

Desenvolvimento de uma metodologia de isolamento, cultivo e caracterização de leveduras cervejeiras não convencionais para aplicação industrial

Clarice Carvalho da Silva

2020

Desenvolvimento de uma metodologia de isolamento, cultivo e caracterização de leveduras cervejeiras não convencionais para aplicação industrial

Clarice Carvalho da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Maria Manuel Gil de Figueiredo Leitão da Silva

2020

Desenvolvimento de uma metodologia de isolamento, cultivo e caracterização de leveduras cervejeiras não convencionais para aplicação industrial

Copyright © Clarice Carvalho da Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria

2020

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor.

Resumo

No processo de fabrico de cerveja, quer artesanal, quer industrial, a fermentação é levada a cabo por uma variedade limitada de estirpes de levedura, quase sempre do género *Saccharomyces*, que limita a diversidade da oferta. Uma das apostas do mercado atual para atender às necessidades do consumidor, que procura novos e distintos sabores, é a descoberta de novas leveduras que possam contribuir para uma cerveja inovadora. O objetivo principal deste trabalho foi validar uma metodologia de isolamento, cultivo e caracterização do perfil volátil de leveduras não convencionais e propor um método de desenvolvimento de estirpes inovadoras para o mercado de produção de cerveja.

Foram recolhidas 10 amostras de material com possível presença de leveduras, de tecido vegetal e de superfícies de uma fábrica artesanal de cerveja, que após passarem por crescimento em meio de cultura seletivo, foram isoladas e selecionadas através de testes de microfermentação em tubos de Falcon, estéreis a 25 °C por 7 dias. As leveduras consideradas aptas para produção de cerveja foram inoculadas em mosto cervejeiro, com monitorização dos parâmetros fermentativos (densidade ótica e grau Brix). Posteriormente, foi analisado o perfil volátil das cervejas produzidas, por métodos químicos (análise de cromatografia gasosa por HS/SPME GC-FID) e por método sensorial de ranking de comparação pareada. As etapas de recolha, isolamento e seleção de leveduras não convencionais foi bem-sucedida, resultando em 5 estirpes capazes de fermentar mosto de cerveja.

Considerando as leveduras selecionadas, a estirpe WL_411, recolhida da superfície de fabrico apresentou características fermentativas comparáveis às comerciais, produzindo uma cerveja com teor alcoólico de 3,49% (v/v) e um perfil aromático com tendências positivas. Desta mesma superfície de recolha, o isolado WL_312 também apresentou perfil positivo, ainda que com uma tendência a produzir um perfil menos concentrado que as estirpes comerciais. Os resultados obtidos na análise sensorial, mostram que a estirpe selvagem isolada de tecido vegetal de rosas produziu uma cerveja com concentração de acetato de isoamilol mais intensas que as demais. Não foi observada uma correlação entre os dois métodos de análise.

As metodologias testadas formam uma rota interessante para a descoberta de novas estirpes de leveduras. É importante a otimização do processo para gerar uma metodologia

mais refinada. As etapas de controlo dos parâmetros fermentativos e as análises de compostos voláteis podem ser separadas em duas vertentes diferentes para estudos futuros.

Palavras-chave: leveduras não convencionais, cerveja, cromatografia gasosa, análise sensorial.

Abstract

The beer production, a well-defined process reproduced in similar ways, whether in industries or in small breweries, is done by using a limited variety of yeast strains, almost always of the genus *Saccharomyces*. One of the bets of the current market to meet consumer demands is the discovery of new yeasts that can contribute to an innovative type of beer. This study had as main objective to test a methodology of isolation, cultivation and characterization of the volatile profile of non-conventional yeasts with the intention of proposing a method for the development of innovative strains for the beer production market.

Thus, 10 samples of material with possible presence of yeast, from plant tissue and factory surfaces, were collected and, after undergoing growth in selective culture medium, were isolated and selected through microfermentation tests in sterile Falcon tubes, at 25 °C for 7 days. Yeasts considered suitable for beer production were inoculated in beer must, with monitoring of fermentative parameters (optical density and Brix degree). Subsequently, the volatile profile of the beers produced was analyzed by chemical methods (gas chromatography analysis by HS / SPME GC-FID) and by the sensory method of paired comparison ranking. The unconventional yeast collection, isolation and selection steps were successful, resulting in 5 strains capable of fermenting beer wort.

Considering the selected yeasts, strain WL_411, collected from the manufacturing surface, presented fermentative characteristics comparable to commercial ones, producing a beer with an alcohol content of 3.49% (v / v) and an aromatic profile with positive trends. From this same collection surface, the isolate WL_312 also showed a positive profile, although with a tendency to produce a less concentrated profile than commercial strains. The results obtained in the sensory analysis show that the wild strain isolated from plant tissue of roses produced a beer with more intense isoamyl acetate concentration than the others. No correlation was observed between the two methods of analysis.

The tested methodologies form an interesting route for the discovery of new yeast strains. It is important to optimize the process to generate a more refined methodology. The steps of controlling fermentative parameters and the analysis of volatile compounds can be separated into two different strands for future studies.

Keywords: non-conventional yeast, beer, gas chromatography, sensory analysis.

Índice

Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
1 Introdução.....	1
1.1 A cerveja	1
1.2 Fabrico industrial	2
1.2.1 Ingredientes	3
1.2.2 Processo de produção	8
1.3 O papel da levedura na produção de cerveja	12
1.3.1 Fermentação alcoólica	13
1.3.2 Metabolitos secundários e as suas características sensoriais.....	15
1.4 Caracterização do perfil volátil da cerveja	19
1.4.1 Cromatografia gasosa	20
1.4.2 Análise sensorial.....	21
1.5 Objetivos.....	22
2 Materiais e métodos	23
2.1 Materiais	24
2.2 Recolhade amostras	24
2.2.1 Leveduras de superfície de fabrico (LSF)	25
2.2.2 Leveduras selvagens	26
2.3 Condições de crescimento de leveduras	27
2.3.1 Meio de cultura.....	27
2.3.2 Seleção de estirpes não convencionais	27
2.3.3 Otimização da concentração de CuSO ₄ no meio MYGP	28
2.4 Cultivo de leveduras	28
2.4.1 Isolamento e triagem de estirpes	29
2.5 Processos fermentativos.....	30
2.5.1 Produção de cerveja.....	30

2.5.2	Parâmetros de controlo da fermentação	31
2.6	Análise de compostos voláteis.....	32
2.6.1	Análise de cromatografia gasosa.....	32
2.6.2	Análise sensorial	35
2.7	Análise exploratória dos dados.....	37
3	Resultados e discussões	39
3.1	Seleção de estirpes não convencionais	39
3.2	Otimização da concentração de CuSO ₄ no meio MYGP	39
3.3	Isolamento	40
3.4	Triagem.....	40
3.5	Controlo da fermentação	43
3.5.1	Densidade ótica	43
3.5.2	Determinação do grau Brix	44
3.6	Caracterização do perfil volátil.....	50
3.6.1	Análise de cromatografia gasosa.....	51
3.6.2	Análise sensorial	57
4	Conclusões e perspetivas futuras	63
5	Bibliografia	65
Anexos.....		73
Anexo 1: Tabelas de calibração do GC-FID		73
Anexo 2: Lista de sugestões de descritores para o acetato de isoamilo		77
Anexo 3: Fichas de resposta da análise sensorial		78

Índice de figuras

Figura 1.1 - Estrutura do grão de cevada (Stewart, 2016).....	5
Figura 1.2 - Estrutura química dos α -ácidos do lúpulo e dos produtos da isomerização induzida pelo aumento de temperatura durante a fervura do mosto (Almaguer et al., 2014).	6
Figura 1.3 - Estruturas químicas dos β -ácidos do lúpulo	7
Figura 1.4 - Esquema simplificado das etapas básicas de produção de cerveja.....	9
Figura 1.5 - Perfil de temperatura de um programa de brassagem típico (Stewart, 2016)..	10
Figura 1.6 - Funções centrais do piruvato e acetil-CoA nas rotas de formação dos metabolitos primários e secundários da cerveja a partir dos açúcares presentes no mosto (Boulton & Quain, 2001).....	13
Figura 1.7 - (a) Resumo das reações de glicólise e fermentação realizadas por leveduras; (b) Reações enzimáticas que ocorrem durante a fermentação de leveduras (Walker & Walker, 2018).....	14
Figura 1.8 - Roda dos sabores da cerveja (Meilgaard et al., 1979).	20
Figura 2.1 – Esquema simplificado da metodologia experimental adotada neste estudo. ..	23
Figura 2.2 - (a) Rosas usadas como fonte de leveduras selvagens; (b) Mosto estéril inoculado com as rosas; (c) Mosto após 8 semanas com sinais de formação de biomassa e fermentação.	27
Figura 2.4 - Balões de fundo plano com mosto inoculado por estirpes de LSF.....	31
Figura 2.5 – Esquema de combinações de amostras servidas a cada participante do painel sensorial.....	36
Figura 3.1 - Inoculação por espalhamento de leveduras em diluição 10-4: (a) Levedura selvagem em MYGP agar; (b) Levedura selvagem em MYGP agar + CuSO ₄ a 400 ppm; Levedura comercial lager em MYGP agar; (d) Levedura comercial lager em MYGP agar + CuSO ₄ a 400 ppm.	40
Figura 3.2 – Sequência de triagem das leveduras consideradas aptas na primeira etapa de microfermentação. Os círculos com um X abaixo representam as leveduras que não foram consideradas aptas para produzir cerveja.	43
Figura 3.3 – Variação da concentração média de sólidos solúveis no mosto medida através do índice de refração em °Brix ao longo do tempo de fermentação	44

Figura 3.4 – Gráficos da variação da concentração de etanol (g/l) ao longo do tempo de fermentação (h) com curvas ajustadas pelo modelo cinético de primeira ordem proposto por Tschoeke et. al. (2017).....	48
Figura 3.5 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos resultados de concentrações de metabolitos voláteis obtidos para cada cerveja.	55
Figura 3.6 - Escala comparativa de intensidade construída a partir da pontuação sensorial de concentração de acetato de isoamilo nas cervejas fermentadas pelas leveduras não convencionais WL_312, WL_411 e W_Rosas e nos controlos Ctrl_0 (Lager) e Ctrl_1 (Lager com adição de 3 mg/l de acetato de isoamilo).....	59

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Análise da água em locais associados a excelência em produção de cerveja (mg/L) (Boulton, 2013).	4
Tabela 1.2 - Espécies de leveduras não <i>Saccharomyces</i> e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Adaptado de Walker & Walker (2018).	15
Tabela 1.3 - Principais ésteres de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Verstrepen et al., 2003).	17
Tabela 1.4 - Principais álcoois superiores de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Pires, Teixeira, Brányik, & Vicente, 2014)	18
Tabela 1.5 - Principais compostos fenólicos de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Burdock, 2010; Vanbeneden et al., 2008).	19
Tabela 1.6 – Exemplos de especificações sensoriais de uma cerveja Pale Lager (Simpson, 2016).	22
Tabela 2.1 - Superfícies de recolha de amostras para cultivo e seleção de leveduras não convencionais.	25
Tabela 2.2 – Concentrações dos padrões dos voláteis utilizadas para calibração das respostas em GC-FID.	33
Tabela 3.1 – Estirpes isoladas com base em suas características morfológicas e resultados do primeiro teste de microfermentação	41
Tabela 3.2 – Valores de densidades específicas inicial (OG) e final (FG) e concentrações finais de etanol em % v/v (ABV) e g/l (Et) calculados a partir das médias dos valores de índice de refração medidos em °Brix para cada estirpe de levedura.	46
Tabela 3.3 – Constantes parametrizadas pelo modelo cinético de primeira ordem proposto por Tschoeke et al. (2017) para as fermentações realizadas com cada estirpe de levedura.	49
Tabela 3.4 – Tempo de retenção (RT) e fator de resposta de cada metabolito volátil obtidos na etapa de calibração do GC.	51
Tabela 3.5 – Valores médios de concentração final em mg/l para os metabolitos voláteis obtidos por método de GC-FID nas fermentações das leveduras estudadas \pm desvio padrão. N = 3.	53
Tabela 3.6 – Superfícies de recolhas das estirpes LSF selecionadas para fermentação de mosto cervejeiro.	56

Tabela 3.7 – Pontuação resultante da metodologia de ranking de concentração acetato de isoamilo pelo painel sensorial, concentrações do acetato de isoamilo de acordo com a cromatografia gasosa e teor de sólidos solúveis final em °Brix.	58
--	----

1 Introdução

1.1 A cerveja

A origem da descoberta do processo de fermentação alcoólica não é bem definida pelos historiadores. Registos arqueológicos mostram indícios de que a produção de cerveja existe como uma atividade organizada há pelo menos 5000 anos, o que torna a sua produção uma das tecnologias mais antigas do mundo (Boulton & Quain, 2001). As primeiras evidências da existência de bebidas fermentadas originam da China. Análises químicas de compostos orgânicos retidos em jarros de cerâmica do período Neolítico revelaram que bebidas fermentadas de arroz, mel e frutas já eram produzidas no milénio de 7000 a.C., mas acredita-se que as bebidas fermentadas a partir de grãos, mais próximas da cerveja que conhecemos atualmente, começaram a ser produzidas na Mesopotâmia e no Egito, primeiras regiões onde o cultivo de grãos prosperou. Os egípcios ensinaram sobre o fabrico de cerveja para os gregos e romanos, que repassaram o conhecimento pela Europa. O continente europeu, por sua vez, foi onde surgiu o processo de produção da cerveja moderna, feita a partir de malte e lúpulo, e onde pela primeira vez a cerveja passou a ser armazenada em barris. Em 1516 foi assinada a Lei da Pureza da Baviera (*Reinheitsgebot*), que proibia o uso de qualquer ingrediente no fabrico da cerveja além de malte de cevada, lúpulo e água (ainda não se tinha conhecimento sobre o fermento). Ela estabeleceu padrões fundamentais para o fabrico da cerveja numa época em que as rápidas mudanças na tecnologia e nas variedades de cerveja dificultava o controlo por parte das autoridades e dos consumidores. Além de definir o produto ao qual o termo “cerveja” se referia, essa lei também definiu preços e estabeleceu medidas administrativas para assegurar uma oferta suficiente e uma qualidade satisfatória (Boulton & Quain, 2001; F. G. Meussdoerffer, 2009; Nelson, 2005).

Apenas durante o século XIX foi descoberto que a levedura converte o açúcar em etanol e dióxido de carbono, processo conhecido como fermentação. Os povos mais antigos não possuíam o devido conhecimento sobre esse produto, apesar de haver evidências de que era sabido que a fermentação tinha que ocorrer para que fosse produzida uma bebida minimamente inebriante (Nelson, 2005).

Hoje a cerveja já está estabelecida como uma das mais populares bebidas do mundo, movimentando um mercado de centenas de bilhões de euros. A produção de cervejas

artesanais apresentou um crescimento expressivo na última década como consequência das alterações no consumo. Os apreciadores de cerveja buscam experiências diferentes e têm cada vez mais preferido qualidade a quantidade. As pequenas cervejarias de produção artesanal oferecem cervejas especiais que contemplam esse novo nicho, passando a ocupar mais espaço no mercado (Donadini & Porretta, 2017; Garrett Oliver, 2011; The Brewers of Europe, 2019).

Apesar da crise econômica que atingiu a Europa à quase uma década, ter afetado o volume de cerveja produzida em Portugal Continental, houve um aumento no número de microcervejarias que até então não tinha sido observado. Entre 2012 e 2017 o número de cervejarias de pequeno porte duplicou e é estimado que a União Europeia conte hoje com 10000 cervejarias, sendo 1000 unidades criadas no período de um ano, entre 2016 e 2017. A chegada dessas novas cervejarias impulsionou os investimentos em inovação, criando uma variedade maior de produtos disponíveis para atingir as expectativas do consumidor atual (The Brewers of Europe, 2018, 2019).

As tendências atuais no mercado cervejeiro envolvem a descoberta de novos sabores que podem ser incorporados à cerveja. E, ainda que o lúpulo seja o ingrediente que mais influencie as características aromáticas, a principal frente de investigação está relacionada com a utilização de espécies e estirpes de leveduras não convencionais no processo. Tanto o desenvolvimento de receitas com uso de novas estirpes de leveduras selvagens, quanto a exploração do potencial genético de espécies comumente associadas a contaminação mostram-se caminhos promissores para a expansão desse mercado (Engelking, 2018; Funk, 2019).

1.2 Fabrico industrial

Atualmente, as restrições impostas pela Lei da Pureza da Baviera à terminologia cervejeira é menos respeitada, tendo-se esta tornada aplicável a uma grande quantidade de bebidas de aparência e sabor muito diferentes e produzidas a partir de uma variedade de matérias-primas. Na maioria dos casos a cevada maltada fornece a principal fonte de açúcares fermentáveis, mas muitas outras fontes de substrato podem ser usadas. As cervejas também podem ou não conter lúpulo ou outras substâncias amargas e pode ser adicionada

toda uma gama de outros aromas, incluindo frutas, especiarias e vários extratos de plantas. Em alguns casos, as cervejas podem nem conter álcool (Bamforth, 2000; Boulton & Quain, 2001).

No âmbito da produção industrial, entretanto, é observado que, apesar de existirem diversas receitas diferentes, o conceito apresentado pela Lei da Pureza da Baviera em 1516 ainda serve de parâmetro para a definição dos ingredientes básicos da cerveja. Ou seja, a produção de uma bebida padrão é feita a partir de água, malte de cevada, lúpulo e levedura (Kunze, 2004).

1.2.1 Ingredientes

1.2.1.1 Água

Quantitativamente, a água é a matéria prima mais utilizada na produção de cerveja. A grande maioria das cervejas produzidas possui mais de 90% do seu volume em água. A qualidade desta água, em específico a sua concentração em sais minerais, é determinante para o resultado final, não só pela influência direta na textura e no sabor, mas também na influencia bioquímica do processo de produção (Jackson, 2009).

Os sais presentes na água estão fortemente diluídos e apresentam-se como iões dissociados. Enquanto a maioria dos iões não reage com os compostos solúveis do malte, outros são quimicamente reativos e resultam na alteração do pH do mosto. Um dos processos diretamente influenciados pelas mudanças de pH é a brassagem do mosto. Esse processo é dependente da presença de enzimas e estas possuem condições ótimas para atuação, podendo ter a sua atividade reduzida em certas faixas de pH (Kunze, 2004).

Algumas análises típicas de águas originárias de locais com excelência em produção de cerveja são mostradas na Tabela 1.1 e é possível perceber que a composição da água é variável. Essas diferenças surgem de acordo com a geologia específica de cada local (Boulton, 2013).

Tabela 1.1 - Análise da água em locais associados a excelência em produção de cerveja (mg/L) (Boulton, 2013).

Analito	Burton	Dortmund	Pilsen	MunIQUE	Londres
Cálcio	250 a 350	200 a 250	5 a 10	80 a 100	80 a 100
Magnésio	20 a 35	20 a 30	3 a 4	18 a 22	4 a 6
Bicarbonato	300-350	150 a 200	12 a 15	150 a 180	100 a 120
Carbonato	130 a 150	-	-	-	12 a 130
Cloreto	20 a 40	50 a 60	4 a 8	30 a 40	15 a 20
Nitrato	15 a 25	40 a 50	Traços	50 a 55	2 a 5

A indústria cervejeira continua a ser importante nos locais mencionados anteriormente e, para estes, a composição da água ainda é um fator determinante para os estilos de cervejas produzidos. No entanto, o crescimento das empresas internacionais e a necessidade de produzir diferentes estilos em um mesmo local resultaram na necessidade de manipular a composição iônica da água conforme necessário (Boulton, 2013).

1.2.1.2 Malte de cevada

Cevada (*Hordeum vulgare*), ilustrada na Figura 1.1, é o principal cereal usado para produzir malte, sendo o malte de cevada utilizado em 90% da produção global de cerveja (Parker, 2012). A sua utilização está ligada ao facto desse cereal possuir um elevado teor de amido e da sua casca manter aderência ao grão mesmo depois de processado para produzir malte (Kunze, 2004). Este último fator é importante pois a presença da casca permite a formação de uma camada de filtração bastante conveniente para a etapa de produção do mosto (F. Meussdoerffer & Zarnkow, 2009).

Maltagem é o termo que descreve o processo no qual sementes e grãos são germinados de forma controlada e dentro de condições específicas. No contexto da produção de cerveja, o malte é a fonte de açúcares fermentáveis e de nutrientes que possibilitam o

crescimento das leveduras durante a fase de fermentação da cerveja (Boulton, 2013). Um dos principais objetivos da maltagem é o desenvolvimento de enzimas no grão com degradação simultânea de substâncias de alto peso molecular na parede celular (Eßlinger & Narziß, 2010). O processo é necessário porque o amido presente no grão fica retido em estruturas celulares no endosperma, que apresentam parede celular formada por proteína, pentosano e glucano. As enzimas naturalmente presentes no grão irão degradar o material da matriz que retém o amido para libertá-lo e convertê-lo em açúcar fermentável (Parker, 2012).

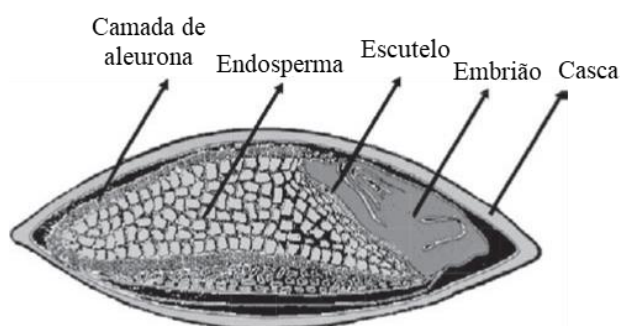


Figura 1.1 - Estrutura do grão de cevada (Stewart, 2016).

A produção de malte passa por três etapas: molha, germinação e secagem. Na primeira, o grão de cevada é humedecido para que esteja pronto para germinar. É nesse momento que as enzimas necessárias são sintetizadas. Por fim, a germinação é interrompida através da secagem com aplicação de calor. A intensidade dessa etapa irá determinar o nível de torra do grão e pode gerar uma variedade enorme de tipos de malte, com diferentes cores e aromas associados (Boulton, 2013).

1.2.1.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta perenial classificada como membro da família *Cannabaceae* (que também inclui o gênero *Cannabis*) produzida, na sua maioria, no hemisfério norte. As plantas masculina e feminina são distintas e, no que diz respeito a produção de cerveja, o termo lúpulo é designado apenas para a inflorescência da planta

feminina, única parte utilizada no processo. Após a colheita, o lúpulo é seco e processado para garantir que o seu valor não se perde (Kunze, 2004; Parker, 2012).

Em comparação com o malte, o lúpulo é usado em quantidades minoritárias, porém com grande impacto na qualidade do produto final. O interesse pelo lúpulo por parte da indústria cervejeira dá-se pelo facto da planta sintetizar resinas e óleos essenciais que conferem à cerveja as suas características típicas de amargor e aroma, respetivamente (Almaguer, Schönberger, Gastl, Arendt, & Becker, 2014).

Entre as resinas que constituem o sabor amargo do lúpulo, destacam-se os α -ácidos por apresentarem alto potencial de amargor. A solubilidade dos α -ácidos é dependente do pH do meio e no mosto essas substâncias não se dissolvem de forma eficiente. Portanto, elas são submetidas ao processo de fervura junto ao mosto, no qual sofrem isomerização (Figura 1.2). Os produtos da isomerização apresentam solubilidade consideravelmente maior que os α -ácidos originais e são altamente estáveis no pH da cerveja (Eßlinger & Narziß, 2010).

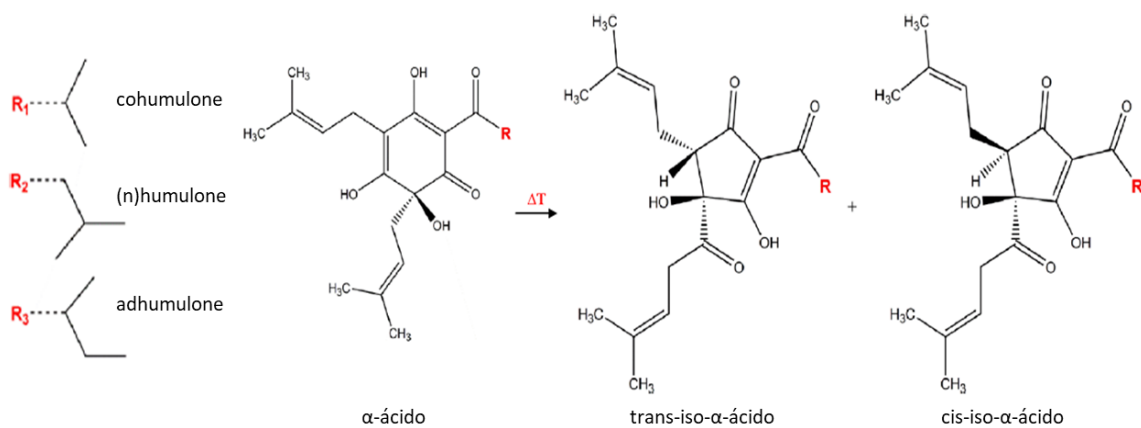


Figura 1.2 - Estrutura química dos α -ácidos do lúpulo e dos produtos da isomerização induzida pelo aumento de temperatura durante a fervura do mosto (Almaguer et al., 2014).

Outro grupo de compostos precursores de amargor classificados como resinas são os β -ácidos (Figura 1.3). Estes também apresentam baixa solubilidade no meio, mas, diferente da porção α , não sofrem o processo de isomerização. O resultado é uma menor contribuição para o sabor amargo da cerveja (Almaguer et al., 2014).

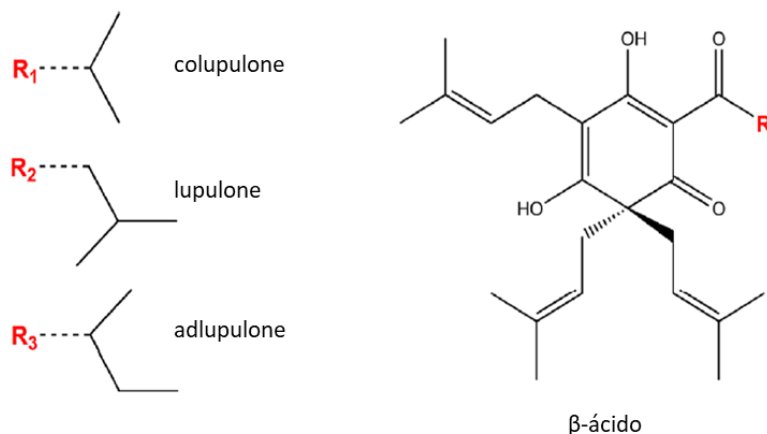


Figura 1.3 - Estruturas químicas dos β -ácidos do lúpulo

Os ácidos amargos do lúpulo também contribuem para a estabilidade microbiana da cerveja, o que ajuda na proteção contra contaminações, e para a formação adequada de espuma (Almaguer et al., 2014).

Dependendo das características de sabor e aroma desejadas para o produto final, a adição do lúpulo pode ocorrer em diferentes momentos do processo. Os lúpulos usados com finalidade de conferir amargor são adicionados no início da fervura do mosto para que os α -ácidos sejam isomerizados, enquanto lúpulos usados para aroma adentram o processo nos momentos finais da fervura para garantir que os óleos essenciais, que possuem maior volatilidade, fiquem retidos. Existe também o conceito de *dry hopping*, no qual lúpulos mais aromáticos não são submetidos a fervura e são adicionados após a fermentação (Boulton, 2013).

1.2.1.4 Levedura

Levedura é o nome dado aos microrganismos do reino *Fungi* cujo crescimento vegetativo é predominantemente resultante de brotamento ou fissão. É um dos principais grupos de microrganismos explorados na produção de alimentos e bebidas fermentados. As leveduras mais comumente usadas nas fermentações alimentares pertencem ao gênero *Saccharomyces*, que realizam uma fermentação do tipo alcoólica (Tofalo & Suzzi, 2016).

No caso da cerveja, são duas as espécies de levedura *Saccharomyces* utilizadas comercialmente: *S. cerevisiae* (levedura *ale*) e *S. pastorianus* (levedura *lager*). A primeira trabalha em temperaturas mais altas, com fermentações ótimas entre 18 e 22°C. Essa espécie normalmente apresenta alta floculação, o que leva à aglomeração das leveduras na superfície do líquido ao fim da etapa fermentativa, dando origem ao conceito de “fermentação de topo”. A floculação é uma característica resultante da expressão do genótipo de cada estirpe de levedura e pode ser uma resposta ao *stress* induzido pelas condições do meio ao fim da fermentação, mais especificamente pela escassez de nutrientes. No caso da *S. cerevisiae*, a associação com o gás carbônico faz com que os flocos emerjam à superfície. A espécie *S. pastorianus*, antes conhecida como *S. carlsbergensis*, apresenta atividade ótima em temperaturas mais baixas, entre 7 e 15°C. Essas leveduras são caracterizadas pela fermentação de fundo, uma vez que não apresentam o efeito de sustentação pelo CO₂ e sedimentam ao fim do processo (Boulton, 2013; Livens, 2016).

Durante a fermentação, a atividade metabólica da levedura gera compostos que se mantêm na cerveja e contribuem para a formação de seu sabor e aroma (Boulton, 2013). O tipo de levedura usada no processo fermentativo tem grande influência nas características finais que a bebida irá apresentar. Algumas cervejas são produzidas com uma única estirpe de levedura, enquanto outras são feitas a partir de uma mistura de estirpes diferentes. As leveduras usadas em cada cervejaria são diferentes umas das outras e contribuem para um produto final com características únicas (Parker, 2012).

1.2.2 Processo de produção

O processo tradicional de obtenção da cerveja consiste em três fases principais: produção do mosto, fermentação e processamento pós-fermentativo (Figura 1.4). Cada uma dessas fases subdivide-se em diversas outras etapas que irão variar de acordo com as características pretendidas para a cerveja e das matérias primas utilizadas. É possível, entretanto, definir etapas comuns aos mais variados processos (Boulton & Quain, 2001).

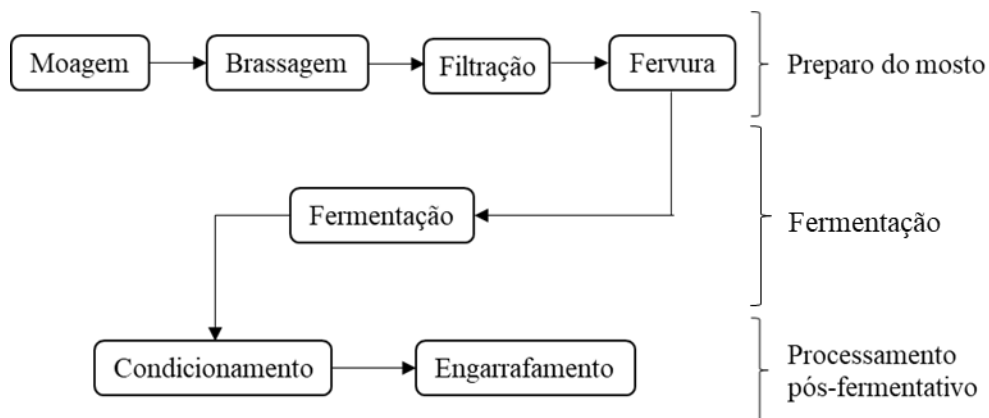


Figura 1.4 - Esquema simplificado das etapas básicas de produção de cerveja.

O primeiro estágio de produção em uma cervejaria é o preparo do mosto, que se inicia com a moagem do malte. Essa etapa tem como objetivo reduzir as partículas a um tamanho ótimo e liberar o conteúdo do endosperma do malte de dentro de sua casca (Eßlinger & Narziß, 2010).

O malte moído é suspenso em água e aquecido na etapa chamada brassagem. É uma importante etapa na qual as substâncias contidas no malte entram em solução e, com a ação das enzimas, é obtido o extrato de açúcares fermentáveis. A principal propriedade das enzimas é sua capacidade de degradar ligações químicas e seus substratos. Os componentes mais relevantes a serem hidrolisados na produção de cerveja são o amido, β -glucanos e proteínas. (Kunze, 2004).

Para realizar os complexos procedimentos de hidrólise dos componentes do mosto, este é submetido a uma sequência de aquecimentos a diferentes temperaturas e tempos de exposição para que sejam atingidas as condições catalíticas ótimas de cada enzima, de acordo com o tipo de cerveja que se deseja conseguir como produto final (Stewart, 2016).

Em um programa de brassagem típico, como o demonstrado na Figura 1.5, o processo se inicia em uma temperatura na qual as enzimas protease e glucanase são estimuladas. Após o tempo de ação dessas enzimas, a temperatura é gradualmente aumentada até que as α e β -amilases sejam ativadas e promovam a sacarificação do amido. Com o calor aplicado, também ocorre a degradação da estrutura cristalina do amido, o que resulta na sua gelatinização. Isso permite que o carboidrato esteja suscetível à ação das amilases. Ao fim

da sacarificação, a temperatura é elevada mais uma vez para que haja a desnaturação das enzimas ativadas no processo (Boulton & Quain, 2001; Stewart, 2016).

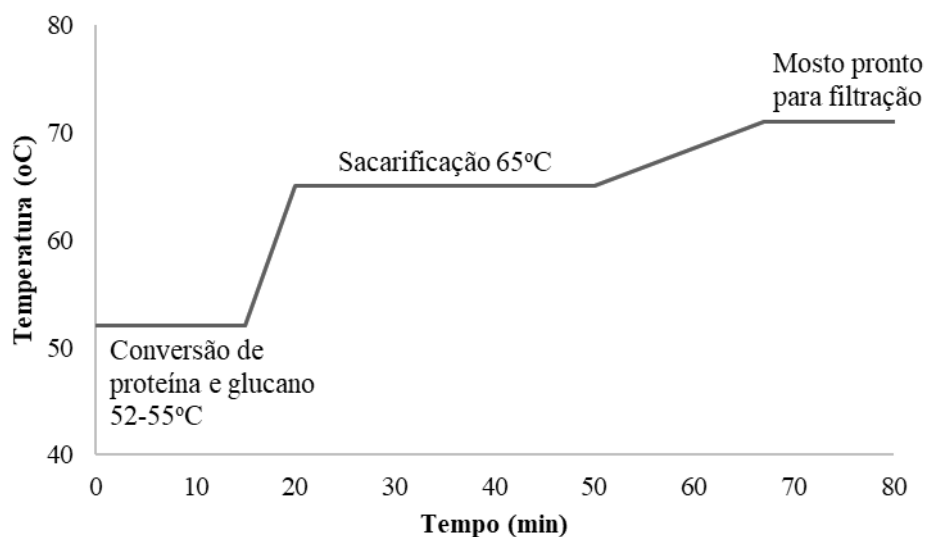


Figura 1.5 - Perfil de temperatura de um programa de brassagem típico (Stewart, 2016).

Os parâmetros específicos da brassagem, como perfil de temperatura, tempos de extração, tipo de malte e intensidade de torra, variam de acordo com o tipo de cerveja que se deseja obter no final do processo. A composição do mosto doce resultante da brassagem é complexa e depende desses parâmetros, mas de maneira geral cerca de 90% dos sólidos totais corresponde à fração de carboidratos. Os mais abundantes são a maltose e sacarídeos como maltotriose e maltotetose. Também são encontrados açúcares fermentáveis mais simples, incluindo glucose, frutose e sacarose, assim como compostos não fermentáveis de cadeias mais longas como dextrinas, glucanos e pentosanos (Boulton, 2013).

A próxima etapa consiste na separação dos sólidos do líquido. No fabrico artesanal, o mosto é mantido em repouso no tanque de brassagem para que o bagaço resultante dos grãos se assente e crie uma torta de filtração. A primeira drenagem de mosto através da torta é o que se chama de mosto primário. O bagaço, entretanto, ainda possui uma quantidade razoável de extrato que deve ser recuperado. Portanto os grãos são lavados com água quente, gerando um mosto secundário mais diluído (Kunze, 2004). No processo industrial é comum que a separação sólido-líquido seja feita com o uso de filtros prensa, que não dependem da

formação da torta de filtração e apresentam maior rendimento (Krottenthaler, Back, Zarnkow, & Esslinger, 2009).

O estágio seguinte consiste na fervura do mosto, no qual diferentes reações químicas ocorrem como a extração e isomerização de compostos do lúpulo. De acordo com o tipo de lúpulo usado, a sua adição pode ocorrer no início da ebulição, para conferir amargor, ou mais no final da etapa, para adição de aroma. Outros diversos processos acontecem durante a fervura e alguns exemplos são: desenvolvimento da coloração da cerveja (reação de Maillard), inativação das enzimas do malte e esterilização do mosto. O mosto clarificado passa por arrefecimento e é enviado para a etapa de fermentação (Boulton & Quain, 2001; Krottenthaler, Back, & Zarnkow, 2009).

Para que o mosto se transforme em cerveja é preciso que os açúcares nele presentes sejam fermentados a etanol e dióxido de carbono. Esse processo também resulta na formação de subprodutos que terão um efeito considerável no sabor, aroma e outras propriedades características da cerveja (Kunze, 2004). Com exceção do tempo e da temperatura, o perfil da fermentação é o mesmo tanto para *ales* quanto para *lagers* e pode ser descrito por três fases: fase de latência, fase de fermentação e fase estacionária. Após a inoculação é observada a fase de latência, na qual as leveduras passam por um período de aclimação e aparentam não possuir atividade, apesar de estarem metabolicamente ativas. No período seguinte é produzida nova biomassa, já que a presença de glucose no meio garante energia suficiente para o crescimento celular e reprodução. Após o estoque de glucose se esgotar, as células alteram para a via metabólica fermentativa na qual o restante dos açúcares fermentáveis serão utilizados para produção de etanol e CO₂. Por fim, o processo fermentativo se encerra com a redução da concentração de nutrientes do mosto. Assim, as leveduras iniciam um período de senescência e começam a flocular, o que indica que a fermentação chegou ao fim (Livens, 2016).

O processo pós fermentativo se inicia com uma fase de condicionamento ou maturação. Na presença de leveduras viáveis se inicia uma fermentação secundária, na qual são consumidos os açúcares residuais ou os açúcares adicionados na etapa chamada de *priming*, formando etanol e CO₂. Com o tanque de maturação selado, o gás carbônico sob pressão satura o meio e promove a carbonatação natural da cerveja (Boulton, 2013; Eßlinger, 2009).

Por fim, a cerveja pode ser submetida a um processo de filtração para obtenção de um produto final mais claro e brilhante. Antes de ser engarrafada, a bebida filtrada é mantida em tanques refrigerados para ajustes finais, sendo o mais importante deles o ajuste de carbonatação. A cerveja dos tanques pode, então, ser enviada para o engarrafamento, onde será colocada em barris, garrafas ou latas. As duas últimas podem ainda passar por processos de pasteurização (Boulton & Quain, 2001).

1.3 O papel da levedura na produção de cerveja

As leveduras cervejeiras são microrganismos heterotróficos e anaeróbicos facultativos. Sendo assim, de acordo com a disponibilidade de oxigênio e hidratos de carbono, o metabolismo pode ser totalmente aeróbico e oxidativo ou fermentativo (Briggs, Boulton, & Brookes, 2004).

A bioquímica de um processo fermentativo é complexa e envolve diversas fases do metabolismo celular. Considerando que existem centenas de compostos já detetados na cerveja, não é possível atribuir um simples mecanismo que explique tal composição. Porém, deve-se notar que o piruvato e a acetil-CoA atuam como pontos centrais na formação de metabolitos primários e secundários (Figura 1.6). O controle da fermentação deve ser feito com o objetivo de regular as condições nas quais os subprodutos do crescimento biológico serão produzidos, quer em termos de quantidade desejadas, quer no espaço de tempo. Deste modo, a escolha de uma estirpe de levedura para produção de cerveja ocorre com base no seu potencial para gerar um produto com uma composição dentro dos padrões considerados adequados para esse tipo de bebida (Boulton & Quain, 2001).

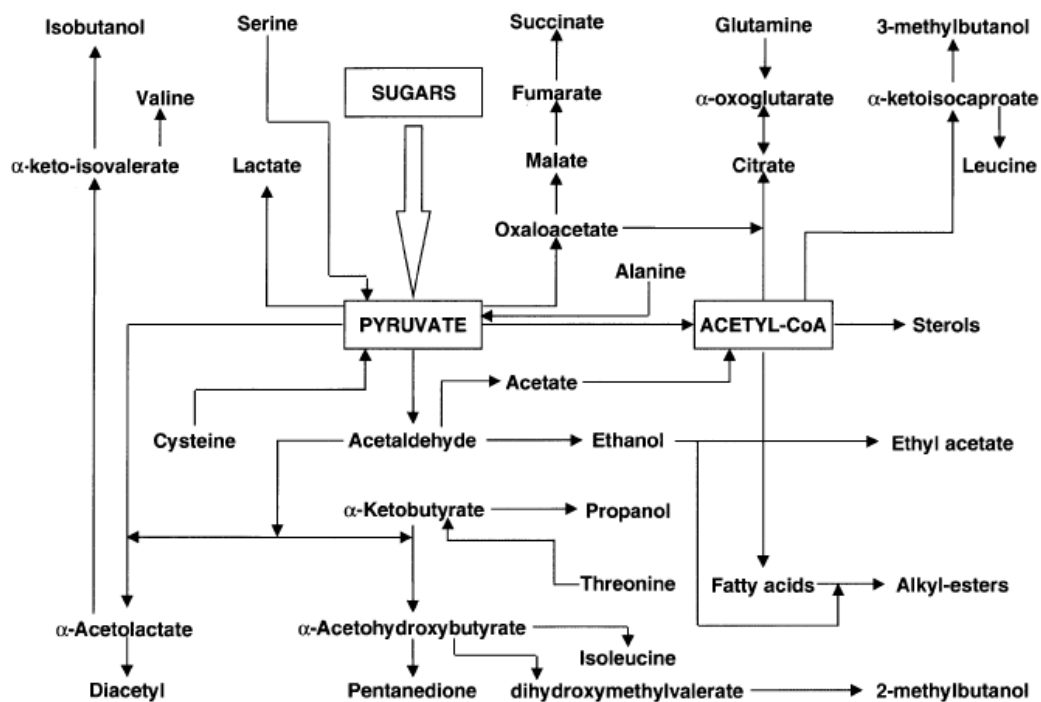


Figura 1.6 - Funções centrais do piruvato e acetil-CoA nas rotas de formação dos metabolitos primários e secundários da cerveja a partir dos açúcares presentes no mosto (Boulton & Quain, 2001).

1.3.1 Fermentação alcoólica

Nas condições encontradas durante a fermentação alcoólica, os produtos principais do catabolismo da glucose são o etanol e o dióxido de carbono (Figura 1.7). O açúcar do mosto é convertido em piruvato e a energia liberada pela reação é usada na formação de ATP e NADH. Ocorre então a descarboxilação do piruvato, que resulta na liberação do dióxido de carbono e formação acetaldeído. Esse, por fim, dá origem ao etanol, regenerando NAD^+ para permitir a continuidade do ciclo (Walker & Walker, 2018).

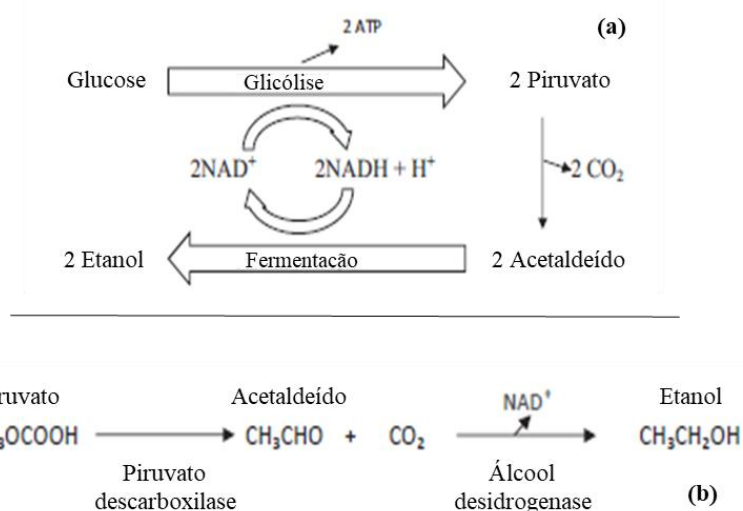


Figura 1.7 - (a) Resumo das reações de glicólise e fermentação realizadas por leveduras; (b) Reações enzimáticas que ocorrem durante a fermentação de leveduras (Walker & Walker, 2018).

Além da reação principal que produz etanol e CO_2 , outras reações menores ocorrem durante a fermentação e resultam no consumo de componentes do mosto e na consequente formação de diversos produtos que irão contribuir para as características de sabor e aroma da cerveja. A variação nas concentrações de tais compostos, mesmo pequena, apresenta impactos significativos no produto final. Logo, cada estirpe não apenas está individualmente associada à produção de um estilo de cerveja em particular, como também é comum que diferentes cervejarias possuam suas estirpes exclusivas para manter características específicas da marca (Boulton, 2013).

Enquanto as espécies de *Saccharomyces* são reconhecidas como os principais microrganismos produtores de álcool, estas não são as únicas leveduras capazes de realizar fermentação alcoólica. Na Tabela 1.2 são apresentados alguns exemplos de espécies não-*Saccharomyces* e as suas aplicações já descobertas. Ainda que sejam capazes de gerar etanol, o uso de leveduras não-convencionais na produção de bebidas alcoólicas tem como principal atrativo a possibilidade de trazer benefícios quanto a elaboração de sabores e aromas diferentes (Walker & Walker, 2018).

Tabela 1.2 - Espécies de leveduras não *Saccharomyces* e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Adaptado de Walker & Walker (2018).

Espécie de levedura	Substrato fermentado	Potencial
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactose (soro de queijo)	Bebidas destiladas, bioetanol
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Frutose (agave)	Tequila, mezcal, bioetanol
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Glucose, maltose (hidrolisados de amido)	Bebidas destiladas, bioetanol
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Glucose, frutose (mosto de uva)	Vinho (contaminação)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Glucose, frutose (mosto de uva)	Vinho
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Glucose, maltose (mosto de malte)	Cerveja
<i>Pichia kluyveri</i>	Glucose, maltose (mosto de malte)	Cerveja, tequila
<i>Toruslaspora delbrueckii</i>	Glucose, maltose (mosto de malte)	Cerveja
<i>Sacchamomycodes lidwigii</i>	Glucose (mosto de malte)	Cerveja de baixo teor alcoólico
<i>Candida zemplinina</i>	Glucose, maltose (mosto de malte)	Cerveja
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Glucose, frutose (mosto de uva)	Vinho
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i>	Glucose, xilose, arabinose (lignocelulose)	Bioetanol
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	manose, fucose, rhamnose de biomassa de algas)	Bioetanol (de macroalgas)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sacarose (melaço)	Rum

1.3.2 Metabolitos secundários e as suas características sensoriais

A cerveja é um produto alimentar que traz em seu sabor e aroma grande parte de sua identidade. Diversos estilos são atribuídos às diferentes características sensoriais apresentadas pelas cervejas produzidas por todo o mundo. As *lagers* alemãs, por exemplo, são tipicamente encorpadas e perfumadas. Já as *lagers* de estilo americano são produzidas de forma a que o resultado seja uma bebida leve e pouco aromática (Tang & Li, 2016). Como apontado no tópico anterior, essas qualidades são resultado da soma de diversos componentes gerados ao longo de todo o processo de produção da bebida. Muitos deles surgem durante a fermentação como intermediários ou subprodutos. Nesta seção serão introduzidos alguns dos grupos de compostos encontrados na cerveja resultantes do

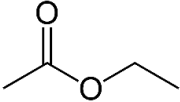
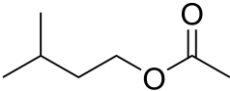
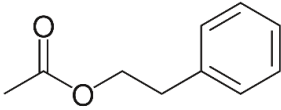
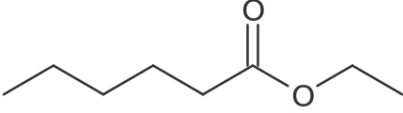
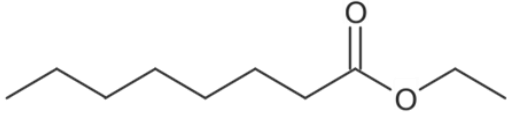
metabolismo da levedura. Os grupos com maior relevância sensorial em cerveja incluem álcoois superiores, ésteres e compostos fenólicos voláteis (Liu, 2015; Pires, Teixeira, Brányik, & Vicente, 2014).

1.3.2.1 Ésteres

Ésteres de cadeia curta e cadeia ramificada são considerados os compostos voláteis de maior importância na cerveja. De maneira geral, os ésteres concedem notas frutadas à bebida e o seu impacto no sabor e aroma é positivo. No entanto, caso sejam formados em quantidades excessiva é possível que ocasionem um aroma a solvente, atributo considerado indesejado (Liu, 2015; Tang & Li, 2016).

Esses compostos são formados no interior da célula da levedura. Por serem lipossolúveis, os ésteres acetatos difundem-se rapidamente pela membrana celular para o meio de fermentação. Já os ésteres etílicos de ácidos gordos apresentam menor eficiência de transferência quanto maior o tamanho da cadeia. A escolha tanto da espécie quanto da estirpe de levedura usada na fermentação irá impactar de forma relevante a produção de ésteres totais e suas devidas proporções (Verstrepen et. al., 2003). Os principais ésteres de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais estão apresentados na Tabela 1.3.


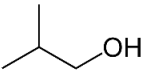
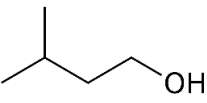

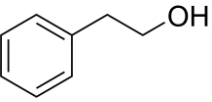
Tabela 1.3 - Principais ésteres de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Verstrepen et al., 2003).

Composto	Estrutura química	Concentração média em cervejas tipo lager (mg/L)	Descritores associados
Acetato de etilo		18,4	Frutado, solvente
Acetato de isoamilo		1,72	Banana, pêra
Acetato feniletílico		0,54	Rosas, mel
Caproato de etilo		0,14	Maçã, anis
Caprilato de etilo		0,17	Maçã

1.3.2.2 Álcoois superiores

Além do etanol, os álcoois superiores são outro tipo de álcool que aparece na composição da cerveja e traz impactos, positivos e negativos, ao seu paladar. Em quantidades moderadas, as características de aroma desses compostos contribuem para a formação de um perfil sensorial harmonioso. Em excesso, porém, podem causar um amargor desagradável. Sua formação está diretamente relacionada à levedura, sendo constatado que, sob as mesmas condições, algumas estirpes do microrganismo são capazes de produzir até cinco vezes mais álcoois superiores que outras (Tang & Li, 2016). Os principais álcoois superiores de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais estão apresentados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Principais álcoois superiores de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Pires, Teixeira, Brányik, & Vicente, 2014)

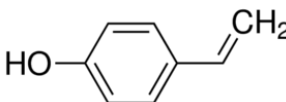
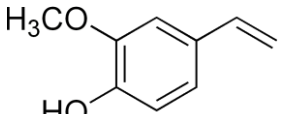
Composto	Estrutura química	Concentração média em cervejas tipo lager (mg/L)	Descritores associados
n-Propanol		10,5	Alcoólico, doce
Isobutanol		30,5	Solvente
Álcool isoamílico		74	Ancoólico, banana
Álcool amílico		20,5	Alcoólico, solvente
2-Feniletanol		53,5	Rosas

1.3.2.3 Compostos fenólicos voláteis

Compostos fenólicos estão presentes na cerveja nas formas monomérica e polimérica. Entre os monômeros fenólicos encontram-se os fenóis voláteis. Diversos compostos fenólicos voláteis de sabor ativo, como guaiacol, acetovanilona, 4-vinilseringol, 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol, são detetáveis na cerveja. Na sua maioria, esses fenóis são provenientes de matérias primas como o malte e já surgem na composição do mosto não fermentado. Apenas o 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol são sintetizados durante a atividade da levedura. A presença desses compostos é tipicamente classificada como indesejada quando presentes em quantidades excessivas. Mas apesar de terem sido estabelecidos como um sabor ruim, em alguns tipos específicos de cerveja de trigo e cervejas com sabor fumado sua presença é essencial para a formação dos sabores característicos de cada estilo (Vanbeneden, Gils, Delvaux, & Delvaux, 2008). Os principais compostos fenólicos de aroma ativo

presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais estão apresentados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Principais compostos fenólicos de aroma ativo presentes na cerveja e suas características químicas e sensoriais (Burdock, 2010; Vanbeneden et al., 2008).

Composto	Estrutura química	Concentração média em cervejas tipo lager (mg/L)	Descritores associados
4-Vinilfenol		0,04	Extracto de baunilha
4-Vinilguaiacol		0,14	Medicinal, picante, cravo da índia

1.4 Caracterização do perfil volátil da cerveja

A percepção organolética da cerveja depende na sua maior parte das substâncias produzidas pela levedura durante o processo de fermentação. Entender a sua composição química, em especial dos seus compostos voláteis, é de extrema importância tanto para manter o controle de qualidade do produto como para auxiliar a escolha de matérias primas e o desenvolvimento de novas receitas. A roda dos sabores da cerveja (Figura 1.8), documento criado por Meilgaard, Dalglish, & Clapperton (1979), apresenta os compostos e descritores associados com maior frequência à bebida, sendo 59% dos descritores de aroma e 79% dos descritores de sabor diretamente atribuídos à atividade da levedura. Sendo assim, para que uma estirpe de levedura possa ser introduzida no mercado de produção cervejeira, fica evidente a necessidade de caracterizar seu perfil volátil e descrever sua contribuição sensorial ao produto (Garcia, 2017; Silva, Augusto, & Poppi, 2008).

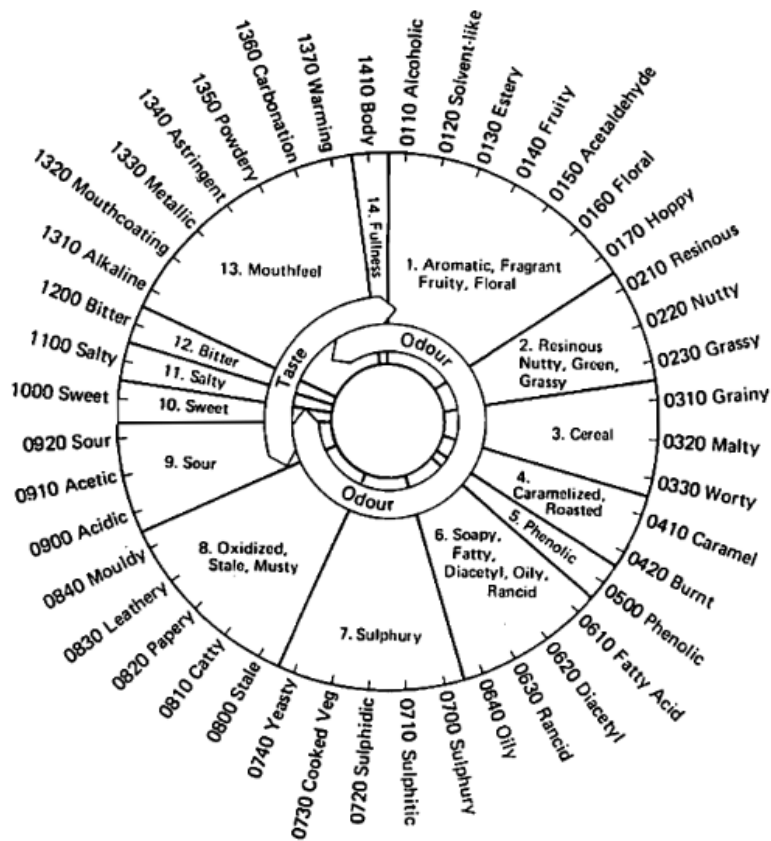


Figura 1.8 - Roda dos sabores da cerveja (Meilgaard et al., 1979).

1.4.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica analítica de separação dos componentes de uma mistura com o propósito de obter informações qualitativas e quantitativas sobre sua composição molecular (Blumberg, 2012). Considerando a natureza das espécies químicas de sabor e aroma ativos e suas concentrações encontradas na cerveja, a cromatografia gasosa é o método convencional utilizado para detecção e identificação de tais compostos. Métodos não-cromatográficos, apesar de já terem sido utilizados para este propósito, não apresentam o nível de sensibilidade e seletividade necessário (Hill & Smith, 2000; Silva et al., 2008).

Solid-phase microextraction (SPME) é uma técnica de adsorção e desorção simples e eficaz usada para concentrar compostos voláteis e não voláteis de amostras em fase líquida. Esse método elimina a necessidade do uso de solventes ou aparelhagens complexas e é compatível com métodos de separação de detecção de analitos, como a

cromatografia gasosa (Alpendurada, 2000). O princípio do SPME consiste em expor uma pequena porção de uma fase extrativa, revestimento associado a uma fibra, à amostra por um tempo determinado. Na amostragem em *headspace* (HS), a fibra é inserida na fase gasosa em equilíbrio com a matriz aquosa e apenas os analitos relativamente voláteis são extraídos (Pawliszyn, 2012).

A metodologia da análise em GC com extração por HS-SPME já foi aplicada com sucesso em diferentes tipos amostras como chá verde, folhas e frutos de árvores, vinho e a própria cerveja (Oliveira et al., 2010; Reto, Figueira, Filipe, & Almeida, 2007; Silva et al., 2008; Šuklje et al., 2018)

1.4.2 Análise sensorial

Muitos dos componentes da fração volátil da cerveja estão diretamente relacionados a parâmetros de qualidade do processo, que podem ser definidos através de metodologias de análise sensorial. Testes sensoriais auxiliam na determinação ou otimização do valor que um produto possui no mercado. As técnicas de análise sensorial são principalmente utilizadas para controle de qualidade, pesquisa e desenvolvimento de produtos (Meilgaard, Civille, & Carr, 1999; Silva et al., 2012). Algumas cervejas possuem perfis aromáticos considerados simples, enquanto outras apresentam perfis mais complexos. Os fatores que determinam esse perfil variam de acordo com o estilo pretendido de cerveja. Em todos os casos, é importante que haja uma especificação mínima das características de cervejas comercializadas, incluindo os sabores positivos esperados em uma fermentação bem-sucedida e suas intensidades (Simpson, 2016). Alguns exemplos de atributos sensoriais específicos de uma cerveja estilo Pale Lager, originados do metabolismo de fermentação da levedura, são vistos na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 – Exemplos de especificações sensoriais de uma cerveja Pale Lager (Simpson, 2016).

Atributo	Composto químico	Intensidade de sabor (0-10)	Impacto da variação de intensidade do atributo nas características do produto
Acetato de isoamilo	Acetato de isoamilo	2.3	Alto
Acetato de etilo	Acetato de etilo	0.8	Médio
Hexanoato de etilo	Hexanoato de etilo	0.5	Baixo
Sulfítico	Dióxido de enxofre	0.5	Baixo
Azedo	Ácidos diversos	1.1	Médio

Dentro do ramo alimentar, a comparação entre resultados de análises instrumentais, como a cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS), e sensoriais tem sido um recurso utilizado em diversos estudos. Dessa forma, é possível correlacionar a intensidade de atributos quantificados por um painel sensorial e a quantidade de compostos voláteis identificados por métodos instrumentais, como foi feito com algumas variedades de morango, pimenta e açúcar de palma (Chitwood, Pangbornt, & Jennings, 1983; Du, Plotto, Baldwin, & Rouseff, 2011; Wan mustapha, Chun Wai, Maskat, & Osman, 2008).

1.5 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi validar uma metodologia desde a recolha, ao isolamento e ao cultivo de leveduras não convencionais, à caracterização do perfil volátil, através de métodos de análise instrumental por cromatografia gasosa e de análise sensorial. É proposta deste trabalho desenvolver uma rota de desenvolvimento de estirpes inovadoras para o mercado de produção de cerveja. Pretende-se também comparar os dois métodos de caracterização de compostos voláteis, quanto à sua capacidade de quantificar os compostos que compõe o perfil aromático das cervejas, quanto à possível correlação entre os dois.

Dentro dos objetivos desse trabalho, o termo “cerveja” será utilizado para o produto da fermentação alcoólica, realizada por levedura, de um meio aquoso que contém açúcares derivados de cereais maltados.

2 Materiais e métodos

O desenvolvimento do projeto englobou três fases experimentais:

i) Recolha de amostras, cultivo e isolamento de leveduras;

ii) Microfermentação (fermentação com volumes iguais ou inferiores a 100 mL) para seleção de estirpes, propagação das estirpes selecionadas e fermentação para produção de cerveja;

iii) Produção de cerveja a escala laboratorial com volumes iguais ou superiores a 1L, caracterização do perfil volátil através de análise de cromatografia gasosa, com uso de GC-FID e HS-SPME, e análise sensorial.

A sequência de experimentos está brevemente ilustrada na Figura 2.1.

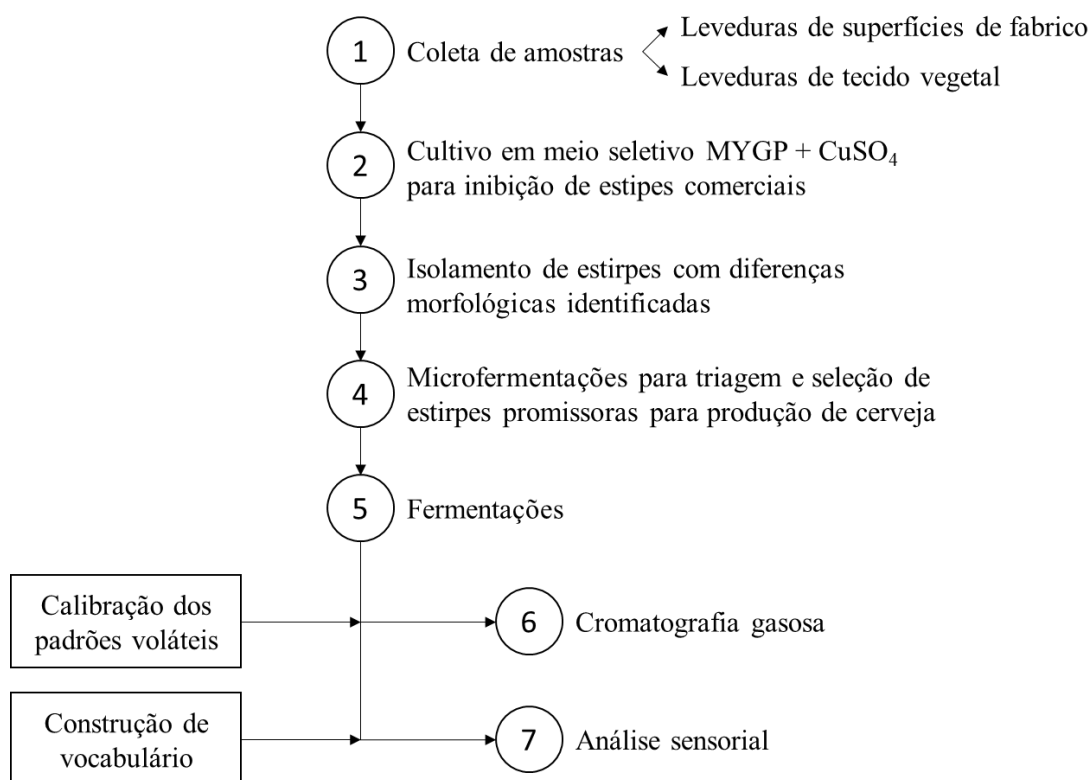


Figura 2.1 – Esquema simplificado da metodologia experimental adotada neste estudo.

2.1 Materiais

Materiais e reagentes utilizados durante o projeto: extrato de malte, extrato de levedura, glucose, peptona, agar, sulfato de cobre (CuSO₄), cloreto de sódio (NaCl), levedura de cerveja seca tipo ale (SafAle S-04, Fermentis, Marcq-en-Barœul, França), levedura de cerveja seca tipo lager (SafLager W-34/70, Fermentis, Marcq-en-Barœul, França), levedura de cerveja líquida tipo ale (WLP300, White Labs, Califórnia, E.U.A), acetato de etilo 99,9%, p.e. 76,5-77,5°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), acetato de isoamilo 99,7%, p.e. 142°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), acetato de feniletilo 97,0%, p.e. 238-239°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), caproato de etilo 99,5%, p.e. 168°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), caprilato de etilo 99,0%, p.e. 206-208°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), isobutanol 99,8%, p.e. 108°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), álcool isoamílico 99,8%, p.e. 131-132°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), 2-feniletanol 99,0%, p.e. 219°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), 4-vinilguaiacol 98,0%, p.e. 224°C (Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A), butanol 100%, etanol 100%.

Formulações dos mostos utilizados para fermentação:

- Mosto A: feito com extrato de malte seco levemente lupulado (*Spraymalt Hopped Light*, Muntons, Stowmarket, Reino Unido) na concentração de 125 g/l em água;
- Mosto B: feito com extrato de malte seco sem presença de lúpulo (*Spraymalt Light*, Muntons, Stowmarket, Reino Unido) na concentração de 125 g/l em água.
- Mosto C: feito com extrato de malte líquido sem presença de lúpulo (*Light*, Coopers, South Australia, Austrália) na concentração de 155 g/l em água.

2.2 Recolha de amostras

Dois tipos de leveduras foram utilizados neste projeto. Um proveniente de ambientes de produção de cerveja, as quais serão chamadas leveduras de superfície de fabrico (LSF), e

outro encontrado em tecidos vegetais, como folhas, flores e cascas de frutos, aqui denominadas leveduras selvagens.

2.2.1 Leveduras de superfície de fabrico (LSF)

A recolha de amostras foi realizada em fevereiro de 2019 na Letraria Brew Pub, fábrica da cerveja LETRA localizada em Vila Verde, Braga, Portugal. Foram colhidas 9 amostras, da superfície de locais promissores para o aparecimento de leveduras não-*Saccharomyces* ou *Saccharomyces* não domesticadas (Tabela 2.1). Essas superfícies estiveram em contacto com matérias-primas que possivelmente trouxeram estirpes selvagens para o local e foram expostas a leveduras de cerveja industrial passíveis de mutações e divergências nas estirpes originais (Gallone et al., 2018; Thorne, 1968). As zaragatoas foram acondicionadas em tubos com 10 ml de solução salina 0,85% (p/v) estéril e mantidas a 4°C *overnight* até que pudessem ser plaqueadas.

Tabela 2.1 - Superfícies de recolha de amostras para cultivo e seleção de leveduras não convencionais.

Amostra	Superfície de recolha
A	Rolha de casco de madeira originário da maturação de <i>peated whisky</i> , em uso para maturação de cerveja tipo belga
B	Exterior de casco de madeira originário da maturação de vinho italiano, em uso para maturação de cerveja tipo <i>weiss</i>
C	Fermentador
D	Casco de madeira vazio
E	Tanque de maturação de cerveja com adição de kiwi
F	Máquina de engarrafamento manual

G	Tanque de maturação vazio
H	Casco de madeira originário da maturação de vinho do porto, em uso para maturação de cerveja tipo belga
I	Bancada de manuseio de lúpulo

2.2.2 Leveduras selvagens

As amostras de levedura selvagem foram obtidas a partir de rosas adquiridas no mercado municipal de Peniche, Leiria, Portugal. As pétalas das rosas foram colocadas diretamente, sem passar por nenhum tipo de higienização, em 500 ml de mosto A (secção 2.1) esterilizado em um frasco de vidro (Figura 2.2), de acordo com as instruções do fabricante para propagação de leveduras. O mosto foi mantido em agitação por 10 minutos, para que o malte solubilizasse por completo, e em seguida esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. Em seguida à inoculação, o frasco foi mantido hermeticamente fechado ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 8 semanas. Após esse período foi observado o acúmulo de biomassa no fundo do frasco, assim como formação de CO₂ e aroma alcoólico característicos da fermentação. Estas características foram usadas como confirmação de uma fermentação bem-sucedida. Parte da biomassa sedimentada foi recolhida com uma espátula esterilizada e suspensa em tubos com 10 ml de solução salina 0,85% (p/v) estéril. O restante foi transferido para um novo frasco com 500 ml de mosto A doce (não fermentado) estéril e armazenado em refrigeração. As rosas foram descartadas.



Figura 2.2 - (a) Rosas usadas como fonte de leveduras selvagens; (b) Mosto estéril inoculado com as rosas; (c) Mosto após 8 semanas com sinais de formação de biomassa e fermentação.

2.3 Condições de crescimento de leveduras

2.3.1 Meio de cultura

As leveduras foram cultivadas e isoladas em meio de cultura *Malt Yeast Glucose Peptone* (MYGP) agar, com a seguinte composição: extrato de malte 0,3% (p/v), extrato de levedura 0,3% (p/v), glucose 1% (p/v), peptona 0,5% (p/v) e agar 1,5% (p/v) em água destilada.

2.3.2 Seleção de estirpes não convencionais

Para seleção de estirpes não convencionais com maior confiança, foi acrescentada ao meio de cultivo uma solução de CuSO_4 , que apresenta potencial de inibição de estirpes comerciais de *Saccharomyces* (Van Der Aa Kühle & Jespersen, 1998). O meio MYGP agar e a solução de CuSO_4 foram preparados e autoclavados separadamente a 121°C por 15 minutos. Após a autoclavagem, metade do meio MYGP foi acrescido de CuSO_4 , a uma concentração de 400 ppm, em câmara de fluxo laminar (Bio II Advance 4, Telstar, Terrassa, Espanha) e em seguida ambas as partes (com e sem CuSO_4) foram distribuídas em placas de Petri. Os meios foram armazenados a 4°C até utilização, por um período inferior a 2 meses.

2.3.3 Otimização da concentração de CuSO₄ no meio MYGP

Foram feitos testes prévios para otimização da concentração de CuSO₄ adicionado ao meio MYGP. A concentração escolhida foi aquela que inibiu o crescimento de uma estirpe comercial e permitiu o crescimento de uma estirpe selvagem. Em um primeiro teste, utilizou-se uma estirpe comercial *ale* (SafAle S-04) e uma estirpe selvagem resultante da inoculação de pêssego, já existente em estoque. As estirpes foram repicadas em placas de Petri com MYGP suplementado com CuSO₄ em concentrações de 0 a 1000 ppm. Um segundo teste de confirmação foi realizado com a levedura selvagem de tecido vegetal de rosas (levedura selvagem a ser usada em todos os ensaios que se seguiram) e uma estirpe comercial *lager* (SafLager W-34/70).

2.4 Cultivo de leveduras

Todas as amostras passaram por diluições decimais sucessivas em solução salina 0,85% (p/v) estéril para posteriormente serem cultivadas em placas de Petri. No caso das LSF, os tubos de solução salina com as zaragatoas foram o ponto de partida das diluições. A concentração final de diluição para cada amostra foi de 10⁻³. Para as leveduras selvagens, a solução salina com biomassa das rosas foi a solução inicial das diluições. A concentração utilizada foi de 10⁻⁶.

De cada tubo de diluição, 100 µl foram semeados por espalhamento em placas de Petri com meio MYGP agar e outros 100 µl foram semeados da mesma forma em meio MYGP agar com adição de CuSO₄ a 400 ppm. As placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias.

2.4.1 Isolamento e triagem de estirpes

2.4.1.1 Isolamento

Após o período de incubação das amostras, as colónias a serem isoladas foram escolhidas com base na sua suscetibilidade ao CuSO_4 , tendo sido eliminadas do processo aquelas que apresentaram forte inibição no meio seletivo MYGP agar + CuSO_4 em comparação ao MYGP agar puro, e diferenças aparentes na morfologia. Os isolados foram obtidos por repicagens das colónias selecionadas em placas de Petri com MYGP agar, com incubação a 25°C por 5 dias.

2.4.1.2 Triagem

As estirpes isoladas foram submetidas a uma etapa de triagem fermentativa. Esta triagem é necessária para que estas leveduras de contaminação sejam eliminadas do ensaio (Gallone et al., 2016). Duas UFC de cada isolado foram recolhidas com ansa de $1\ \mu\text{l}$ e cada uma inoculada em tubo Falcon estéril com 30 ml de mosto A (secção 2.1), preparado em frascos Schott, de acordo com as instruções do fabricante para propagação de leveduras, e autoclavado durante 15 minutos a 121°C . Os tubos inoculados foram mantidos numa incubadora agitada a 25°C durante 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a triagem para selecionar as estirpes promissoras para a fase de fermentação e produção de cerveja. Foram descartadas aquelas que apresentaram características indesejadas, como aroma a grãos ou leguminosas, a terra, oleoso e fenólico. Estirpes foram consideradas aceitáveis quando, para além de não demonstrarem as características negativas mencionadas, possuíam um leve aroma alcoólico, frutado ou maltado.

Para garantir a presença de apenas um isolado, a biomassa de cada tubo considerado aceitável foi cultivada em placas de Petri com meio MYGP agar. Novas triagens foram realizadas e o processo se repetiu até a obtenção dos isolados finais.

2.5 Processos fermentativos

2.5.1 Produção de cerveja

Com as estirpes selecionadas, iniciou-se a etapa de produção de biomassa e fabrico da cerveja. As estirpes não convencionais isoladas e selecionadas e 3 estirpes comerciais de controlo – nomeadas Ale (estirpe *ale* SafAle S-04), Fresca (estirpe *ale* WLP300) e Lager (estirpe *lager* SafLager W-34/70) – foram repicadas em placas de Petri com MYGP agar e incubadas por 72h a 25°C. Das placas, 1 colónia de cada estirpe foi recolhida com ansa de 1 µl, inoculada em tubo de ensaio 10 ml de mosto estéril e mantida em agitação a 25°C por 42h. Em seguida, as suspensões de levedura foram transferidas para *erlenmeyers* com 100 ml de mosto B (secção 2.1) estéril e mantidas em agitação por 42h a 25°C. A biomassa resultante foi utilizada como inóculo da fermentação.

A fermentação para produção de cerveja foi realizada em balões volumétricos de fundo plano com capacidade para 2 litros (Figura 2.3). Os frascos foram tapados com rolhas de silicone com uma abertura no centro, onde foram acoplados *airlocks* para alívio da pressão interna. Para cada produção de cerveja, foi preparado 1 litro de mosto B (secção 2.1) que foi agitado durante 20 minutos para homogeneização e posteriormente esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C. Após arrefecido, cada mosto foi inoculado com uma estirpe de levedura em camara de fluxo laminar (Bio II Advance 4, Telstar, Terrassa, Espanha). Os balões foram fechados e os *airlocks* foram preenchidos com etanol 70% (v/v) para impedir contaminações. A duração da fase de fermentação foi determinada pelo controlo dos compostos solúveis presentes no mosto, sendo esta terminada após 3 dias seguidos sem aumento significativo do grau Brix. Os balões foram mantidos em ambiente de temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e ao abrigo da luz. As cervejas resultantes foram transferidas para frascos Schott e armazenadas em camara frigorífica a 4°C até serem utilizadas para a análise química de perfil volátil e análise sensorial.



Figura 2.3 - Balões de fundo plano com mosto inoculado por estirpes de LSF.

2.5.2 Parâmetros de controlo da fermentação

Foi feito o acompanhamento diário de dois parâmetros de controlo da fermentação. O índice de refração para quantificação dos compostos solúveis no mosto, em °Brix, e a densidade ótica (D.O.), para acompanhar o perfil de crescimento biológico.

2.5.2.1 Determinação do grau Brix

O grau Brix foi determinado com recurso ao refratómetro digital de bancada (RFM340+, Bellingham & Stanley Limited, Kent, Reino Unido) com capacidade de medição entre 0 e 100 °Brix. A amostra foi previamente centrifugada por 5 minutos a 8000 rpm (centrífuga 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para sedimentar os sólidos em suspensão e de seguida colocou-se uma gota de amostra no suporte de leitura do refratómetro. A calibração do equipamento foi feita com água destilada. O suporte de leitura do refratómetro foi limpo com água destilada a cada leitura.

2.5.2.2 Densidade ótica

A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro de bancada (Evolution 201, Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.), com leitura da absorvância a 600 nm. As amostras foram analisadas em cuvetes com capacidade de 1,5 ml. A calibração do equipamento foi feita com água destilada.

2.6 Análise de compostos voláteis

2.6.1 Análise de cromatografia gasosa

A análise dos compostos orgânicos voláteis presentes nas cervejas fermentadas com leveduras não convencionais foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de chama ionizada (*Flame Ionized Detector* – FID) Trace 1300 (Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.) e extração por HS-SPME com *autosampler* TriPlus RSH 1300 (Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.).

2.6.1.1 Calibração das variáveis de identificação e quantificação dos voláteis de interesse

Foram definidos os compostos voláteis para quantificação e realizadas as curvas de calibração. Os padrões selecionados foram acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de feniletilo, caproato de etilo, caprilato de etilo, álcool isoamílico, 2-feniletanol, 4-vinilguaiacol. Foram feitas soluções individuais de cada padrão e uma solução mistura de todos os padrões, diluídas em etanol 5% (v/v de água destilada) nas concentrações indicadas na Tabela 2.2. Todas as calibrações foram feitas em triplicado.

Tabela 2.2 – Concentrações dos padrões dos voláteis utilizadas para calibração das respostas em GC-FID.

Composto	Concentrações (mg/l)					
Acetato de etilo	162.36	90.20	36.08	18.04	9.02	1.80
Acetato de isoamilo	15.77	8.76	3.50	1.75	0.88	0.18
Acetato de feniletilo	4.64	2.58	1.03	0.52	0.26	0.05
Caproato de etilo	1.96	1.09	0.43	0.22	0.11	0.02
Caprilato de etilo	1.95	1.08	0.43	0.22	0.11	0.02
Isobutanol	289.08	160.60	64.24	32.12	16.06	3.21
Álcool isoamílico	364.05	202.25	80.90	40.45	20.23	4.05
Álcool feniletílico	459.00	255.00	102.00	51.00	25.50	5.10
4-Viniguaiacol				98.00		

O cálculo do fator de resposta foi feito com utilizando butanol como padrão interno, de acordo com a (1):

$$F = \frac{\left(\frac{A_{pe}}{C_{pe}}\right)}{\left(\frac{A_{pi}}{C_{pi}}\right)} \quad (1)$$

onde A_{pe} , C_{pe} , A_{pi} e C_{pi} são variáveis conhecidas e correspondem respectivamente à área do pico do cromatograma relativa ao padrão externo, à concentração do padrão externo, à área do pico do padrão interno e à concentração do padrão interno.

Sob as mesmas condições, o valor de F mantém-se constante e as concentrações dos compostos de interesse nas amostras foram posteriormente calculadas a partir da mesma relação entre área do pico e concentração do composto, como demonstrado na Equação (2), onde C_v e A_v são respectivamente a concentração e a área do pico do volátil de interesse

(Castro & Ross, 2015). A concentração de butanol utilizada tanto nas calibrações quanto nas análises das amostras foi de 810 mg/l.

$$C_v = \frac{A_v}{\left(\frac{A_{pi}}{C_{pi}}\right) \times F} \quad (2)$$

2.6.1.2 Extração de voláteis por HS-SPME

As variáveis de extração por HS-SPME foram definidas com base no estudo de Silva et al. (2008), modificadas de acordo com as necessidades do processo. Foi utilizada uma fibra SPME revestida com Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) StableFlex (Supelco, Darmstadt, Alemanha). A fibra foi condicionada durante 1 hora a 270°C no injetor do GC antes da primeira utilização, conforme as recomendações do fabricante.

Alíquotas de 4,5 ml de amostra foram colocadas em frascos de 20 ml, juntamente com 500 µl de padrão interno e 1g de NaCl, e seladas com septos de silicone e tampa de rosca metálica para serem inseridas no *autosampler*. Os frascos foram colocados em um agitador aquecido a 40°C por 5 minutos para promover o equilíbrio entre as fases líquida e vapor da amostra. Após esse tempo, a fibra foi exposta ao *headspace* por 30 minutos para extração dos analitos, ainda em agitação e a 40°C, em seguida introduzida no injetor do sistema de GC a 210°C e mantida por 15 minutos para dessorção dos compostos.

2.6.1.3 Condições do GC-FID

A separação, detecção e quantificação das amostras foi realizada com GC-FID, equipado com uma coluna TR-V1 (Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.) de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 1,8 µm de espessura de filme, um injetor *split/splitless* a operar em modo *splitless* e um *liner* SPME de vidro com 4 mm de diâmetro. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: temperatura inicial de 40°C mantida por 2

minutos, seguido de um aumento gradativo a uma taxa de 10°C/min até alcançar 140°C e outro aumento de 7°C/min até 250°C, mantendo essa temperatura final por 3 minutos. A temperatura do FID foi mantida a 280°C e a chama foi alimentada por 350 ml/min de ar purificado e 35 ml/min de hidrogênio. Hélio foi usado como gás carreador com vazão de 1 ml/min (Silva et al., 2008).

2.6.2 Análise sensorial

A avaliação sensorial das cervejas fermentadas por leveduras não convencionais foi realizada pelo painel não treinado interno SensoMarES, composto por 27 elementos, 74% do sexo feminino e 16% do sexo masculino, visando a caracterização das amostras quanto à presença de um composto volátil. O composto escolhido foi o acetato de isoamilo por se tratar de um éster acetato com características de aroma e sabor desejáveis e presentes em uma grande variedade de cervejas (Pinho, Ferreira, & Santos, 2006; Verstrepen et al., 2003).

2.6.2.1 Definição de descritores

A primeira etapa da análise consistiu na definição dos descritores para o acetato de isoamilo pelo painel, com base em metodologias já aplicadas ao estudo da cerveja (Clapperton, 1973; Guyot-Declerck, Fran, Ritter, Govaerts, & Collin, 2005). Os participantes do painel provaram uma amostra de acetato de isoamilo e um controlo, ambos não identificados, e foram instruídos a listar as características de aroma e sabor mais intensas na amostra em comparação ao controlo. A amostra de acetato de isoamilo foi feita com adição de 32 mg/l do composto a uma cerveja base, fermentada com levedura comercial lager a partir do mosto C (secção 2.1) por 7 dias a 20°C. A mesma cerveja base, sem nenhum tipo de adição, foi utilizada como controlo. Ao fim, foi apresentada uma lista de 4 descritores composta pelos 3 termos mais recorrentes escolhidos pelos provadores e por 1 termo definido em literatura.

2.6.2.2 Avaliação da intensidade de acetato de isoamilo

Foram analisadas sensorialmente cervejas fermentadas por 3 das 5 estirpes de leveduras não convencionais mais 2 controlos fermentados por levedura comercial *lager*. Um dos controlos corresponde à cerveja *lager* acrescida de 3 mg/l do padrão acetato de isoamilo (Ctrl_1) e o outro corresponde à cerveja *lager* sem nenhum tipo de adição (Ctrl_0). A metodologia escolhida foi a análise de Friedman de *ranking* de comparação pareada, descrita por Meilgaard et al. (1999), usada quando o objetivo do teste sensorial é comparar diversas amostras quanto a um único atributo – no caso, a intensidade de concentração do acetato de isoamilo. O princípio desse método consiste em apresentar aos provadores pares de amostra, um par de cada vez e em ordem aleatória até todas as combinações serem apresentadas, e perguntar em qual das duas amostras mais se identifica o atributo avaliado. Com base nas respostas, as amostras são arranjadas em uma escala de intensidade desse atributo. As provas foram divididas em duas sessões com 5 pares de amostras em cada, totalizando 10 combinações, de acordo com o esquema na Figura 2.4. Os provadores preencheram, em cada sessão, uma ficha de prova construída para o efeito (Anexo 2:). Na ficha foi pedido que assinalassem em qual amostra, dentro de cada par apresentado, o acetato de isoamilo era identificado com mais intensidade.

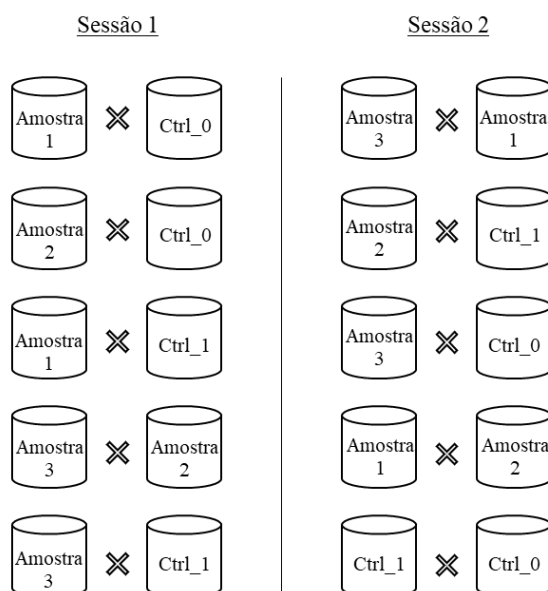


Figura 2.4 – Esquema de combinações de amostras servidas a cada participante do painel sensorial.

2.7 Análise exploratória dos dados

Análise cinética dos dados experimentais de parâmetros fermentativos foi feita a partir de um modelo matemático de primeira ordem (Tschoeke, Henrique, Cavalcanti, Gomes, & Souza, 2017). As constantes do modelo foram ajustadas para cada fermentação pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram considerados significantes quando *p value* <0.001. Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para discriminar as leveduras de acordo com as médias de concentração dos compostos voláteis produzidas em cada cerveja. Ambas as análises foram feitas com recurso ao software de análise de dados RStudio.

3 Resultados e discussões

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes ao isolamento e seleção de estirpes de levedura não convencional, aos processos fermentativos e aos testes realizados para caracterização e avaliação do perfil volátil das leveduras utilizadas.

3.1 Seleção de estirpes não convencionais

3.1.1 Otimização da concentração de CuSO_4 no meio MYGP

A suscetibilidade ao cobre é uma característica das leveduras de uso industrial que permite a sua diferenciação de estirpes não convencionais e o controlo de contaminações durante as fermentações (Sun et al., 2016; Taylor & Marsh, 1984).

No primeiro teste com concentrações de CuSO_4 entre 0 e 1000 ppm, a concentração mínima necessária para obter uma inibição clara (aproximadamente 0 unidades formadores de colônias (UFCs) contáveis) da estirpe comercial foi de 400 ppm. A partir de 800 ppm, a estirpe selvagem também apresentou inibição de crescimento. Um segundo teste de confirmação (

Figura 3.1) foi realizado em meio MYGP agar suplementado de CuSO_4 a 400 ppm. O controlo foi feito em meio MYGP agar. A levedura selvagem do tecido vegetal das rosas e a estirpe comercial *lager* (SafLager W-34/70) reagiram de forma diferentes à presença dos iões de cobre. Enquanto a levedura selvagem teve um padrão de crescimento semelhante ambos os meios, a levedura comercial foi claramente inibida (0 UFCs contáveis) no meio suplementado. O meio seletivo ficou definido como MYGP + CuSO_4 a 400 ppm.

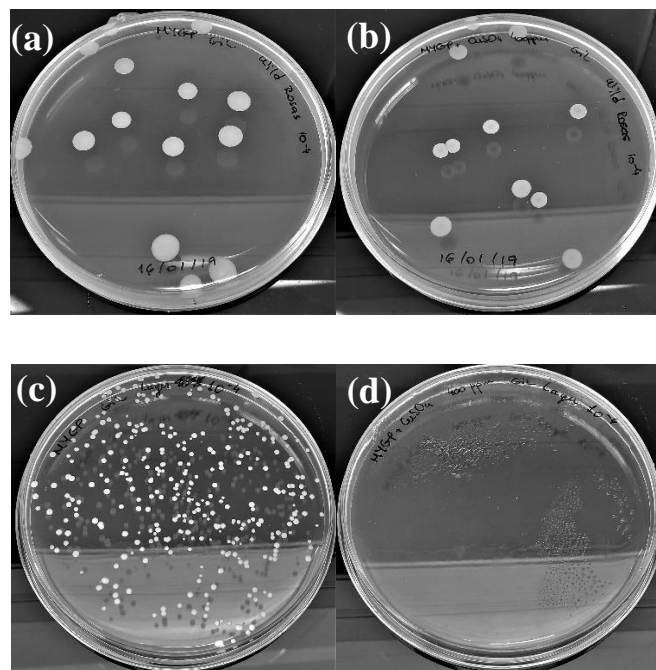


Figura 3.1 - Inoculação por espalhamento de leveduras em diluição 10⁻⁴: (a) Levedura selvagem em MYGP agar; (b) Levedura selvagem em MYGP agar + CuSO₄ a 400 ppm; Levedura comercial lager em MYGP agar; (d) Levedura comercial lager em MYGP agar + CuSO₄ a 400 ppm.

3.1.2 Isolamento

A escolha das estirpes de leveduras a serem isoladas teve como critério inicial as características morfológicas em meio sólido e inibição de crescimento na presença de íons cobre. No crescimento de leveduras selvagens foi observado apenas um tipo aparente de morfologia, logo foi recolhido um único isolado. Nas placas com inoculação das LSF houve crescimento de uma maior diversidade de microrganismos. No final, 18 aparentes estirpes do tipo LSF foram isoladas, totalizando 19 estirpes não convencionais.

3.1.3 Triagem

Por se tratarem de leveduras desconhecidas, todos os isolados foram submetidos a uma etapa de triagem com o objetivo de avaliar as suas capacidades de fermentar o mosto de cerveja. Leveduras selvagens e encontradas em ambientes de fábrica são consideradas organismos de contaminação em processos por não terem sido submetidas ao processo

evolutivo de domesticação sofrido pelas estirpes comerciais. É comum que a presença dessas estirpes não domesticadas contribua para a formação de uma bebida considerada de qualidade inferior ou estragada. (Matoulková, Kopecká, & Kubizniaková, 2013)

O teste de microfermentação, com duração de 7 dias, foi conduzido e analisado conforme descrito na seção anterior (ver ponto 2.4.1). Foram consideradas não aptas aquelas que apresentaram aromas classificados como indesejados ou ausência de crescimento biológico. Aquelas que não apresentaram aromas como indesejados e mostraram características da fermentação de cerveja (aroma alcoólico, frutado ou maltado) foram consideradas aptas para o processo de fermentação. Os resultados do primeiro teste realizado se encontram na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Estirpes isoladas com base em suas características morfológicas e resultados do primeiro teste de microfermentação

Isolado	Tipo	Origem	Características morfológicas	Resultados da microfermentação
1	LSF	A	Rugosa, branca, irregular.	Não apta
2	LSF	A	Lisa, amarelada, redonda, uniforme.	Apta
3	LSF	B	Lisa, branca, leitosa.	Apta
4	LSF	B	Lisa, branca, forma regular.	Apta
5	LSF	D	Lisa, amarela, forma regular, redonda.	Não apta
6	LSF	D	Núcleo: amarelo, forma irregular e liso; Periferia: leitosa, branca, forma irregular.	Não apta
7	LSF	E	Lisa, alaranjada, redonda, forma regular.	Não apta
8	LSF	E	Lisa, branca, transparente, forma regular.	Não apta
9	LSF	E	Lisa, branca, leitosa, forma regular	Não apta

10	LSF	E	Núcleo: rosado, liso, forma irregular. Periferia: branca, rugosa, forma irregular.	Não apta
11	LSF	G	Lisa, branco perolado, forma regular.	Não apta
12	LSF	G	Cinzenta, baça, achatada. Núcleo ligeiramente mais claro	Não apta
13	LSF	H	Lisa, branca, redonda, forma regular.	Não apta
14	LSF	H	Cinzenta, baça, achatada, forma regular.	Não apta
15	LSF	I	Cinzenta, transparente, com brilho, forma regular, uniforme.	Não apta
16	LSF	I	Lisa, cinzenta, transparente, com brilho, forma regular. Núcleo mais acastanhado.	Não apta
17	LSF	I	Lisa, branca, com brilho, forma regular. Núcleo mais acastanhado.	Não apta
18	LSF	I	Lisa, coral, redonda, forma regular.	Não apta
19	Selvagem	Rosas	Lisa, branca, redonda, forma regular.	Apta

Para garantir que os isolados apresentavam de facto uma única morfologia aparente e que as células estavam viáveis ao fim da fermentação, a biomassa acumulada nos tubos foi plaqueada. Os testes de triagem foram refeitos com os novos isolados e a sequência de triagem das estirpes para as etapas seguintes ocorreu como demonstrado no esquema da Figura 3.2. Para fins de distinção na nomenclatura, foi adicionada a letra W para identificar as leveduras não convencionais e a letra L para as LSF. A levedura selvagem terminou por ser nomeada W_Rosas para remeter sua origem.

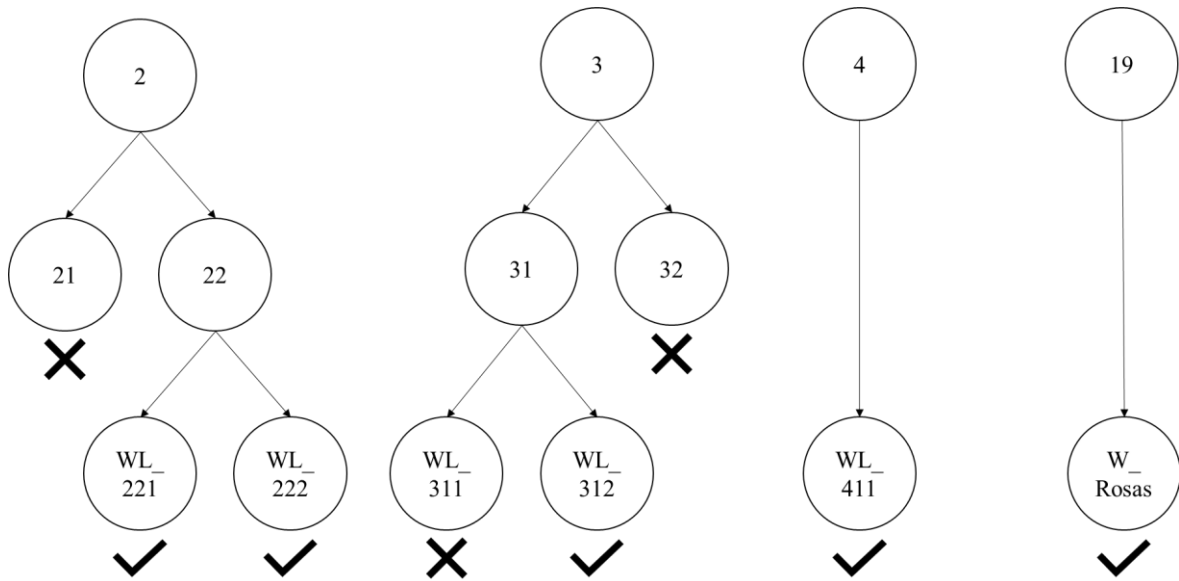


Figura 3.2 – Sequência de triagem das leveduras consideradas aptas na primeira etapa de microfermentação. Os círculos com um X abaixo representam as leveduras que não foram consideradas aptas para produzir cerveja.

3.2 Controlo da fermentação

3.2.1 Densidade ótica

Durante o acompanhamento dos parâmetros fermentativos, encontrou-se grande dificuldade de aferir a evolução do crescimento celular. O processo de produção de cerveja é feito na ausência de agitação, portanto a recolha de alíquotas do mosto durante a fermentação não foi feita de forma consistente no que diz respeito à quantidade de células recolhidas. Após algumas tentativas de fazer medições de absorvância sem sucesso, decidiu-se pela interrupção do acompanhamento deste parâmetro. Em ensaios futuros, uma possível forma mais eficiente de realizar essa análise seria fazer separadamente as fermentações em volumes menores e sob agitação com o objetivo apenas de monitorar o perfil de crescimento celular.

3.2.2 Determinação do grau Brix

Os resultados das medições de sólidos solúveis presentes no mosto ao longo da fermentação evidenciaram que, nas condições propostas no delineamento experimental, o perfil de consumo de açúcares apresenta uma tendência transversal a quase todas as amostras, i.e., um decréscimo acentuado durante os dois primeiros dias, seguido de uma longa estabilização (Figura 3.3). As exceções são as estirpes WL_221 e WL_222, que apresentaram uma tendência de evolução baixa e gradativa desde o início da fermentação, sem esse consumo elevado evidente nos primeiros dias. Essa diferença pode estar associada às características do metabolismo dessas estirpes.

As leveduras não convencionais, no geral, não apresentam a mesma taxa de conversão de açúcares das leveduras comerciais na produção de etanol. Mas não foi o caso da WL_411, que teve um comportamento quase idêntico às estirpes comerciais. Os tempos de fermentação variaram de 7 a 9 dias de acordo com as variações no índice de refração medido em °Brix e todas as cervejas fermentadas por estirpes não convencionais apresentaram concentração final de etanol menor que aquelas fermentadas por estirpes comerciais.

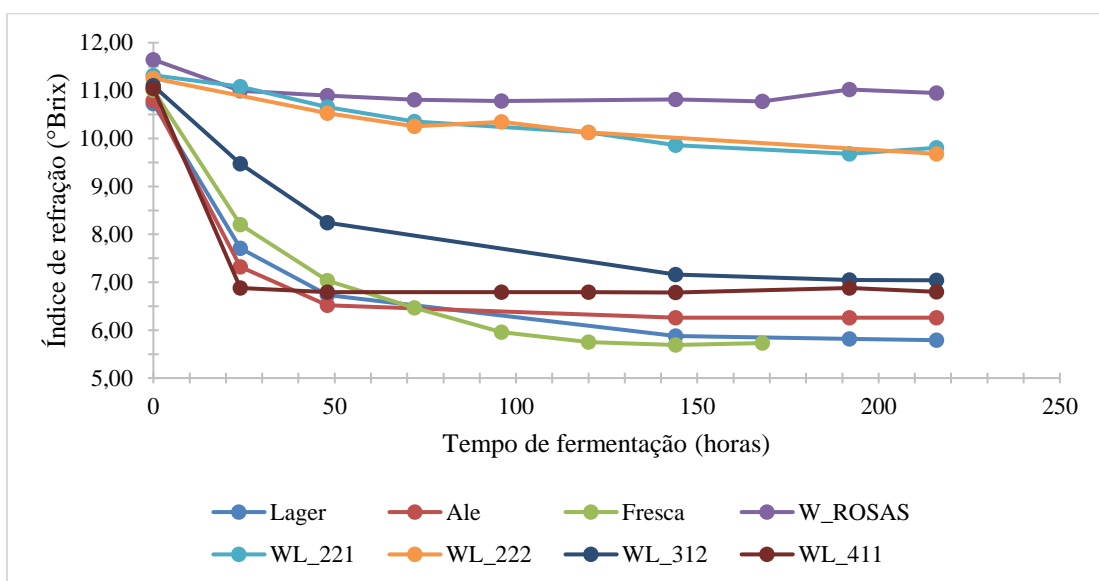


Figura 3.3 – Variação da concentração média de sólidos solúveis no mosto medida através do índice de refração em °Brix ao longo do tempo de fermentação

As sequências de fermentação foram feitas em ordem aleatória, o que dificultou a padronização da medição dos parâmetros fermentativos e pode ter gerado inconsistências nos resultados. Para evitar esse problema em futuros ensaios dessa natureza, deve-se realizar o delineamento das fermentações de modo que existam sempre 3 mostos inoculados pela mesma estirpe no mesmo momento. Dessa forma, garante-se que os dados serão recolhidos em triplicada e em tempos de fermentação idênticos para uma mesma estirpe.

Para verificar a variação de açúcares solúveis no mosto e a concentração de etanol produzido é preciso fazer a correção dos valores medidos em °Brix. Isso porque o índice de refração do meio é alterado não apenas pela presença de açúcares, mas também pela presença do etanol. Os cálculos são feitos em função da densidade específica do mosto, tornando necessária também a conversão desses valores. O cálculo da densidade específica corrigida ao longo do tempo (FG) foi feito de acordo com a Equação (3), onde OB é o valor do índice de refração do mosto medido no momento após a inoculação (t_0) e FB é o índice de refração medido no tempo t (Hall, 1995).

$$\begin{aligned}
 FG = & 1.001843 - 0.002318474002318474 * OB - 0.000007775 * OB^2 \\
 & - 0.000000034 * OB^3 + 0.00574 * FB + 0.00003344 * FB^2 \\
 & + 0.000000086 * FB^3
 \end{aligned} \tag{3}$$

Com os valores de FG é possível calcular a concentração de etanol em volume (ABV) e em massa (Et) por volume de cerveja através da Equação (4) e da Equação (5), respectivamente. OG é o valor da densidade específica do mosto em t_0 e ρ_{et} é a densidade do etanol em g/l.

$$ABV(\%v/v) = (OG - FG) * 133 \tag{4}$$

$$Et(g/l) = ABV * \frac{\rho_{et}}{100} \quad (5)$$

Tabela 3.2 – Valores de densidades específicas inicial (OG) e final (FG) e concentrações finais de etanol em % v/v (ABV) e g/l (Et) calculados a partir das médias dos valores de índice de refração medidos em °Brix para cada estirpe de levedura.

Estirpe	OG	FG	ABV (% v/v)	Et (g/l)
Lager	1.0416	1.0104	4.15	32.71
Ale	1.0418	1.0131	3.81	30.09
Fresca	1.0427	1.0090	4.47	35.28
W_Rosas	1.0453	1.0408	0.57	4.52
WL_221	1.0439	1.0340	1.35	10.67
WL_222	1.0437	1.0337	1.29	10.18
WL_312	1.0431	1.0172	3.44	27.13
WL_411	1.0428	1.0161	3.49	27.54

Na Tabela 3.2 podem ser observadas as diferenças na concentração final de etanol entre as estirpes comerciais e as não convencionais. A estirpe Fresca apresentou o metabolismo de fermentação alcoólica mais eficiente e foi a que produziu cervejas com maior ABV, o que era esperado por se tratar de uma estirpe comercial de alto valor. Por outro lado, a menor concentração de álcool foi observada na cerveja produzida pela estirpe selvagem W_Rosas.

Cada levedura atenua açúcares de maneira diferente e possui condições ótimas de fermentação particulares. Leveduras do tipo *ale*, por exemplo, não são capazes de metabolizar melibiose e utilizam maltotriose de maneira menos eficiente que as do tipo *lager* (Deák, 2007). Esses açúcares residuais que permanecem na cerveja justificam a menor concentração de etanol da cerveja fermentada pela estirpe Ale em comparação à Lager. Uma hipótese para o baixo rendimento das leveduras não convencionais estudadas é de que o seu metabolismo inerente atinge atividades máximas em condições diferentes daquelas testadas

pelo experimento. No âmbito das investigações de leveduras não convencionais para a produção de cerveja, alguns autores reportam a baixa produção de álcool em condições semelhantes às estudadas no presente trabalho. Espécies como *Candida zemplinina* e *Saccharomyces ludwigii* não são capazes de fermentar a maltose, açúcar em maior concentração no mosto. Essa desvantagem pode ser ultrapassada com o uso de adjuntos ricos em sacarose ou com recurso a fermentações mistas, nas quais a combinação com *Saccharomyces cerevisiae* gera uma melhora na cinética do processo (Estela-Escalante, Rosales-Mendoza, Moscosa-Santillán, & González-Ramírez, 2016; Michel et al., 2016). Leveduras com perfis de consumo de açúcares do mosto semelhantes aos apresentados pelas estirpes W_Rosas, WL_221 e WL_222 também são atualmente estudadas na produção de cerveja com baixo teor alcoólico (i.e., *Mrakia gelida*). A caracterização dos perfis fermentativos dessas leveduras pode determinar novos métodos de produção de cervejas diferenciadas e com perfil sensorial agradável (De Francesco et al., 2018).

A cinética de produção de etanol ao longo de cada fermentação foi analisada através um modelo matemático de primeira ordem, proposto por Tschoeke, Henrique, Cavalcanti, Gomes, & Souza (2017), descrito na Equação (6).

$$Et(t) = Et_{m\acute{a}x} * (1 - e^{t/\tau}) \quad (6)$$

Onde:

$Et(t)$ é a produção de etanol em g/l em função do tempo em horas;

$Et_{m\acute{a}x}$ representa a concentração máxima de etanol em g/l;

t é o tempo em horas;

τ é uma constante do tempo do processo em horas.

A partir dessa equação, é possível caracterizar cada estirpe quanto ao seu potencial perfil de consumo de açúcares do mosto para produção de etanol e compará-las entre si. Os ajustes das curvas para cada levedura estão representados em gráficos na Figura 3.4. As constantes $Et_{m\acute{a}x}$ e τ podem ser vistas na Tabela 3.3.

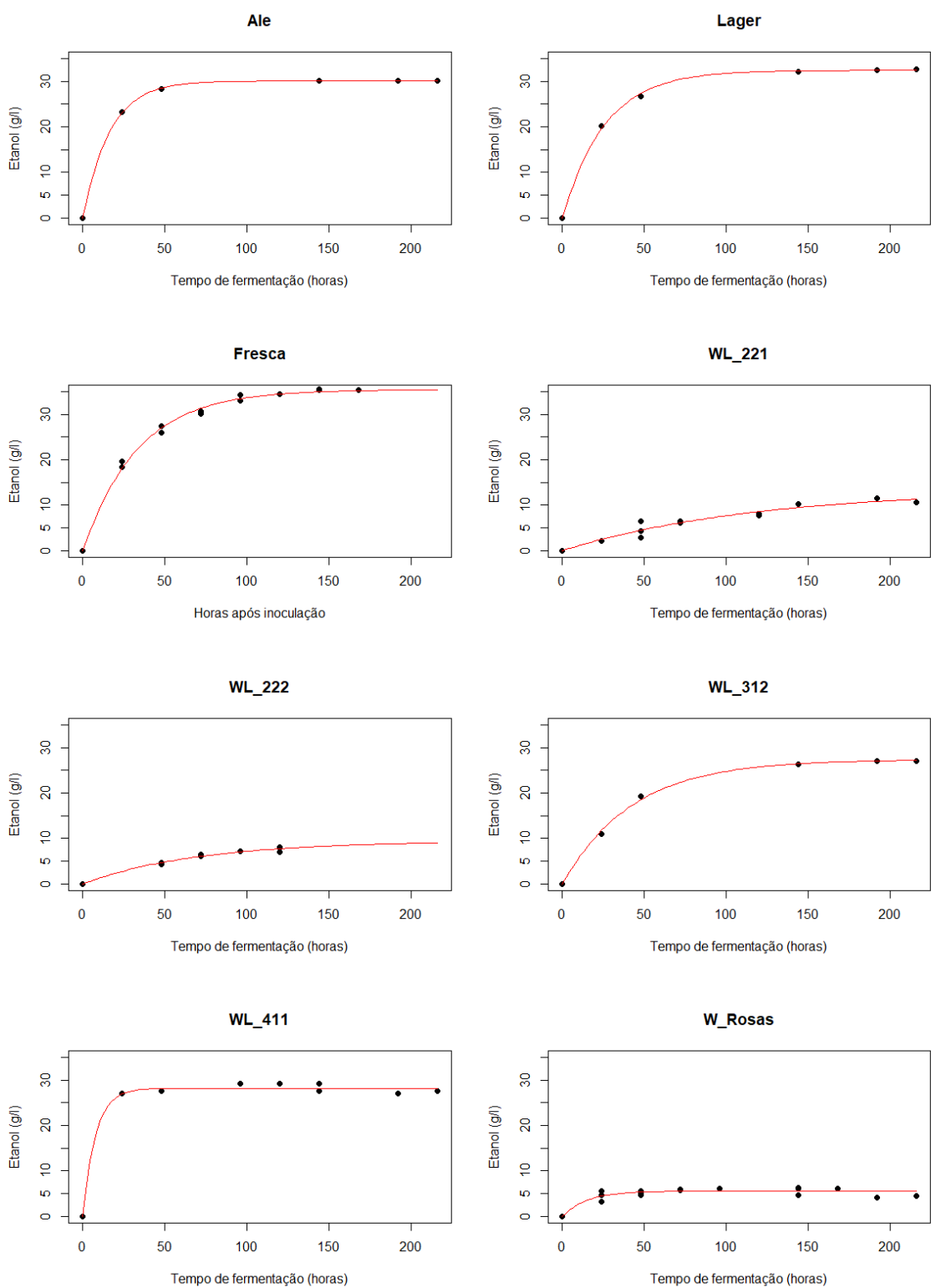


Figura 3.4 – Gráficos da variação da concentração de etanol (g/l) ao longo do tempo de fermentação (h) com curvas ajustadas pelo modelo cinético de primeira ordem proposto por Tschoeke et. al. (2017).

Os modelos gráficos de concentração de etanol estão de acordo com o que foi observado no gráfico de variação dos sólidos solúveis no mosto. A produção de etanol está diretamente associada ao consumo de açúcares do mosto através da via metabólica da fermentação alcoólica, então essa relação era esperada. A maioria das leveduras apresenta uma taxa de produção alcoólica mais elevada nos dois primeiros dias seguida de uma estabilização gradual até atingir um patamar máximo, com exceção das estirpes WL_221 e WL_222. Essas duas estirpes apresentam uma curva mais suave, o que pode ser um indício de que o tempo necessário para que a fermentação ocorra por completo seja maior do que o considerado durante a execução da metodologia.

Tabela 3.3 – Constantes parametrizadas pelo modelo cinético de primeira ordem proposto por Tschoeke et al. (2017) para as fermentações realizadas com cada estirpe de levedura.

Estirpe	Et_{máx} (g/l)	τ (h)
Lager	32.415	25.812
Ale	30.076	16.354
Fresca	35.424	33.388
W_Rosas	5.567	15.176
WL_221	13.504	118.794
WL_222	9.474	70.386
WL_312	27.364	42.471
WL_411	28.205	7.687

Ao observar os valores de concentração máxima de etanol, percebe-se que as estirpes comerciais apresentam capacidade de atingir um maior teor alcoólico. Entre as estirpes não convencionais, WL_312 e WL_411 se destacam com valores altos de Et_{máx}, próximos do apresentado pela estirpe Ale. Isso indica um potencial para a fermentação alcoólica por parte destas leveduras não convencionais. Espécies como *Candida sheatae* e *Torulaspota delbrueckii* possuem estirpes caracterizadas como capazes de fermentar o mosto cervejeiro e produzir etanol com rendimentos elevados, apresentando também metabolitos secundários relevantes para formação de sabor e aromas desejados na cerveja (Michel et al., 2016) É

possível que para WL_312 e WL_411, a produção de etanol se aproxime ainda mais do observado nas fermentações com leveduras comerciais caso as condições do processo sejam otimizadas.

De acordo com o modelo cinético, o aumento da constante de tempo τ diminui a concentração de etanol no tempo t . Ou seja, quanto maior o valor de τ , maior o tempo necessário para a concentração de etanol atingir seu máximo. Dentre todas as leveduras, comerciais e não convencionais, WL_411 é a que possui a menor constante de tempo. Aliado ao fato de seu valor de $E_{t_{máx}}$ ser o mais alto, conclui-se que essa é a estirpe não convencional que possui capacidade de produzir mais etanol em menor tempo. No contexto dos processos industriais, essa característica é desejada para que a produtividade seja a mais alta possível (Powell, Quain, & Smart, 2003). O facto de dessa estirpe possuir parâmetros fermentativos superiores aos das estirpes comerciais demonstra que leveduras não convencionais podem ainda servir como fonte interessante de inovação com valor para a indústria.

Para além dos resultados obtidos com as leveduras avaliadas no presente estudo, esse tipo de análise por si é importante para a caracterização de novas leveduras para uso industrial. Entender o perfil fermentativo proporciona uma previsibilidade dos resultados da fermentação e, conseqüentemente, permite que o produtor de cerveja possa escolher a levedura mais adequada para o estilo pretendido (Karabín, Jelínek, Kotrba, Cejnar, & Dostálek, 2018). Ainda que a construção desse perfil não seja prática ou executável para o fabricante, o fornecedor de levedura se beneficia da inclusão dessa informação associada aos seus produtos.

3.3 Caracterização do perfil volátil

No final do processo de fermentação, as cervejas foram submetidas a análises quantitativas com métodos de cromatografia gasosa e análise sensorial. A partir da cromatografia gasosa foi possível identificar a presença dos compostos voláteis produzidos por cada levedura e quantificá-los. Através da análise sensorial, buscou-se identificar a presença e intensidade do acetato de isoamilo nas amostras de cerveja. Posteriormente foram

testadas correlações entre os dados de quantificação por cromatografia e de percepção de intensidade de acetato de isoamilo pelo painel sensorial.

3.3.1 Análise de cromatografia gasosa

A etapa de calibração em GC-FID foi realizada com três objetivos principais. Primeiro avaliar se os equipamentos disponíveis e o método de análise escolhido eram adequados para os compostos voláteis em questão. Segundo, para obter os tempos de retenção de cada composto. E por fim, calcular o fator de resposta dos voláteis de estudo em relação ao butanol, utilizado como padrão interno.

Com a metodologia proposta foi possível observar picos bem formados de todos os padrões externos durante a calibração, o que trouxe segurança para seguir com as análises sem alterações no procedimento. Os tempos de retenção e fatores de resposta calculados com a Equação (1) estão indicados na Tabela 3.4. Os valores das áreas dos picos utilizados nos cálculos estão detalhados no Anexo 1: .

Tabela 3.4 – Tempo de retenção (RT) e fator de resposta de cada metabolito volátil obtidos na etapa de calibração do GC.

Composto	RT (min)	Fator de resposta
Etanol	4.38	0.07
Acetato de etilo	6.88	3.57
Isobutanol	7.61	1.91
Álcool isoamílico	9.82	2.71
Acetato de isoamilo	12.16	47.95
Caproato de etilo	14.45	165.52
Álcool feniletílico	18.02	10.01
Caprilato de etilo	18.26	539.21
Acetato feniletílico	20.22	235.31
4-Vinilguaiacol	21.88	0.35

Com os tempos de retenção e fatores de resposta definidos, foi iniciada a análise das amostras de cerveja para quantificação dos metabolitos voláteis. Cada cerveja foi analisada pelo método do GC-FID proposto e com as áreas dos picos de resposta obtidos em cada corrida foram calculadas as concentrações dos compostos utilizando a Equação (2). A Tabela 3.5 mostra esses valores de concentração associados a cada estirpe de levedura.

Tabela 3.5 – Valores médios de concentração final em mg/l para os metabolitos voláteis obtidos por método de GC-FID nas fermentações das leveduras estudadas \pm desvio padrão. N = 3.

	Lager	Ale	Fresca	W_Rosas	WL_221	WL_222	WL_312	WL_411
Etanol	42760.616 \pm 9272.742	31988.384 \pm 7256.794	44290.536 \pm 14572.427	7345.033 \pm 1020.804	21976.537 \pm 7752.859	15859.420 \pm 1300.844	37095.548 \pm 2622.129	30002.336 \pm 6506.556
Acetato de etilo	25.197 \pm 10.983	13.935 \pm 2.024	28.467 \pm 20.412	23.931 \pm 3.601	19.198 \pm 7.693	15.933 \pm 6.020	22.943 \pm 3.936	23.673 \pm 10.361
Isobutanol	30.857 \pm 12.765	18.388 \pm 3.756	55.415 \pm 27.241	4.411 \pm 1.616	15.550 \pm 9.246	12.484 \pm 7.020	32.076 \pm 7.840	36.137 \pm 11.175
Álcool isoamílico	61.432 \pm 18.668	58.504 \pm 7.474	80.014 \pm 3.128	6.198 \pm 2.168	13.638 \pm 2.347	13.806 \pm 2.353	36.071 \pm 2.063	62.282 \pm 0.825
Acetato de isoamilo	1.617 \pm 0.428	1.582 \pm 0.330	3.935 \pm 0.308	0.355 \pm 0.050	0.144 \pm 0.100	0.189 \pm 0.100	0.681 \pm 0.181	2.015 \pm 0.124
Caproato de etilo	0.180 \pm 0.048	0.217 \pm 0.129	0.171 \pm 0.041	0.014 \pm 0.001	0.204 \pm 0.041	0.165 \pm 0.023	0.109 \pm 0.017	0.289 \pm 0.048
Álcool feniletílico	27.748 \pm 1.728	33.226 \pm 7.380	31.670 \pm 4.336	5.210 \pm 0.382	13.474 \pm 1.251	11.635 \pm 1.097	21.932 \pm 1.746	31.357 \pm 3.732
Caprilato de etilo	0.587 \pm 0.298	0.779 \pm 0.571	0.606 \pm 0.065	0.016 \pm 0.005	0.901 \pm 0.619	0.817 \pm 0.585	0.211 \pm 0.060	0.424 \pm 0.195
Acetato de feniletilo	0.798 \pm 0.155	0.761 \pm 0.389	1.126 \pm 0.179	0.103 \pm 0.073	0.033 \pm 0.004	0.027 \pm 0.003	0.241 \pm 0.035	0.692 \pm 0.160
4-Vinilguaiacol	309.389 \pm 254.466	100.702 \pm 76.060	91.704 \pm 15.489	37.105 \pm 39.404	838.551 \pm 151.874	851.802 \pm 186.068	57.385 \pm 30.167	88.685 \pm 49.935

Em termos de concentração de compostos, nenhuma estirpe não convencional apresentou valores aparentemente maiores que as comerciais. Os valores encontrados para quase todos os metabolitos voláteis estão dentro da faixa esperada para tais compostos. A maior discrepância é vista nos resultados do 4-vinilguaiacol, que em cervejas comerciais tipo *lager* e *ale* padrão não costuma ser identificado em concentrações maiores que 1 mg/l (Coghe et al., 2004). A principal hipótese para os valores obtidos estarem muito acima do encontrado em literatura é este ser um composto pouco solúvel em água. A baixa concentração de etanol (5% v/v) pode não ter sido suficiente para permitir sua solubilização. Sendo assim, a área do pico observado no cromatograma de calibração pode ter sido relacionada a uma concentração maior que a real. A relação de proporção ainda pode ser válida para fins comparativos, mesmo que os valores absolutos estejam em desacordo com a literatura. Essa etapa da metodologia pode ser melhorada com o preparo de uma solução inicial de 4-vinilguaiacol em etanol puro para depois realizar diluições até que o etanol atinja a concentração de 5% (v/v).

Com os resultados da cromatografia foi feita uma Análise de Componentes Principais (PCA) que pode indicar algumas relações entre as amostras (Figura 3.5).

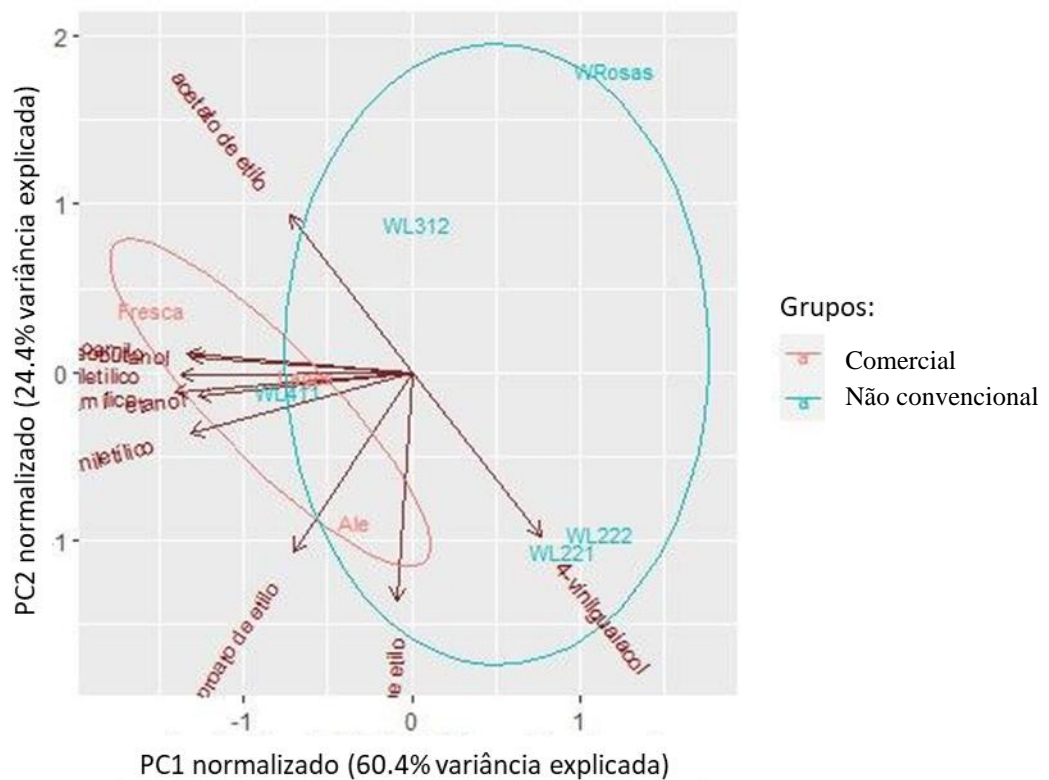


Figura 3.5 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos resultados de concentrações de metabolitos voláteis obtidos para cada cerveja.

Há uma diferença perceptível entre os grupos de leveduras comerciais e os de leveduras não convencionais. A aglomeração das estirpes comerciais dá-se mais à esquerda do gráfico, onde se encontram os vetores dos compostos voláteis considerados positivos, enquanto as estirpes não convencionais aglomeram-se no sentido do vetor do 4-vinilguaiacol, considerado um aroma indesejado. Conclui-se que o perfil volátil das leveduras comerciais é mais completo e positivo que das não convencionais. Os perfis das leveduras não convencionais apresentam-se mais dispersos no gráfico. Existe uma diferença grande entre as concentrações de voláteis nesse grupo de leveduras, mas estas ainda são, no geral, menos ricas que as comerciais. É de se esperar que estirpes selecionadas sem qualquer critério de diferenciação entre si tenham metabolismos muito distintos e, portanto, resultem em perfis voláteis variados. Torna-se evidente que o processo de domesticação (seleção e cruzamento de espécies selvagens para obter variantes que prosperem em condições criadas pelo homem) das leveduras de cerveja envolveu uma convergência na produção de compostos voláteis (Gallone et al., 2018). As diferenças constatadas reforçam o potencial

uso do perfil volátil das cervejas como método de *fingerprinting* das leveduras (Pope et al., 2007). A WL_411 em particular possui um perfil mais comparável às comerciais e apresenta-se como a levedura recolhida aparentemente mais promissora para o uso na produção de cerveja com sabores característicos. Apesar desta estirpe já ter demonstrado perfil de consumo de açúcares elevado durante a fermentação alcoólica, a capacidade de produção de etanol por si só não é um fator determinante do sucesso da levedura para produção de cerveja. Sendo assim, a WL_411 se apresenta como potencial também para produzir voláteis positivos em quantidades relevantes e uma quantidade de 4-vinilguaiacol aparentemente baixa. Em vinhos, a introdução de híbridos entre espécies *Saccharomyces* comerciais e estirpes não convencionais demonstrou que o material genético de leveduras não convencionais pode impactar o perfil de aromas e sabores de forma favorável e criar diversidade entre os estilos da bebida (Bellon et al., 2011). Em cervejas, a variação genética entre as estirpes comerciais é ainda menor que no vinho. A diversificação de estilos passa pela descoberta de estirpes capazes de produzir novos perfis de metabolitos secundários (Mertens et al., 2015).

O desempenho das leveduras não convencionais pode estar relacionado com sua origem de recolha. Como constatado no gráfico da Figura 3.5, o perfil volátil gerado pelas estirpes não convencionais após fermentação do mosto cervejeiro mostrou-se bastante distinto. As quatro estirpes de LSF isoladas foram recolhidas de superfícies de casco de maturação, descritas na Tabela 3.6,

Tabela 3.6 – Superfícies de recolhas das estirpes LSF selecionadas para fermentação de mosto cervejeiro.

	Descrição da superfície de recolha	Estirpes coletadas
Superfície A	Rolha de casco de madeira originário da maturação de <i>peated whisky</i> , em uso para maturação de cerveja tipo belga	WL_221, WL_222
Superfície B	Exterior de casco de madeira originário da maturação de vinho italiano, em uso para maturação de cerveja tipo <i>weiss</i>	WL_312, WL_411

Da superfície A, os isolados WL_221 e WL_222 apresentaram como resultado da fermentação de mosto cervejeiro, produtos com baixo teor alcoólico e perfis aromáticos com poucos pontos positivos. Apesar de produzirem alguns compostos em concentrações interessantes, como o caprilato de etilo e o caproato de etilo, o volátil que se destaca é o 4-vinilguaiacol, que é caracterizado por um aroma indesejado. Dos isolados da superfície B, a WL_411 fermentou uma cerveja com perfil volátil superior às outras não convencionais, com concentrações comparáveis às comerciais. A WL_312, ainda que no geral não se aproxime dos resultados das leveduras comerciais, tem uma capacidade de produção de etanol interessante e um perfil volátil positivo. As diferenças entre as superfícies A e B podem estar relacionadas ao material. Apesar de ambas virem de cascos de maturação, a madeira da superfície B pode ter sido mais propícia que a rolha para o crescimento de leveduras capazes de fermentar o mosto cervejeiro.

Quanto à levedura selvagem, seu desempenho na produção de metabolitos foi muito baixo, o que indica que o tecido vegetal das rosas não seja uma boa fonte de leveduras para a finalidade de produção de cerveja, podendo ser priorizados os tecidos vegetais de frutos pela maior presença de açúcares.

3.3.2 Análise sensorial

Com vista à metodologia de análise de Friedman por *ranking* de comparação pareada (secção 2.6.2.2), descrita por Meilgaard et al. (1999), foi realizada uma análise sensorial com o painel de provadores SensoMarEs. Na etapa de definição de descritores, cada provador sugeriu possíveis descritores para o acetato de isoamilo após provar uma amostra do composto. Todas as sugestões foram anotadas e as 3 que apareceram mais vezes entre as respostas foram escolhidas como descritores do acetato de isoamilo. Foram eles: frutado, banana e doce. Foi adicionado à lista o descritor pêra, retirado da literatura (Burdock, 2010), não presente nas sugestões do painel. Ao fim, um total de 4 descritores para o acetato de isoamilo foram apresentados ao painel com novas amostras do composto para reconhecimento e assimilação dos descritores.

Passou-se para a etapa de análise das amostras de cerveja fermentada por leveduras não convencionais. As amostras selecionadas para o teste, WL_312, WL_411 e W_Rosas, e os controlos foram servidos em pares aos provadores. Em cada par apresentado, foi pedido que escolhessem a cerveja que apresentava características mais intensas de acetato de isoamilo. Todas as combinações entre amostras e controlos foram servidas. Em cada resposta (par de amostras), atribuiu-se dois tipos de pontuação. À amostra identificada como a mais intensa em acetato de isoamilo foi atribuído 2 pontos. À outra amostra dentro do par, foi atribuído 1 ponto. A soma dos pontos de cada amostra dados pelas respostas de cada provador gerou uma pontuação final relacionada à quantidade de acetato de isoamilo presente nas cervejas. A partir dessa pontuação, é possível comparar e relacionar os resultados da análise sensorial e a concentração de acetato de isoamilo obtida por GC-FID (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Pontuação resultante da metodologia de ranking de concentração acetato de isoamilo pelo painel sensorial, concentrações do acetato de isoamilo de acordo com a cromatografia gasosa e teor de sólidos solúveis final em °Brix.

Amostra	Pontuação	Concentração (mg/l)	°Brix
WL_312	89	0.68	7.04
WL_411	86	2.02	6.80
W_Rosas	112	0.36	10.95
Ctrl_1	98	4.62	5.79
Ctrl_0	95	1.62	5.79

Para efeitos de comparação, os resultados de pontuação sensorial foram dispostos numa escala de intensidade, com as respetivas concentrações obtidas por GC-FID e teor de sólidos solúveis, que pode ser vista na Figura 3.6.

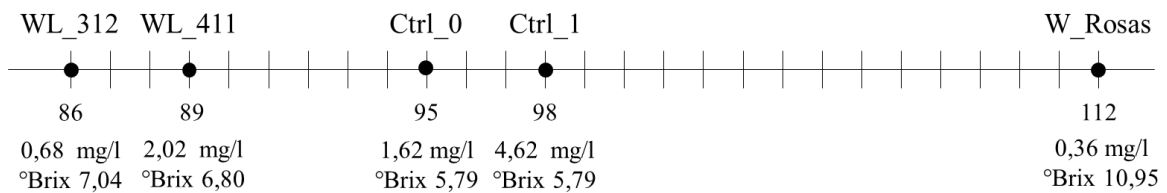


Figura 3.6 - Escala comparativa de intensidade construída a partir da pontuação sensorial de concentração de acetato de isoamilo nas cervejas fermentadas pelas leveduras não convencionais WL_312, WL_411 e W_Rosas e nos controlos Ctrl_0 (Lager) e Ctrl_1 (Lager com adição de 3 mg/l de acetato de isoamilo)

Ao comparar o *ranking* de pontuação obtido pela análise sensorial do acetato de isoamilo com as concentrações do mesmo composto obtidas pela cromatografia gasosa, percebe-se que as metodologias não alcançaram resultados correspondentes entre si. Pela análise sensorial, a cerveja fermentada pela estirpe W_Rosas foi a que apresentou as características do descritor com mais intensidade, enquanto que pelo GC esta é a que possui menor concentração do volátil em questão. Uma possível causa dessa resposta sobrevalorizada é o fato de pelo menos um dos descritores utilizados para caracterizar o acetato de isoamilo ser comum a mais de um composto. Por exemplo, o descritor “doce” também é associado à sacarose e ao extrato de malte (Burdock, 2010). Por se tratar de uma levedura com baixo potencial fermentativo, o sabor doce pode ter sido identificado de forma mais intensa devido a alta concentração de açúcares na cerveja.

A escala de intensidade apresentada também não gerou um distanciamento significativo entre os dois controlos. Considerando que o Ctrl_1 possui quase o triplo da concentração do Ctrl_0 e está acima do limite médio de deteção sensorial de 1.1 mg/l (Castro & Ross, 2015), era esperado que nessas duas amostras as diferenças fossem mais bem quantificadas. A utilização de pelo menos um descritor associado a mais compostos além do acetato de isoamilo também pode ser uma possível causa para esse problema. Nesse caso, o descritor “doce” pode ter sido identificado em intensidades subvalorizadas pelo fato da cerveja em questão possuir um teor de açúcares solúveis mais baixo.

Em relação às estirpes não convencionais, a percepção de intensidade dos descritores apresentados para o acetato de isoamilo parece estar mais relacionada ao sabor doce da cerveja do que à concentração do composto. Verificou-se que as amostras fermentadas pela estirpe WL_411 foram caracterizadas pelo painel como a de menor intensidade do padrão

volátil, enquanto a análise instrumental mostra que os níveis do composto são comparáveis ao de cervejas comerciais. Por outro lado, as amostras fermentadas por WL_312 e W_Rosas apresentaram respostas sensoriais bastante distintas dentro da escala obtida, enquanto os resultados de GC indicaram concentrações baixas e pouco diferenciadas.

Para aplicações futuras deste método, essas limitações podem ser contornadas com a adequação de descritores, com utilização de outros métodos para seleção dos mesmos. A análise sensorial descritiva se baseia no uso consensual pelo painel de uma lista comum de descritores. A seleção dos descritores deve referir de forma adequada à percepção das propriedades sensoriais do produto em questão. Por outro lado, a verbalização de propriedades sensoriais é questionável, visto que definições de palavras não se encaixam perfeitamente aos conceitos e experiências pessoais (Giboreau et al., 2007). A tarefa de gerar descritores deve focar nas diferenças entre produtos, neste caso a amostra de acetato de isoamilo a 32 mg/l e o controle, evitando a geração de uma lista generalizada de adjetivos. Apresentar uma lista de descritores possíveis para o painel na etapa de definição destes pode influenciar a escolha dos provadores, mas em alguns estudos se torna necessário (Murray, Delahunty, & Baxter, 2001). Neste caso, pode ajudar a restringir e evitar termos genéricos como “doce”. Com base nas referências bibliográficas é possível estabelecer um critério de relevância e manter apenas os termos diretamente relacionados ao padrão na lista final de descritores. No caso do acetato de isoamilo, o descritor “banana” poderia ser um representante promissor se não estivesse associado ao “doce”.

O método de análise sensorial por *ranking* de comparação pareada proposto nesse estudo mostrou-se simples e não exigiu uma etapa de treino do painel, mas fica evidente que testes mais extensos são necessários para que se tirem conclusões concretas. Num sistema de desenvolvimento de levedura cervejeira, este tipo de metodologia pode ser interessante caso se consiga estabelecer uma correlação entre o perfil de análise instrumental e o perfil de análise sensorial. Dessa forma, ambas as análises podem ser utilizadas de forma independente para alcançar um mesmo resultado. No desenvolvimento de produto, as medições instrumentais também podem ser acopladas a técnicas de análise sensorial para tentar determinar os voláteis responsáveis por algumas sensações de sabor. Essa abordagem pode ser útil se certas características de aroma precisarem ser aprimoradas ou removidas. Enquanto os dados recolhidos neste teste são insuficientes para determinar se a correlação entre as duas análises é de facto possível, outros estudos com diferentes produtos alimentares

apontam para essa possibilidade (Chambers IV & Koppel, 2013; López-lópez, Sánchez, Cortés-delgado, De, & Montaña, 2018).

4 Conclusões e perspectivas futuras

A cerveja é um produto fermentado resultante de diversas reações metabólicas complexas decorrentes da interação da levedura com os compostos presentes no mosto e a variação de qualquer uma das matérias primas pode gerar grandes diferenças no final da fermentação. Uma das formas de alterar a matriz de compostos aromáticos da cerveja é utilizar diferentes tipos de levedura. Com o crescente interesse por parte do consumidor por cervejas artesanais e diferenciadas, tornou-se pertinente explorar a capacidade metabólica de leveduras alternativas às estirpes *Saccharomyces* usuais.

Os parâmetros de controlo mostraram que o perfil de consumo de açúcar é uma forma simples e eficaz tanto de acompanhar as características cinéticas da fermentação quanto de determinar o fim do processo. Os resultados observados indicam que leveduras não convencionais também apresentam o potencial de metabolizar os compostos presentes no mosto cervejeiro com eficiência. A análise instrumental com método de HS/SPME GC-FID foi eficaz. Todos os compostos analisados foram identificados em todas as cervejas. De modo geral, foi possível atingir bons resultados de quantificação dos metabolitos secundários, com melhorias a serem implementadas na etapa de calibração. Os resultados dessa análise não evidenciaram nenhuma tendência de fermentação com perfil volátil de destaque. O que se conclui do gráfico de PCA é que as estirpes comerciais e não convencionais apresentam perfis aromáticos distintos, sendo que as comerciais possuem características positivas mais evidentes. A dispersão das estirpes não convencionais pelo gráfico é consequência das diferenças entre as concentrações de voláteis identificadas em suas respectivas cervejas. Por terem perfis diferenciáveis, essas características do metabolismo das leveduras podem ser usadas para identificar as possíveis origens das estirpes não convencionais. Para a caracterização do perfil volátil por análise sensorial feita para quantificação do composto acetato de isoamilo se faz necessária a remodelação da etapa de definição de descritores. Os dados coletados neste estudo não são suficientes para que sejam feitas conclusões relacionadas à correlação entre a análise instrumental e análise sensorial dos metabolitos voláteis presentes na cerveja.

Para trabalhos futuros, a metodologia base construída neste trabalho pode ser ramificada em linhas de investigação diferentes. Por um lado, seria pertinente averiguar a hipótese de correlacionar a resposta da análise sensorial com os resultados da metodologia

de cromatografia gasosa apresentada. Por outro, é possível explorar a diversificação de estirpes analisadas, assim como a variação das condições de fermentação, para ampliar o estudo sobre os parâmetros cinéticos das leveduras. Esses dois caminhos de pesquisa são importantes para a elucidação sobre o metabolismo de diferentes leveduras e o potencial de produção de cervejas inovadoras com valor associado.

5 Bibliografia

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Alpendurada, M. de F. (2000). Solid-phase microextraction : a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 889, 3–14.
- Bamforth, C. W. (2000). Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. *Chem. Educator*, 5(3), 102–112. <https://doi.org/10.1007/s00897000378a>
- Bellon, J. R., Eglinton, J. M., Siebert, T. E., Pollnitz, A. P., Rose, L., Lopes, M. D. B., & Chambers, P. J. (2011). Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 603–612. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3294-3>
- Blumberg, L. M. (2012). Theory of Gas Chromatography. In *Gas Chromatography* (pp. 19–78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>
- Boulton, C. (2013). *Encyclopaedia of brewing*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Boulton, C., & Quain, D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science Ltd.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., & Brookes, P. A. (2004). Metabolism of Wort by Yeast. In *Brewing: Science and Practice* (pp. 401–468). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1799-3_6
- Burdock, G. A. (2010). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*.
- Castro, L. F., & Ross, C. F. (2015). Determination of flavour compounds in beer using stir-bar sorptive extraction and solid-phase microextraction. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(August 2014), 197–203. <https://doi.org/10.1002/jib.219>
- Chambers IV, E., & Koppel, K. (2013). Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules*, 18, 4887–4905.

<https://doi.org/10.3390/molecules18054887>

Chitwood, R. L., Pangbornt, R. M., & Jennings, W. (1983). GC/MS and Sensory Analysis of Volatiles from Three Cultivars of Capsicum. *Food Chemistry*, *11*, 201–216.

[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90103-6)

Clapperton, J. F. (1973). Derivation of a Profile Method for Sensory Analysis of Beer Flavour. *Journal of the Institute of Brewing*, *79*(6), 495–508.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03571.x>

Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F. R. F., Vanderhaegen, B., Delvaux, F. R. F., Benoot, K., ... Coghe, S. (2004). Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 602–608. <https://doi.org/10.1021/jf0346556>

De Francesco, G., Sannino, C., Sileoni, V., Marconi, O., Filippucci, S., Tasselli, G., & Turchetti, B. (2018). Mrakia gelida in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiology*, *76*(June), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.018>

Deák, T. (2007). *Handbook of Food Spoilage Yeast*. CRC Press.

<https://doi.org/10.1201/9781420044942>

Donadini, G., & Porretta, S. (2017). Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Research International*, *91*, 183–198.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.043>

Du, X., Plotto, A., Baldwin, E., & Rouseff, R. (2011). Evaluation of Volatiles from Two Subtropical Strawberry Cultivars Using GC À Olfactometry , GC-MS Odor Activity Values , and Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 12569–12577. <https://doi.org/10.1021/jf2030924>

Engelking, C. (2018). Move Over Hops, Yeast Can Give IPAs Their Signature Flavor.

Retrieved January 19, 2020, from

<https://www.discovermagazine.com/technology/move-over-hops-yeast-can-give-ipas->

their-signature-flavor#.XdK7u1f7TtR

- Eßlinger, H. M. (2009). Fermentation, Maturation and Storage. In *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets* (pp. 207–224). Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.federation.edu.au/book/10.1002/9783527623488;jsessionid=1A390E453FC6312DCD473C42FAFF9CF2.f01t01>
- Eßlinger, H. M., & Narziß, L. (2010). Beer. In *Ullmann's Encyclopaedis of Industrial Chemistry* (pp. 177–221). <https://doi.org/10.1002/14356007.a03>
- Estela-Escalante, W. D., Rosales-Mendoza, S., Moscosa-Santillán, M., & González-Ramírez, J. E. (2016). Evaluation of the fermentative potential of *Candida zemplinina* yeasts for craft beer fermentation. *Institute of Brewing and Distilling*, 122, 530–535. <https://doi.org/10.1002/jib.354>
- Funk, A. (2019). Craft Beer's Quest For The Funky Flavors of Wild Yeast. Retrieved January 19, 2020, from https://www.discovermagazine.com/planet-earth/craft-beers-quest-for-the-funky-flavors-of-wild-yeast#.XdK6_lf7TtR
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>
- Gallone, B., Steensels, J., Pahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., ... Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Garcia, M. M. E. (2017). *Produção de cerveja : Utilização de estirpes não- convencionais em co-fermentação com Saccharomyces para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja*. Universidade de Lisboa.
- Giboreau, A., Dacremont, C., Egoroff, C., Guerrand, S., Urdapilleta, I., Candel, D., & Dubois, D. (2007). Defining sensory descriptors: Towards writing guidelines based on terminology. *Food Quality and Preference*, 18, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.12.003>

- Guyot-Declerck, C., Fran, N., Ritter, C., Govaerts, B., & Collin, S. (2005). Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food Quality and Preference*, *16*(2), 157–162.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.04.007>
- Hall, M. L. (1995). Brew by the numbers: add up what's in your beer. *Zymurgy Summer*, 54–61.
- Hill, P. G., & Smith, R. M. (2000). Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, *872*(1–2), 203–213.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01307-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01307-2)
- Jackson, M. (2009). *Cerveja* (2nd ed.). Zahar.
- Karabín, M., Jelínek, L., Kotrba, P., Cejnar, R., & Dostálek, P. (2018). Enhancing the performance of brewing yeasts. *Biotechnology Advances*, *36*(3), 691–706.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.014>
- Krottenthaler, M., Back, W., & Zarnkow, M. (2009). Wort Production. In *Handbook of Brewing. Processes, Technology, Markets*.
- Krottenthaler, M., Back, W., Zarnkow, M., & Esslinger, H. (2009). Wort Production. In *Handbook of brewing: Processes, Technology, Markets*.
- Kunze, W. (2004). *Technology Brewing and Malting*. Berlin: VLB Berlin.
- Livens, S. (2016). Beer: Fermentation. In *Encyclopaedia of Food and Health* (pp. 339–344). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00059-3>
- López-lópez, A., Sánchez, A. H., Cortés-delgado, A., De, A., & Montañó, A. (2018). Relating sensory analysis with SPME-GC-MS data for Spanish-style green table olive aroma profiling. *LWT - Food Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.058>
- Matoulková, D., Kopecká, J., & Kubizniaková, P. (2013). Brewing Microbiology – Wild Yeasts and Methods of Their Detection. *Kvasny Prumysl*, *59*, 246–257.

<https://doi.org/10.18832/kp2013025>

- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques* (3rd ed.).
- Meilgaard, M., Dalglish, C. E., & Clapperton, J. F. (1979). Beer flavour terminology. *Journal of the Institute of Brewing*, 85, 38–42.
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V., De Rouck, G., Aerts, G., & Verstrepen, K. J. (2015). A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8202–8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>
- Meussdoerffer, F. G. (2009). *A Comprehensive History of Beer Brewing. Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*.
<https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch1>
- Meussdoerffer, F., & Zarnkow, M. (2009). Starchy Raw Materials. In *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets* (pp. 43–83).
<https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch2>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Murray, J. M., Delahunty, C. M., & Baxter, I. A. (2001). Descriptive sensory analysis: Past, present and future. *Food Research International*, 34(6), 461–471.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00070-9)
- Nelson, M. (2005). *THE BARBARIAN'S BEVERAGE - A History of Beer in Ancient Europe*. Routledge.
- Oliveira, A. P., Silva, L. R., Andrade, P. B., Valentão, P., Silva, B. M., Pereira, J. A., & Guedes de Pinho, P. (2010). Determination of low molecular weight volatiles in *Ficus carica* using HS-SPME and GC/FID. *Food Chemistry*, 121(4), 1289–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.054>

- Oliver, Garrett. (2011). *The Oxford companion to beer*. (Garret Oliver, Ed.). Oxford University Press.
- Parker, D. K. (2012). Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research* (pp. 133–158). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-051-5.50006-7>
- Pawliszyn, J. (2012). Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction* (pp. 13–60). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4>
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Santos, L. H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*, *1121*(2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.013>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). 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*, *98*(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Pope, G. A., Mackenzie, D. A., Defernez, M., Aroso, M. A. M. M., Fuller, L. J., Mellon, F. A., ... Roberts, I. N. (2007). Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts. *Yeast*, *24*(May), 667–679. <https://doi.org/10.1002/yea.1499>
- Powell, C. D., Quain, D. E., & Smart, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Research*, *3*, 149–157. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00002-3)
- Reto, M., Figueira, M. E., Filipe, H. M., & Almeida, C. M. M. (2007). Analysis of vitamin K in green tea leafs and infusions by SPME-GC-FID. *Food Chemistry*, *100*(1), 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.016>
- Silva, G. A. da, Augusto, F., & Poppi, R. J. (2008). Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food Chemistry*, *111*(4), 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.022>

- Silva, G. A. da, Bolini, H. M. A., Poppi, R. J., Maretto, D. A., Teófilo, R. F., & Augusto, F. (2012). Correlation of quantitative sensorial descriptors and chromatographic signals of beer using multivariate calibration strategies. *Food Chemistry*, *134*(3), 1673–1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.080>
- Simpson, W. J. (2016). Sensory Analysis in the Brewery. In *Brewing Materials and Processes* (pp. 257–289). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799954-8.00013-7>
- Stewart, G. G. (2016). Beer: Raw Materials and Wort Production. In *Encyclopaedia of Food and Health* (pp. 355–363). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00058-1>
- Šuklje, K., Carlin, S., Stanstrup, J., Antalick, G., Blackman, J. W., Meeks, C., ... Vrhovsek, U. (2018). Unravelling wine volatile evolution during Shiraz grape ripening by untargeted HS-SPME-GC × GC-TOFMS. *Food Chemistry*, *277*, 753–765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.135>
- Sun, X., Liu, L., Zhao, Y., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., & Zhan, J. (2016). Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry*, *192*, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.107>
- Taylor, G. T., & Marsh, A. S. (1984). Mygp + copper, a medium that detects both *saccharomyces* and non- *saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, *90*, 134–145.
- The Brewers of Europe. (2018). *Beer Statistics*.
- The Brewers of Europe. (2019). *European Beer Trends - Statistics Report*.
- Thorne, R. S. . (1968). Some observations on yeast mutation during continuous fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *74*, 516–524. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1968.tb03167.x>
- Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Yeast. In *Encyclopaedia of Food and Health* (pp. 593–599). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00762-5>

- Tschoeke, I. C. P., Henrique, J. F. da S., Cavalcanti, J. V. F. L., Gomes, G. M. S., & Souza, T. P. C. (2017). Modelagem cinética da fermentação da cerveja. *REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA*, 7(2), 223–227.
- Van Der Aa Kühle, A., & Jespersen, L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 205–213.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5)
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids : Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110–118.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 105). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Wan mustapha, W., Chun Wai, H., Maskat, M., & Osman, H. (2008). Relating Descriptive Sensory Analysis to Gas Chromatography / Mass Spectrometry of Palm Sugars Using Partial Relating Descriptive Sensory Analysis to Gas Chromatography / Mass Spectrometry of Palm Sugars Using Partial Least Squares Regression. *ASEAN Food Journal*, 15, 35–45.

Anexos

Anexo 1: Tabelas de calibração do GC-FID

Áreas médias por composto nas diferentes concentrações propostas:

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	4542319.43	39450	115.14	0.08
Acetato de etilo	433419.34	162.36	2669.49	1.78
Isobutanol	477899.61	208.08	2296.71	1.53
Butanol	1212802.21	810	1497.29	1.00
Álcool isoamílico	1227369.83	364.05	3371.43	2.25
Acetato de isoamilo	892265.54	15.77	56579.93	37.79
Caproato de etilo	311129.03	1.96	158739.30	106.02
Álcool feniletílico	5039699.73	459	10979.74	7.33
Caprilato de etilo	1367803.64	1.95	701437.76	468.47
Acetato feniletílico	1183687.47	4.64	255105.06	170.38

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	4609531.73	39450	116.84	0.08
Acetato de etilo	275674.22	90.2	3056.26	1.97
Isobutanol	298961.78	160.6	1861.53	1.20
Butanol	1259771.39	810	1555.27	1.00
Álcool isoamílico	720970.61	202.25	3564.75	2.29
Acetato de isoamilo	556625.78	8.76	63541.76	40.86
Caproato de etilo	208587.77	1.09	191364.92	123.04
Álcool feniletílico	3119374.79	255	12232.84	7.87
Caprilato de etilo	882856.00	1.08	817459.26	525.60
Acetato feniletílico	773129.41	2.58	299662.56	192.68

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	5345827.86	39450	135.51	0.08
Acetato de etilo	175754.85	36.08	4871.25	2.86
Isobutanol	177758.76	64.27	2765.81	1.63
Butanol	1377643.61	810	1700.79	1.00
Álcool isoamílico	328034.64	80.9	4054.82	2.38
Acetato de isoamilo	269570.40	3.5	77020.12	45.28
Caproato de etilo	107936.44	0.43	251014.97	147.59
Álcool feniletílico	1602207.29	102	15707.91	9.24
Caprilato de etilo	392670.73	0.43	913187.75	536.92
Acetato feniletílico	404614.97	1.03	392830.07	230.97

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	5988654.79	39450	151.80	0.08
Acetato de etilo	168020.12	18.04	9313.75	4.75
Isobutanol	135774.66	32.12	4227.11	2.15
Butanol	1589241.40	810	1962.03	1.00
Álcool isoamílico	221957.80	40.45	5487.21	2.80
Acetato de isoamilo	166208.48	1.75	94976.27	48.41
Caproato de etilo	69677.91	0.22	316717.79	161.42
Álcool feniletílico	937376.71	51	18379.94	9.37
Caprilato de etilo	219701.07	0.22	998641.23	508.98
Acetato feniletílico	225232.85	0.52	433140.10	220.76

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	4704150.33	39450	119.24	0.06
Acetato de etilo	72429.71	9.02	8029.90	4.25
Isobutanol	63202.68	16.06	3935.41	2.09
Butanol	1528711.91	810	1887.30	1.00
Álcool isoamílico	110680.79	20.23	5471.12	2.90
Acetato de isoamilo	85398.19	0.88	97043.39	51.42
Caproato de etilo	36954.31	0.11	335948.28	178.00
Álcool fenilético	530325.74	25.5	20797.09	11.02
Caprilato de etilo	109756.50	0.11	997786.34	528.68
Acetato fenilético	118203.33	0.26	454628.20	240.89

Composto	Área média (A)	Concentração (C) (mg/l)	A/C	F
Etanol	4018446.82	39450	101.86	0.05
Acetato de etilo	19616.42	1.8	10898.01	5.81
Isobutanol	17378.16	3.21	5413.76	2.88
Butanol	1520293.58	810	1876.91	1.00
Álcool isoamílico	27416.74	4.05	6769.57	3.61
Acetato de isoamilo	21611.38	0.18	120063.24	63.97
Caproato de etilo	10399.86	0.02	519992.95	277.05
Álcool fenilético	145962.52	5.1	28620.10	15.25
Caprilato de etilo	25023.39	0.02	1251169.53	666.61
Acetato fenilético	33427.62	0.05	668552.35	356.20
4-Vinilguaiacol	52251.99	98.00	533.18	0.35

Fator de resposta médio para cada composto:

Composto	RT	F médio	Desvio Padrão
Etanol	4.38	0.07	0.01
Acetato de etilo	6.88	3.57	1.48
Isobutanol	7.61	1.91	0.54
Butanol	8.37	1.00	0.00
Álcool isoamílico	9.82	2.71	0.47
Acetato de isoamilo	12.16	47.95	8.46
Caproato de etilo	14.45	165.52	55.19
Álcool feniletílico	18.02	10.01	2.62
Caprilato de etilo	18.26	539.21	61.17
Acetato feniletílico	20.22	235.31	59.03
4-Vinilguaiacol	21.88	0.35	-

Anexo 2: Lista de sugestões de descritores para o acetato de isoamilo

Descritores sugeridos	Número de citações
Doce	13
Frutado	7
Banana	7
Diluído	3
Pastilha elástica	3
Rebuçado	3
Citrino	2
Ácido	2
Caramelo	2
Fresco	1
Maçã	1
Mel	1
Sugo	1
Caramelo	1
Adstringente	1
Madeira	1
Whisky	1
Sidra	1
Remédio	1
Cola universal	1

Anexo 3: Fichas de resposta da análise sensorial

Sessão 1

Tipo de amostra: Cerveja

Diferença: Concentração de acetato isoamílico

Descritores: banana, pera, frutado, doce

Instruções:

1. Prove o primeiro par de amostras e identifique qual das duas apresenta características dos descritores mais intensas. Marque com um X ao lado do código da amostra.
2. Prossiga até que os 5 pares sejam avaliados. Limpe o palato com água conforme achar necessário.

É importante que não haja interações com os demais provadores para evitar influências ou sugestões que comprometam os resultados.

Par nº	Amostras	
1	<input type="checkbox"/> 451	132 <input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/> 369	855 <input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/> 557	313 <input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/> 788	576 <input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/> 232	791 <input type="checkbox"/>

Sessão 2

Tipo de amostra: Cerveja

Diferença: Concentração de acetato isoamílico

Descritores: banana, pera, frutado, doce

Instruções:

1. Prove o primeiro par de amostras e identifique qual das duas apresenta características dos descritores mais intensas. Marque com um X ao lado do código da amostra.
2. Prossiga até que os 5 pares sejam avaliados. Limpe o palato com água conforme achar necessário.

É importante que não haja interações com os demais provadores para evitar influências ou sugestões que comprometam os resultados.

Par nº	Amostras	
1	<input type="checkbox"/> 451	132 <input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/> 369	855 <input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/> 557	313 <input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/> 788	576 <input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/> 232	791 <input type="checkbox"/>