-se que existe um grande interesse dos cervejeiros artesanais em relação ao controle de qualidade de suas leveduras e que faltam empresas que ofereçam métodos e serviços deste gênero, portanto existe oportunidade para a criação de uma empresa de Biotecnologia que atue na mesorregião de Porto Alegre.

Leveduras com viabilidades e vitalidades bastante variáveis estão sendo reutilizadas pelas microcervejarias. Por conta disso, a realização de análises de viabilidade e vitalidade são realmente fundamentais para garantir a qualidade das cervejas.

A padronização dos métodos de vitalidade e viabilidade foi realizada com sucesso, porém para a detecção de contaminantes ainda são necessários mais estudos. Através da aplicação dos métodos de coloração de azul de metileno básico e poder de acidificação do meio a cepa de levedura WLP500, observamos que a viabilidade não está relacionada com a vitalidade ao longo das gerações e que mais gerações deveriam ser analisadas para gerar dados mais conclusivos.

Assim, os objetivos propostos no projeto foram alcançados. Entretanto, é preciso aprofundar os dados obtidos analisando o perfil de viabilidade e vitalidade de WLP 500 no mosto e analisar outras cepas de leveduras.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, F. The microbrewery laboratory manual: a practical guide to laboratory techniques and quality control procedures for small-scale brewers: yeast management. **Brewing Techniques**, Orlando, 1994. Disponível em: <<http://morebeer.com/brewingtechniques/library/backissues/issue2.4/allen.html>>. Acesso em: 18 abr. 2014.
- AMORIM, B. As duas grandes famílias cervejeiras. **Revista da cerveja**, 2013, v. 7, p. 52-54.
- BARBOSA, M. Q. O negócio milionário das cervejas artesanais. **Isto é**, São Paulo, 16 ago. 2013. Seção Economia & Negócios. Disponível em: <[http://www.istoe.com.br/reportagens/319458\\_O+NEGOCIO+MILIONARIO+DAS+CE RVEJAS+ARTESANAIS](http://www.istoe.com.br/reportagens/319458_O+NEGOCIO+MILIONARIO+DAS+CE RVEJAS+ARTESANAIS)>. Acesso em: 14 maio 2014.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast**, 2010, v. 16, p. 755-771.
- BENEDUCE, L.; SPANO, G; VERNILE, A.; et al. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. **Journal of Basic Microbiology**, 2004, v. 44 , p. 10-16.
- BJCP style guidelines. 2014. Disponível em: <<http://www.bjcp.org/docs/2014%20BJCP%20Style%20Guidelines%20.pdf>> Acesso em: 10 junho 2014.
- BING, J.; HAN, P.; LIU, W.; et al. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. **Current biology**, 2014, v. 24, p. 380-381.
- BRATT, A. A revolução das cervejas artesanais brasileiras. **Guia da cerveja**, 2013, v. 8, 10-130.
- BÜTTNER, S.; EISENBERG, T.; HERKER, E.; et al. (2006) Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love and war. *The journal of cell biology*, 2006, v. 175, p. 521–525.
- CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. revista analytica, São Paulo, v. 25, p. 36-42, out/nov 2006.
- CERVEJA no Brasil. **Cervbrasil**. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/a-cerveja/>>. Acesso em: 06 jun. 2014.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 124f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CONTROLE de qualidade cervejas. **Minicursos CRQ-IV**. 2010. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/a\\_cerveja\\_e\\_seus\\_segredos\\_site.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/a_cerveja_e_seus_segredos_site.pdf)>. Acesso em: 21 maio 2014.

DAMASCENO, A. Sabor da tradição. **Guia da cerveja**, 2013, v. 8, p. 76-85.

DE CLERCK, J. **Cours de brasserie**. 2 ed. New York, London: Academic Press, 1984.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; et al. Produção de cerveja: microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2007, v. 10, p. 240-25.

FARIA, J. R. Mineira Wäls conquista prêmio na copa do mundo das cervejas. **Veja**, Belo Horizonte, 23 abr. 2014. Disponível em: <<http://vejabh.abril.com.br/edicoes/online-cerveja-wals-premio-titulo-779936.shtml>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

FASOLI, E.; ALDINI, G.; REGAZZONI, L.; et al. Les Maîtres de l'Orge: The Proteome Content of Your Beer Mug. **Journal of proteome research**, 2010, v. 9, p. 5262-5269.

GUARNIERI, T.; ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Rapid identification of lactobacillus brevis using the polymerase chain reaction. **Letters in applied microbiology**, 2001, v. 33, p. 377-381.

GOLDRING, E.; LAWRENCE, I.; GROSSMAN; Petite mutation in yeast II: Isolation of mutants containing mitochondrial deoxyribonucleic acid of reduced size. **Journal of bacteriology**, 1971, v. 107, 377-381.

HELD, P. **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae**. 2010. Disponível em: <<http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>> Acesso em: 04 abr. 2014

HUTZLER, M. ; MÜLLER-AUFFERMANN, K. ; JACOB, F. **Yeast quality control: standards and novel approaches**. 2012. Disponível em: <[http://www.europeanbreweryconvention.org/PDF/2012/symposium2012/L8\\_M\\_Hutzler.pdf](http://www.europeanbreweryconvention.org/PDF/2012/symposium2012/L8_M_Hutzler.pdf)>. Acesso em: 12 maio 2014.

KAKA, B.; SIMPSON, W.; HAMMOND J. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, 1988, v. 94, p. 153-158.

LIBKIND D., HITTINGER C.T.; VALÉRIO E.; et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2011, p. 30-44.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

NICHOLSON, M; PEARSON, B. Variables Influencing Viability of Brewer's Yeast. **Fungi**, 2014, v. 7, p. 23-27.

OJO, F. T. **Microbiological Quality Control of Beer in Brewing Industry**. 2010. Disponível em: < <http://www.research-arena.webs.com/Term%20paper%20on%20quality%20control%20of%20beer.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2014.

PALMER, J. J. **How To Brew**. 3 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2006

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; et al. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, 2014, v. 98, p. 1937-1949.

POWELL, C.; QUAIN, D.; SMART, K. (2000) The impact of media composition and petite mutation on the longevity of a polyploid brewing yeast strain. **Letters in Applied Microbiology**, 2000, v. 31, p. 46-51

PUT, D. **The life of yeast cell**. 2012. Disponível em: <<http://morebeer.com/articles/lifeofayeast>>. Acesso em: 07 maio 2014.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; et al. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 1988, v. 239, p. 487- 491.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter *hcrA*. **Journal of Bacteriology**, 2001, v. 183, p. 5371-5375.

SALAMON, D. Sociobiology of the budding yeast. **Journal of Biosciences**, 2014, n. 39, p. 225–236.

SAMI, A.; IKEDA, M.; YABUUCHI, A. S. Evaluation of the Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination. **Journal of fermentation and bioengineering**, 1994, v. 78, p. 212-216.

SANTOS, S. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. 2 ed. Cotia, SP: Ateliê Editorial, 2004.

SCHARDONG, L. M. **Análise das barreiras de entrada e recursos chave para microcervejarias no Rio Grande do Sul**. Trabalho de conclusão de curso. Departamento de Ciências Administrativas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SCHLENK, F. Early research on fermentation – a story of missed opportunities. **Trends Biochem Sciences**, 1985, v. 10, p. 252-254.

SEGURANÇA ALIMENTAR, Food Ingredients Brasil. 2008. Disponível em: < <http://www.revista-fi.com/materias/54.pdf>> Acesso em 10 julho 2014

SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M.; FINK, G. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. **Nature**, 1986, v. 319, p. 689-93.

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

SIGLER, K. Acidification power (AP) test and similar methods for assessment and prediction of fermentation activity of industrial microorganisms. **Kvasný průmysl**, 2013, v. 59, p. 7-8.

SIGLER, K., PASCUAL, C., ROMAY, C. Intracellular control of proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiology**, 1983, v. 28, 363–370.

SHERMAN, F. An Introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine**, 1998, v. 6, p. 302-325.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods enzymol**, 2002, v. 350, p. 33-41.

VENTURINI, W.; CEREDA, M. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2008. (Biotecnologia Industrial, 4)

VERSTREPEN, K.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; et al. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnolgy**, 2003, v. 61, p. 196-205.

VIDGREN, V.; MULTANEN, J.; ROUHONEN, L.; et al. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. **Yeast Research**, 2010, v. 10, p. 402–411.

WHITE, C.; ZAINSCHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010.

WHITE, C. **7 Fascinating Facts About Yeast**. Disponível em: <<http://byo.com/stories/issue/item/62-7-fascinating-facts-about-yeast>>. Acesso em: 16 maio 2014.

ZHANG, Y.; ZHANG, S.; LIU, Z.; et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. **Letters in Applied Microbiology**, 2010, v. 51, p. 114-118.

ZINDULIS, J. **An insider's view into the use of PCR in the food industry**. 2002. Disponível em: <<http://www.foodsafety magazine.com/magazine-archive1/december-2001january-2002/an-insidere28099s-view-into-the-use-of-pcr-in-the-food-industry/>>. Acesso em: 02 jun. 2014.