UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**SCARLATE NOBRE LINHARES**

# CARACTERIZAÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cariocanus* G01 COMO UM NOVO FERMENTO CERVEJEIRO

RIO DE JANEIRO

2025

Scarlate Nobre Linhares

# CARACTERIZAÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cariocanus* G01 COMO UM NOVO FERMENTO CERVEJEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

N755c

Nobre Linhares, Scarlate
Caracterização da levedura Saccharomyces cariocanus G01 como um novo fermento cervejeiro / Scarlate Nobre Linhares. -- Rio de Janeiro, 2025.
115 f.

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), 2025.

1. Saccharomyces cariocanus. 2. Leveduras. 3. Cerveja. 4. Imobilização de leveduras. I. Lemos Miguel, Marco Antônio, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro**
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA)**

**REALIZADA EM: 15 de outubro de 2025**

**CANDIDATO(A): SCARLATE NOBRE LINHARES**

**BANCA EXAMINADORA:** Prof.ª Dr.ª Eliana Barreto Bergter (Presidente)
Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanzza (Membro Externo)
Prof.ª Dr.ª Karla Rodrigues Miranda (Membro interno)
Prof.ª Dr.ª Raquel Regina Bonelli (Titular/Revisor)

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** "***Caracterização da levedura S. cariocanus G01 como um novo fermento cervejeiro***".

**LOCAL:** Anfiteatro do IMPG

**HORA DE INÍCIO:** 10:00 horas

Em sessão pública, após a exposição oral do conteúdo referente ao trabalho de dissertação de Mestrado, o(a) candidato(a) foi arguido pelos membros da Banca. Após deliberação, a banca avaliadora resolve:
(X) aprovar.
( ) aprovar, condicionado à(s) exigência(s) formulada(s) pela Banca*** (Resolução CEPG N° 1 de 01/12/2006, Artigo 57, Parágrafo 3°)
( ) reprovar.

Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, orientador(es), candidato(a) e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia).

Rio de Janeiro, 15 de outubro de 2025.

*Prof.ª Dr.ª Eliana Barreto Bergter* (Presidente da Banca)

*Prof. Dr. Marco Antonio Lemos Miguel* (Orientador)

*Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanzza* (Titular externo)

Candidato(a): Scarlate Nobre Linhares

*Prof.ª Dr.ª Karla Rodrigues Miranda* (Titular interno)

Profa. Dra. Alessandra D'Almeida Filardy
Coordenadora do PPG-Microbiologia

*Profª. Drª. Raquel Regina Bonelli* (Titular/Revisor)

*** A(s) exigência(s) foi(foram) cumprida(s) e aprovada(s) pelo Presidente da Banca em ____/____/____.
_____(assinatura do presidente).

Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ. Centro de Ciências da Saúde (bloco J), Cidade Universitária, Sala J-11-012. Tel. 55 (21) 3938-6734, posgrad@micro.ufrj.br

## AGRADECIMENTOS

À Deus e ao meu intercessor São Judas Tadeu, a quem acredito com todas as forças serem os responsáveis por me manter de pé todas as vezes que me senti sem esperanças. Agradeço também a todos os santos, São Bento, São Carlo Acutis e a Nossa Senhora Desatadora dos Nós. Na oração encontro calma e segurança, sabendo que tudo posso e nada é impossível.

Aos meus pais Neusa e Fábio, por todo apoio e investimento. Por sempre me proporcionarem o melhor. Deus me abençoou quando decidiu que eu seria a filha de vocês. Obrigado por tudo!

À minha madrinha Modesta, que mesmo sem ter filhos, sabe perfeitamente o que é a maternidade. A considero como minha segunda mãe e avó. Muito obrigado por todas as orações, incentivos, cuidado e amor!

Aos meus irmãos Bernardo e João, desejo um futuro brilhante para os dois, que se sintam sempre realizados e felizes!

Ao meu namorado Gustavo, que durante toda a jornada acadêmica me ajudou a crescer, estando presente em todas as alegrias, aprovações, nos choros e na ansiedade de todas as provas e apresentações. Suas palavras sempre me confortam e estar ao seu lado é estar em casa. Obrigado por ter me acompanhado desde a busca do meu primeiro estágio de Iniciação Científica na UFRJ, tudo realmente mudou depois de vivenciar o mundo da pesquisa. Obrigado por sempre acreditar em mim, por me levantar e não deixar que pensamentos ruins me tomassem. Você tem um lindo futuro! Como eu escrevi no TCC: “o mundo precisa te conhecer”.

Ao meu orientador Professor Marco Miguel, que durante todos esses anos acreditou em mim, abriu as portas do seu laboratório sem me conhecer e sem saber que estar ali já estava nos meus planos. Obrigado pelas conversas que ajudaram a amenizar a ansiedade e pelas palavras de apoio. Sentar ao lado do senhor e escutá-lo é sentir como se todos os problemas pudessem ser facilmente resolvidos. Obrigado por ajudar não só a desenvolver este trabalho, mas também no meu desenvolvimento pessoal.

Ao professor Andrew Macrae, que durante o mestrado e iniciação científica me acolheu em seu laboratório e me ajudou em etapas cruciais do meu projeto com a importantíssima colaboração do SENAI. Muito Obrigado por batalhar pelo meu primeiro artigo!

Ao Antônio, que sempre esteve presente, ensinando, compreendendo e acompanhando cada passo dos meus experimentos. Que esteve ao lado quando eles davam certo e errado.

Nunca irei esquecer das vezes que chegava no fluxo para fazer um “check-list” do dia, como se fosse uma ajuda divina. Obrigado por estar na iniciação científica e no mestrado.

Ao professor Allen Hagler, pela bioprospecção de leveduras nativas e tornar possível esta dissertação com a estirpe *Saccharomyces cariocanus* G01. Agradeço pelas conversas que foram essenciais para o melhor entendimento do isolado e do potencial biotecnológico desta levedura.

Ao Dr. José Roberto pelos estudos dedicados a leveduras cervejeiras. Sou grata pela oportunidade e orientação no início da minha jornada científica, assim como pela disponibilidade em esclarecer todas as dúvidas sobre as leveduras derivativas utilizadas no estudo.

Às amigas do laboratório Agnes, Dani, Giovanna, Jéssika, Laura, Raquel e Stella por compartilharem momentos de alegria e comidas gostosas. À Agnes por todos esses anos ser extremamente solícita, paciente e companheira, por sempre tirar todas as minhas dúvidas a qualquer momento; à Dani pela alegria contagiante desde o início, pela doçura e por me fazer lembrar da minha família com seus gostos e sotaque; à Giovanna por toda a ajuda e por ter planejado meu aniversário de trinta anos; à Jéssika pelas palavras de incentivo, pelas dicas de shows, pelas doações de Kombucha que fizeram toda a minha família gostar, pela companhia no BRT; à Laura por ter me ensinado a ensinar, por ter entregado ao laboratório uma menção honrosa com parte deste trabalho, pelos presentes abençoados e pelas conversas edificantes; à Raquel por toda a troca de conhecimentos; à Stella pela ajuda e aos momentos de descontração com suas respostas engraçadas. Obrigada a todas pela dinâmica maravilhosa no laboratório, pelo espírito de equipe e pela preocupação que temos uma com as outras.

Ao João Ricardo por todas as horas de aprendizado e paciência para lidar com alguém aprendendo bioinformática do zero, por ter praticamente me alfabetizado em análise genômica, pelo artigo científico e por todas as conversas diárias desde a iniciação científica. Assim como nunca irei esquecer de quando você me ajudou a colar folha por folha e formar meu primeiro pôster de apresentação da graduação. Sempre muito solícito e extremamente inteligente, alunos como você são raros. A ciência só ganha com a sua presença!

À Sheila Silva pela ajuda desde o início das preparações para o sequenciamento da estirpe e na confecção do artigo. Também, por todas as vezes que estive desesperada com os experimentos que faltavam e você sempre me entregava as melhores palavras para me acalmar.

Assim como o João, você é um exemplo de cientista e ter vocês para conversar foi essencial em toda essa jornada!

Aos alunos do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana, Duda, Mayara, Luísa, Íris e Vicente pelas tardes de conversar sobre vários assuntos nos intervalos dos experimentos. Também agradeço ao Renato, que desde a iniciação científica foi prestativo, atencioso e generoso comigo e com todos outros alunos.

À minha amiga e recém professora Luana França, por todas as nossas conversas e principalmente nesses últimos anos em que nossa amizade tem se fortalecido mesmo a distância. Você é uma pessoa incrível, tenho muito orgulho de toda sua trajetória acadêmica. Você merece o mundo de coisas boas!

À banca examinadora composta pelos professores Ana Maria Mazotto, Eliana Barreto, Fábio de Araujo, Karla Miranda, Raquel Bonelli e Sérgio Fracalanzza. Agradeço a todos pela atenção e carinho ao avaliar este trabalho. Foi uma honra contar com a experiência de cada um de vocês para aprimorar esta pesquisa.

Ao PPG-Micro por tornar essa e todas as dissertações e teses possíveis graças ao excelente programa, pelas aulas lecionadas por professores extremamente qualificados que engrandeceram a minha jornada. Também gostaria de agradecer os funcionários da secretaria, Eduardo e Safira, sempre dispostos a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho. Por apoiar a pesquisa de alta qualidade e por fortalecer o conhecimento científico no Brasil.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, expresso minha profunda gratidão.

"Mientras uno está vivo, uno debe amar lo más que pueda."
Jacobo Morales

## *PRESS RELEASE*

LINHARES, Scarlate Nobre. *Saccharomyces cariocanus*: O sabor da biodiversidade na cerveja nacional.

O Brasil é o terceiro maior mercado de cerveja do mundo, mas ainda depende em grande parte de fermentos importados. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisas da UFRJ vem investigando microrganismos da biodiversidade brasileira com foco em aplicações cervejeiras. Durante esses estudos, identificamos em uma nova espécie de levedura, *Saccharomyces cariocanus*, isolada da Mata Atlântica com um potencial para a aplicação industrial. A levedura G01 foi avaliada quanto ao desempenho fermentativo, tolerância ao álcool e ao amargor do lúpulo, além de sua capacidade de gerar compostos aromáticos característicos, como notas de banana e cravo, comuns em estilos de cervejas, como Weissbier e belgas, como as Witbier e outras aromáticas. Também conduzimos testes de imobilização celular em esferas de alginato, que demonstraram viabilidade para o reuso e para ganhos na etapa inicial da fermentação. Neste estudo, pioneiro com esta espécie de levedura, também pudemos desvendar parte do genoma deste microrganismo. Com isto pudemos confirmar que alguns atributos da cerveja produzida estavam realmente codificados no genoma do microrganismo. Outro fato importante, foi que ela não apresentou nenhum potencial em causar doença, característica importante para fermentos cervejeiros. Trata-se de um dos poucos fermentos de origem nacional estudados para uso cervejeiro. Nossos resultados indicam que a estirpe G01 pode contribuir para a diversificação de fermentos disponíveis no país e sugerem a possibilidade de se desenvolver, a partir dela, um novo estilo de cerveja com identidade brasileira.



Figura: Pesquisadores da UFRJ transformam ciência em sabor com a produção de uma cerveja artesanal a partir da levedura *S. cariocanus* G01, descoberta em território nacional.

## RESUMO

LINHARES, Scarlate Nobre. Caracterização da levedura *Saccharomyces cariocanus* G01 como um novo fermento cervejeiro. Rio de Janeiro, 2025. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

O Brasil é o terceiro maior mercado cervejeiro do mundo e, apesar de sua expressiva biodiversidade, ainda depende de insumos importados, principalmente lúpulo e fermentos. Há também uma crescente demanda por atributos inovadores nas cervejas, não apenas sensoriais, como o uso de fermentos selvagens, produtos com designação geográfica ou com apelo sociocultural. Neste contexto, nosso grupo tem investigado o potencial biotecnológico de microrganismos ambientais, com ênfase em uma estirpe previamente isolada da Mata Atlântica sendo classificada como nova espécie, *Saccharomyces cariocanus*. A estirpe G01, derivada da estirpe-tipo UFRJ 50816$^{T}$ após passagens sucessivas em mosto cervejeiro, apresentou características promissoras para aplicação na produção de cerveja. O presente estudo teve como objetivo avaliar seu desempenho fermentativo e propriedades fisiológicas desejáveis em fermentos cervejeiros, como tolerância ao etanol e a iso-α-ácidos de lúpulo, floculação, produção de $H_2S$, fenótipo *killer*, faixa térmica de crescimento, além de testar a imobilização em alginato visando reuso celular e ganho cinético. Também foi realizado o primeiro sequenciamento parcial da espécie, correlacionando características fenotípicas com dados genômicos. A estirpe G01 fermentou glicose, sacarose e maltose em 48–72 h, manteve biomassa em 7,5 % v/v de etanol e apresentou crescimento residual a 10 %. Tolerou de 5 a 55 IBU, com recuperação até 72 h, e exibiu floculação de 41,2 %, classificada como moderada. Não foi detectado fenótipo *killer*, mais comum em leveduras vínicas. A produção de $H_2S$ foi identificada, embora não comprometa seu uso, visto que também ocorre em fermentos comerciais. O crescimento ocorreu entre 17 e 28 °C, mas não a 37 °C, o que reduz a associação com patogenicidade, apoiado pela ausência de produção da enzima fosfolipase associada à virulência. No comparativo, a G01 teve desempenho próximo aos fermentos comerciais US-05 e Nottingham, embora com menor floculação, similar ao observado em fermentos para cervejas do tipo Wit e Weiss. Sensorialmente, produziu cervejas com perfis ricos em ésteres, em consonância com a presença dos genes *ATF1*, relacionado à síntese de acetato de isoamila (aroma de banana), e *PAD1*/*FDC1*, envolvidos na formação de compostos fenólicos (aroma de cravo). A imobilização em alginato 1,5 % resultou em esferas de 2,16 ± 0,10 mm e 0,010 ± 0,001 g, contendo cerca de $1{,}0\times10^{7}$ células/mL, com viabilidade preservada sob refrigeração. Tanto células livres quanto imobilizadas apresentaram atenuação de aproximadamente 41,2 % e teor alcoólico estimado de 2,76 %, sem diferenças no resultado final, indicando que o benefício da imobilização ocorre principalmente nas fases iniciais da fermentação. O conjunto dos dados confirma o perfil tipo *Ale* da estirpe, com forte potencial para produção de cervejas aromáticas e turvas, típicas de estilos como *Weissbier* e algumas belgas, como as *Witbier*. Os resultados posicionam a G01 como candidata nacional a fermento cervejeiro, com perspectivas de otimização em temperatura, regime de lúpulo e protocolos de estocagem celular para maximizar sua viabilidade e produtividade.

Palavras-chaves: leveduras, biodiversidade, imobilização de leveduras, fermentação, cerveja.

## *ABSTRACT*

LINHARES, Scarlate Nobre. Characterization of the yeast *Saccharomyces cariocanus* G01 as a new brewing yeast. Rio de Janeiro, 2025. Dissertation (Master's in Biological Sciences – Microbiology) Paulo de Góes Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Brazil is the third largest beer market in the world and, despite its remarkable biodiversity, it still relies on imported inputs, mainly hops and brewing yeasts. There is also a growing demand for innovative attributes in beers, not only sensory, such as the use of wild yeasts, products with geographical indication, or sociocultural appeal. In this context, our group has investigated the biotechnological potential of environmental microorganisms, with emphasis on a strain previously isolated from the Atlantic Forest and classified as a new species, *Saccharomyces cariocanus*. Strain G01, derived from the type strain UFRJ 50816$^T$ after successive passages in brewer's wort, showed promising characteristics for brewing applications. This study aimed to evaluate its fermentative performance and physiological properties desirable in brewing yeasts, such as tolerance to ethanol and hop iso-α-acids, flocculation, $H_2S$ production, killer phenotype, and growth temperature range, as well as to test immobilization in alginate for cell reuse and improved fermentation kinetics. In addition, the first partial sequencing of the species was carried out, correlating phenotypic features with genomic data. Strain G01 fermented glucose, sucrose, and maltose within 48–72 h, maintained biomass at 7.5 % v/v ethanol with residual growth at 10%, tolerated 5 to 55 IBU with recovery up to 72 h, and exhibited 41.2 % flocculation, classified as moderate. The *killer* phenotype was not detected, a feature more commonly found in wine yeasts. $H_2S$ production was observed, although this does not preclude its use, since it also occurs in commercial brewing yeasts. Growth occurred between 17 and 28 °C but not at 37 °C, reducing the association with pathogenicity, supported by the absence of production of the virulence-associated enzyme phospholipase. Compared with commercial yeasts US-05 and Nottingham, G01 showed similar performance, although with lower flocculation, resembling yeasts used in Wit and Weiss beer production. Sensory evaluation revealed beers rich in ester aromas, consistent with the presence of *ATF1*, related to isoamyl acetate synthesis (banana-like aroma), and *PAD1*/*FDC1*, involved in the formation of phenolic compounds (clove-like aroma). Immobilization in 1.5 % alginate produced beads of 2.16±0.10 mm and 0.010±0.001 g, containing about $1.0\times10^7$ cells/mL, with viability better preserved under refrigeration. Both free and immobilized cells achieved attenuation of 41.2 % and an estimated alcohol content of 2.76 %, with no significant differences in the final outcome, indicating that the main benefit of immobilization occurs during the early stages of fermentation. Altogether, the data confirm the *Ale*-type profile of G01, with strong potential for the production of aromatic and cloudy beers, typical of Weissbier, and some Belgian styles, such as Witbier. The results support G01 as a national candidate for brewing yeast, with clear prospects for optimization regarding fermentation temperature, hopping regime, and storage protocols for immobilized cells to maximize viability and productivity.

Keywords: yeast, biodiversity, yeast immobilization, fermentation, beer.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Congêneres químicos de moléculas de alfa e beta ácidos.....7

**Figura 2 -** *Saccharomyces cariocanus* UFRJ 50816$^{T}$ …..……...…….....20

**Figura 3** – Estrutura do alginato de sódio.....…….....21

**Figura 4 -** Fluxograma de trabalho.....……28

**Figura 5** – Montagem experimental para a imobilização de *S. cariocanus* G01 em alginato de sódio.....34

**Figura 6 -** Média e desvio padrão do crescimento de *S. cariocanus* G01 (representada pela linha verde), *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew® representada pela linha azul) e SafAle$^{TM}$ US-05 (representada pela linha vermelha) em 12, 24, 48 e 72 h em diferentes temperaturas.....41

**Figura 7** - Avaliação da capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas em meio YPD.....42

**Figura 8** - Média das triplicatas do ensaio de tolerância ao meio com extrato de levedura a 1% em diferentes concentrações de glicose. ……...44

**Figura 9** - Média e desvio padrão do crescimento em 24 h das leveduras em meio YPD com diferentes concentrações de etanol 0 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 % e 15 %.....……45

**Figura 10** - Média e desvio padrão do crescimento em 48h das leveduras em meio YPD com diferentes concentrações de etanol 0 %,5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 % e 15 %.....45

**Figura 11** - Média e desvio padrão do crescimento em 24h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05), *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew) em diferentes concentrações de IBU.....46

**Figura 12** - Média e desvio padrão do crescimento em 48 h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) e *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) em diferentes concentrações de IBU.....47

**Figura 13** - Média e desvio padrão do crescimento em 72 h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) e *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) em diferentes concentrações de IBU.....47

**Figura 14** - Ensaio de caráter *killer* em meio YEPD-azul de metileno. As leveduras foram inoculadas usando o método de *drop test* sob a levedura padrão de sensibilidade *Nakaseomyces glabrata* (IMUFRJ/50083) .....48

**Figura 15** - Análise da produção de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$) por leveduras em meio Ágar Bismuto Sulfito.....49

**Figura 16** - Teste de produção de fosfolipase em meio Ágar *Sabouraud Dextrose* suplementado com gema de ovo.....49

**Figura 17** - A) Levedura *S. cariocanus* G01 imobilizada medida em paquímetro com diâmetro de 2,2 mm; B) Imagem obtida por microscopia de luz (Opton®), ampliação de 400x da levedura *S. cariocanus* G01 imobilizada.....50

**Figura 18**. Determinação da densidade do mosto com relação ao tempo de fermentação por *S. cariocanus* G01 livre e imobilizadas em 1,5 % de alginato de sódio.....51

**Figura 19.** Ilustração do esgotamento de leveduras em meio de cultura diferencial para identificação da espécie *S. cariocanus*.....52

**Figura 20.** Gráfico de barras representando a anotação funcional de grupos ortólogos (COGs) no genoma *S. cariocanus* G01.....55

**Figura 21**. Mapa de calor representando os resultados da análise de identidade média de nucleotídeos (ANI) conduzida usando o algoritmo fastANI.....56

**Figura 22**. Árvore filogenética, utilizando as regiões ITS, SSU, LSU e os genes *TEF1* e *RPB2*.....57

# LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1** - Classificação quanto à proporção de matérias-primas……3

**Quadro 2** - Classificação quanto ao teor alcoólico……...4

**Quadro 3** - Lista de leveduras utilizadas no estudo …….....29

**Quadro 4** - Genomas usados na análise de sequências multilocus para identificação filogenética e seus respectivos números de acesso no NCBI.....38

**Tabela 1** - Consumo global de cerveja por país no ano de 2023……...…4

**Tabela 2** - Íons da água e influência no perfil sensorial para a cerveja.....6

**Tabela 3** - Lista de compostos associados aos sabores da cerveja.....13

**Tabela 4** - Classificação taxonômica de *Saccharomyces cerevisiae*……....17

**Tabela 5** - Espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces*…….....18

**Tabela 6** - Características fisiológicas diferenciais de espécies do gênero *Saccharomyces*....19

**Tabela 7** - Capacidade de fermentação de glicose, sacarose e maltose por leveduras *S. cariocanus* e *S. cerevisiae* em 24h, 48h, 72h e de manitol após 7 dias.....40

**Tabela 8** - Capacidade de multiplicação de leveduras em altas temperaturas.....43

**Tabela 9** - Avaliação da capacidade de floculação das leveduras.....48

**Tabela 10** - Perfil de fermentação de carboidratos da levedura *S. cariocanus* (G01) na sua forma livre e imobilizada em alginato de sódio 1 % e 1,5 % em diferentes tempos de fermentação (horas).....51

**Tabela 11 -** Métricas e características gerais para o genoma de *S. cariocanus* G01.....53

**Tabela 12** - Genes relacionados a fermentação de sacarose e glicose encontrados no genoma de *S. cariocanus* G01.....58

**Tabela 13 -** Cópias dos genes do loci MAL (*MAL*1, *MAL*3 e *MAL*6) encontrados no genoma de *S. cariocanus* G01 e sua similaridade com *S. cerevisiae*.....59

**Tabela 14** - Genes responsáveis pela produção de compostos de aroma e sabor identificados no genoma *S. cariocanus* G01.....61

**Tabela 15** - Valores de IBU encontrados em cervejas comerciais mais consumidas do Brasil.....67

## LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: percentual
<: menor que
®: marca registrada
ºC: graus Celsius
ºP: graus Plato
g/L: gramas por litro
h: hora
kl: quilolitro
mM: milimolar
nº: número
pH: potencial hidrogeniônico
p/v: peso por volume
rpm: rotações por minuto
v/v: volume por volume
$\lambda$: Lambda - comprimento de onda
µm: micrômetro
µl: microlitros
ABV: do inglês *Alcohol by volume*
ADH*:* Álcool desidrogenase
AHC's: ácidos hidroxicinâmicos
ATP: trifosfato de adenosina
BJCP: do inglês *Beer Judge Certification Program*
CFV: compostos fenólicos voláteis
$CO_2$: Dióxido de carbono
CoA: Coenzima A
DMS: Dimetil sulfeto
GRAS: do ingles *Generally Recognized As Safe*
$H_2S$: Sulfeto de hidrogênio
IBU: do inglês *International Bitterness Units*
ITS: do inglês *Internal Transcribed Spacer*
NAD+: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
*PAD1:* do inglês *Phenylacrylic Acid Decarboxylase*
*POF:* do inglês *phenolic off-flavor*
QPS: do inglês *Qualified Presumption of Safety*
$SO_2$: Dióxido de enxofre
VDK: dicetonas vicinais
YM: do inglês *Yeast Malt extract*
YNBG: do inglês *Yeast Nitrogen Base Glucose*
YPD: do inglês *Yeast Peptone Dextrose*

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ..... 1
1.1 Origem da cerveja ..... 1
1.1.1 Definição de cerveja ..... 2
1.1.2. Importância econômica do mercado cervejeiro ..... 4
1.2 Matérias-primas para a produção de cerveja ..... 5
1.2.1 Água ..... 5
1.2.2 Lúpulo ..... 6
1.2.3 Malte ..... 8
1.2.4 Leveduras cervejeiras ..... 10
1.3 Características desejáveis em leveduras cervejeiras ..... 10
1.4. Atividade *Killer* ..... 16
1.5. O gênero *Saccharomyces* como principal fermento cervejeiro ..... 17
1.6. *Saccharomyces cariocanus*: aspectos gerais ..... 19
1.7. Inovações tecnológicas na produção de fermentos cervejeiros ..... 20
1.8. Seleção de novos fermentos cervejeiros ..... 22
2. JUSTIFICATIVA ..... 25
3. OBJETIVO GERAL ..... 26
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 26
4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 27
4.1 Fluxograma de trabalho ..... 27
4.1.1. Linhagens de leveduras ..... 27
4.1.2. Reativação e preservação de leveduras ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.1.3 Preparo do inóculo ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.2. Teste de fermentação de carboidratos ..... 30
4.3. Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas ..... 30
4.4. Avaliação do potencial de virulência (temperatura de crescimento) das leveduras cervejeiras ..... 30
4.5. Teste de tolerância a elevada concentração osmótica ..... 31
4.6. Avaliação da resistência ao etanol ..... 31
4.7. Teste de resistência ao lúpulo ..... 31
4.8. Avaliação da capacidade de floculação ..... 32
4.9. Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$) ..... 33
4.10. Teste de atividade *killer* ..... 33

4.11. Avaliação da produção de fosfolipase ..... 33
4.12. Imobilização de leveduras em alginato de sódio ..... 34
4.13. Preparo do mosto cervejeiro ..... 35
4.14. Desenvolvimento de um meio de cultura diferencial ..... 36
4.15. Caracterização molecular da estirpe: extração do DNA e sequenciamento ..... 36
4.15.1. Anotação Funcional ..... 37
4.15.2. Identificação filogenética ..... 37
4.16. Análise estatística ..... 39
5. RESULTADOS ..... 40
5.1. Avaliação da fermentação de fontes de carboidratos ..... 40
5.2. Análise do crescimento em diferentes temperaturas ..... 40
5.3. Avaliação do potencial de virulência (temperatura de crescimento) das leveduras cervejeiras ..... 42
5.4. Teste de tolerância a elevada concentração osmótica ..... 44
5.5. Avaliação da resistência ao etanol ..... 44
5.6. Resistência ao lúpulo ..... 46
5.7. Avaliação da capacidade de floculação ..... 48
5.8. Teste de atividade *killer* ..... 48
5.9. Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$) ..... 49
5.10. Avaliação da produção de fosfolipase ..... 49
5.11. Imobilização de leveduras em alginato de sódio ..... 50
5.11.1 Perfil de fermentação de *S. cariocanus* G01 para leveduras livres e imobilizadas em 1 % e 1,5 % de alginato de sódio ..... 50
5.11.2. Atenuação aparente do mosto cervejeiro com leveduras livres e imobilizadas ..... 51
5.11.3. Atenuação Aparente e ABV estimado ..... 52
5.12. Desenvolvimento de um meio de cultura diferencial ..... 52
5.13. Montagem do genoma e anotação funcional ..... 53
5.13.1 Identificação filogenética ..... 56
5.13.2 Genes envolvidos na fermentação e no perfil sensorial da levedura *S. cariocanus* G01 ..... 57
6. DISCUSSÃO ..... 63
7. CONCLUSÃO ..... 72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 73
8. ANEXOS ..... 92

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Origem da cerveja

A cerveja pode ser considerada um dos produtos biotecnológicos mais antigos ainda em uso pelo homem. A palavra "cerveja" tem origem etimológica associada a diferentes tradições linguísticas. Em inglês, o termo *beer* deriva do inglês antigo *bēor*, que possuía cognatos em diversas línguas germânicas, como o alemão *Bier* e o neerlandês *bier*, todos provenientes do proto-germânico *beuzą*, cujo significado remete genericamente a "bebida fermentada" (Harper, 2025). Existe a hipótese sobre o sentido original de *bēor*, que poderia designar uma bebida doce e alcoólica, possivelmente semelhante a hidromel ou cidra, e não necessariamente a cerveja tal como é produzida hoje com malte e lúpulo (Hornsey, 2003). Alguns autores discutem ainda uma possível influência do latim *bibere* ("beber") na formação do termo (Oxford English Dictionary, 2023). Em português, o vocábulo "cerveja" deriva do latim *cerevisia* ou *cervisia*, palavra usada para designar bebidas fermentadas de cereais na Roma Antiga (Cascudo, 1967) e provavelmente relacionada à deusa Ceres, protetora das colheitas (Pereira, 2021).

As primeiras evidências da fabricação de cerveja datam de 13.000 anos atrás, motivada pelo cultivo de cereais no Levante do Sul (atualmente compreende países como Síria, Líbano, Jordânia, Israel e Palestina) onde foram encontrados pilões de rocha, oriundos da Caverna Raqefet, utilizados possivelmente para triturar vegetais e cereais como trigo e a cevada (Braidwood et al., 1953; Liu et al., 2018). Resíduos conhecidos como *beerstone* (oxalato de cálcio formado durante a fermentação de grãos) foram identificados em fragmentos de cerâmica escavados em Godin Tepe, nos Montes Zagros, datados entre 5.400 e 5.000 a.C., constituindo a prova arqueológica mais antiga da produção deliberada de cerveja até o momento (Michel, McGovern e Badler, 1993). Na Mesopotâmia, registros textuais em escrita cuneiforme, datados do terceiro milênio a.C., descrevem em detalhe a produção e o consumo de cerveja, onde eram listados diferentes tipos de cerveja e sua importância como alimento, meio de pagamento e elemento ritual. Além disso, várias etapas dos processos de produção da cerveja foram descritas, de forma poética, em um hino à deusa Ninkasi, conhecida como a deusa da cerveja (Civil, 1994; Damerow, 2012). Esses achados combinados demonstram que a produção de bebidas fermentadas à base de cereais já estava bem estabelecida no período pré-histórico e desempenhava papel central nas primeiras sociedades urbanas do Oriente Próximo.

Acredita-se que o surgimento da cerveja ocorreu de forma acidental, conforme os grãos como o trigo, cevada e centeio eram estocados em vasos de barro. Esses recipientes, ao serem expostos à umidade, criavam condições ideais para a ação das enzimas que convertem os grãos em malte (McGovern, 2010; Raihofer et al., 2021).

A fabricação da cerveja difundiu-se com as culturas de milho, centeio e cevada entre os antigos povos sumérios, babilônios e egípcios (Raafat e Fouad, 2018; Carey, 2023). Durante a idade média, os monges eram os responsáveis pela fabricação de cerveja em mosteiros na Europa, além da comercialização entre os séculos XII e XIII. Nesse período, houve um aumento no consumo da bebida, pois, a água nesse período era muito poluída, e a cerveja serviu como uma alternativa mais segura (Samuel, 1996; Unger, 2004; Hornsey, 2013).

A bebida pode ter aberto caminhos para a utilização de cereais fermentados, que foram utilizados para fins medicinais, religiosos e sociais (McGovern et al., 2004; Couto, 2022; Ray et al., 2024). A cerveja é um elemento integrante da sociedade ocidental, devido a tradições culturais e inovações, que moldaram seu consumo (Morado, 2017; Wang et al., 2017; Cabras et al., 2023).

### 1.1.1 Definição de cerveja

A cerveja é uma bebida carbonatada, preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, levedura e água. Também podem ser utilizados adjuntos para substituir o grão de cevada, como arroz, milho e trigo, com o intuito de diminuir os gastos da produção da bebida (de Oliveira, 2011; Habschied et al., 2020). As características sensoriais da bebida são definidas pela escolha dos insumos, tipo de processo e fermento utilizado (Iorizzo et al., 2021; de Simone et al., 2021).

A preocupação com a definição dos insumos básicos para a padronização da bebida é antiga. Em 23 de abril de 1516, foi criada a Lei da Pureza da Cerveja (*Reinheitsgebot*) pelo Duque Guilherme IV, que tratava sobre a qualidade das cervejas, a qual estabelecia que a bebida só poderia conter água, lúpulo e malte de cevada (Tongeren, 2011). As leveduras não foram mencionadas, pois a existência dos microrganismos era desconhecida na ocasião. O objetivo principal da lei era garantir a pureza da bebida e proteger a saúde pública (White e Zainasheff, 2022; Thompson e Dawson, 2023). Ainda hoje, ela continua a influenciar a produção de cervejas como referência de qualidade e tradição (Chopeiras Eltz, 2023; Ricarte, 2024).

A produção da cerveja sobreviveu ao longo da história e atualmente ela é tecnicamente conceituada como o resultado do processo de fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, contendo malte de cevada, água, leveduras como agente fermentador e lúpulo (Barbosa, 2018).

No Brasil, o Decreto n.º 9.902, de 8 de julho de 2019 emitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define cerveja como:

> "Art. 36. Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro."

O Art. 10 da Instrução Normativa N.º 65, de 10 de dezembro de 2019, estabelece os padrões para a padronização da bebida, que pode ser classificada em relação à proporção de matérias-primas (**Quadro 1**) e ao teor alcoólico (**Quadro 2**).

**Quadro 1** - Classificação quanto à proporção de matérias-primas.

| **Classificação** | **Extrato primitivo*** |
|---|---|
| Cerveja | No mínimo 55,0 % em peso de cevada malteada e no máximo 45 % de adjuntos cervejeiros** |
| Cerveja puro malte | 100 % em peso de cevada malteada |
| Cerveja puro malte de (nome do cereal malteado) | 100 % em peso de outro cereal malteado |
| Cerveja de (nome do cereal) | Provém de no máximo 80,0 % de adjuntos cervejeiros |

*Quantidade de substâncias dissolvidas no mosto

**Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada não malteada, demais cereais maltados ou não maltados, mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, todos aptos para o consumo humano (Brasil, 2019).
Fonte: Brasil, 2019.

**Quadro 2** - Classificação quanto ao teor alcoólico.

| Classificação | Conteúdo alcoólico |
|---|---|
| Cerveja | superior ou igual a 2,0 % em volume (2,0 % v/v) |
| Cerveja sem álcool | inferior a 0,5% em volume (0,5 % v/v) |
| Cerveja com álcool | superior a 0,5 % em volume (0,5 % v/v) e inferior ou igual a 2,0 % em volume (2,0 % v/v) |

Fonte: Brasil, 2019

### 1.1.2. Importância econômica do mercado cervejeiro

O mercado cervejeiro brasileiro, no ano de 2023 apontou a produção de 15,4 bilhões de litros, um crescimento de mais de 15 % desde o ano de 2013 (SINDICERV, 2024). Este setor se destaca pela contribuição na agricultura, indústrias, comércio e serviços, gerando uma receita de 277,4 bilhões de reais ao ano, equivalente a 2 % do PIB (Freitas, 2023).

O Brasil está entre os principais produtores de cerveja do mundo, ocupando o terceiro lugar, atrás dos Estados Unidos e da China. De acordo com o relatório Barth Hass 2024/2025, o país teve um volume de produção de 147 milhões de hectolitros e 7,9 % de participação mundial (Khalid, 2024; Barth Hass, 2025).

Além disso, o Brasil também se destaca no cenário mundial, sendo o terceiro maior consumidor da bebida. Em 2023, o volume consumido de cerveja no Brasil foi de 15.137 milhões de quilolitros (kl) (**Tabela 1**), representando 8,1 % de participação no mercado global. Com relação ao consumo per capita, o país fica em 21º lugar com 69,9 litros consumidos por habitante (Kirin, 2024).

**Tabela 1** - Consumo global de cerveja por país no ano de 2023

| Ranking | Países | Consumo total (Milhões de kl) | Participação no mercado global |
|---|---|---|---|
| 1º | China | 37.680 | 20.1 % |
| 2º | Estados Unidos | 21.444 | 11.4 % |
| 3º | Brasil | 15.137 | 8.1 % |
| 4º | México | 10.249 | 5.5 % |
| 5º | Rússia | 8.727 | 4.6 % |

kl: Quilolitros. Fonte: Kirin Holdings, 2024.

Em 2024 existiam 1.847 cervejarias registradas no Brasil, um aumento de 118 cervejarias quando comparado ao ano anterior. Dentre os estados brasileiros, São Paulo superou a marca de 410 cervejarias registradas, com aumento de 5,9 % com 23 estabelecimentos a mais que no ano de 2022 (Brasil, 2024), sendo a região sudeste a que detém o maior número de cervejarias com 876 estabelecimentos, que representa 46,3 % do total de cervejarias no Brasil.

## 1.2 Matérias-primas para a produção de cerveja

### 1.2.1 Água

A combinação das diferentes matérias-primas e condução do processo de produção resultam em inúmeras variações das características sensoriais da cerveja (Díaz et al, 2022).

Entre as matérias-primas, a água é um elemento fundamental na produção de cerveja, que representa cerca de 90 a 95 % do seu conteúdo. Suas características são importantes e representam motivo de constante monitoramento e controle, como a avaliação de potabilidade, pH, nitratos, metais pesados, turbidez e coloração (Venturini Filho, 2010; Morado, 2017).

Na produção de cerveja são considerados dois tipos de água, uma delas é a água de serviço, que é utilizada para a limpeza dos equipamentos e resfriamento do mosto, a qual não entra em contato com a bebida. Existe também a água cervejeira, ou água nobre, que é utilizada para preparo do malte, lavagem de garrafas e latas ou barris (Microambiental, 2021). Alguns requisitos são necessários para que a água seja utilizada no processo, como ser livre de turbidez; ter o pH controlado (5 a 5,5) e estar dentro dos padrões microbiológicos (Rosa et al., 2015). A **Tabela 2** apresenta a importância e concentração ideal de alguns íons na água cervejeira.

Durante um período do início da era de produção industrial da cerveja, a disponibilidade de água de boa qualidade foi importante na criação de estilos marcantes de cervejas, como em Pilsen na República Tcheca, conhecida por ser uma água muito macia (menor concentração de cálcio) e com pequena proporção de compostos inorgânicos, adequada para cervejas claras e delicadas (Punčochářová et al., 2019). Em outro exemplo, em Burton, na Inglaterra, a água com elevada dureza, causada pela alta concentração de sulfato de cálcio, desenvolvendo cervejas mais amargas e fortes (De Ávila et al., 2022). Atualmente, é possível adicionar ou remover os minerais da água, assim adequá-la ao tipo de cerveja que deseja produzir. Entretanto, ainda que seja possível alterar sua qualidade, as indústrias cervejeiras costumam instalar suas fábricas em locais que tenham acesso a águas mais puras, para redução dos gastos com possíveis tratamentos (Morado, 2017).

**Tabela 2** - Íons da água e influência no perfil sensorial para a cerveja.

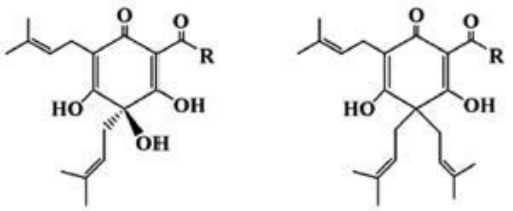
| Íons | Concentração ideal | Concentração alterada | Percepção sensorial |
|---|---|---|---|
| Sódio | 10 a 70 mg/L | 150 a 200 mg/L > 200 mg/L | Realça corpo maltado; Salgado |
| Potássio | 300 a 500 mg/L | > 500 mg/L | Salgado |
| Magnésio | 10 a 30 mg/L | > 70 mg/L | Amargo e azedo |
| Cálcio | 50 a 150 mg/L | <50 mg/L | Azedo |
| Hidrogênio | pH 6,5 a 7,0 (dependendo da cerveja produzida) | pH < 4<br>pH ≤ 3,7<br>pH > 4<br>pH ≥ 4,4 | Ácido com tendência para o amargo;<br>Metálico;<br>Torrado;<br>Sabão (básico) |
| Ferro | < 0,05 | ≥ 0,05 mg/L | Metálico e adstringente |
| Cloreto | 0 a 250 mg/L | > 250 mg/L | Salgado |
| Sulfato | 50 a 150 mg/L - cervejas amargas<br>150 a 350 mg/L - cervejas muito amargas | > 400 mg/L | Acentua o amargor do lúpulo, adstringente e sulfuroso. |

Adaptado de Salimbeni, Meneguetti e Rolim, 2016

### 1.2.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta trepadeira da família Cannabaceae, cujas inflorescências femininas (Ramírez e Viveros, 2021), conhecidas como cones de lúpulo, são amplamente utilizadas na produção de cerveja devido à presença de compostos bioativos com impacto direto no sabor, aroma e estabilidade microbiológica da bebida. Quimicamente, o lúpulo é composto por resinas amargas que contêm compostos chamados de alfa e beta-ácidos (**Figura 1**). Os lúpulos, que adicionam amargor à cerveja, conferem alto índice de alfa-ácidos isomerizados de co-humulona, humulona e ad-humulona à bebida, os quais são chamados de iso-cohumulona, iso-humulona e iso-adhumulona. Estes, em uma concentração de 10 a 15 %, são solúveis em água (Durello, Silva e Bogusz, 2019). Além disso, a composição química do mosto, pH, quantidade de lúpulo e tempo de fervura na produção de cerveja podem influenciar o nível de amargor (Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2023). Os beta-ácidos, que também estão presentes nas inflorescências, são chamados de lupulona, ad-lupulona e co-lupulona; estes são insolúveis em água, não sofrem isomerização e não conferem amargor à cerveja, mas possuem atividade antimicrobiana, podendo atuar como agentes antioxidantes (Hao et al., 2020; Sposito

et al., 2019). O lúpulo também conta com polifenóis e flavonoides entre seus componentes, os quais contribuem com ação antioxidante e antimicrobiana (Knez Hrnčič et al, 2019). A composição química do lúpulo varia conforme o cultivar, o *terroir* e o processamento pós-colheita, sendo fator determinante na identidade sensorial da cerveja (Rettberg et al. 2018).




| R | Alfa ácido (Humulona) | Beta ácido (Lupulona) |
|---|---|---|
| $CH(CH_3)_2$ | Cohumulona | Colupulona |
| $CH_2CH(CH_3)_2$ | Humulona | Lupulona |
| $CH(CH_3)CH_2CH_3$ | Ad-humulona | Ad-lupulona |
| $CH_2CH_3$ | Pós-humulona | Pós-lupulona |
| $CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ | Pré-humulona | Pré-lupulona |
| $CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ | Adpre-humulona | Adpré-lupulona |
| $CH_3$ | Acetohumulona | Acetolupulona |

**Figura 1** - Congêneres químicos de moléculas de alfa e beta ácidos. Adaptado de Leker e Maye, 2023. Reprodução autorizada por *Copyright Clearance Center*® (Anexo 1)

O lúpulo pode ser adicionado em qualquer etapa de fabricação da cerveja; contudo, sua aplicação é geralmente recomendada durante a fervura ou após a fermentação, um processo conhecido como *dry hopping*. A intensidade do amargor é quantificada por meio da unidade chamada *International Bitterness Units* (IBU), cuja determinação envolve a extração de substâncias da cerveja com o isooctano acidificado, seguida pela determinação da absorbância em $\lambda$ = 275 nm. Cada unidade de IBU corresponde a 1 mg de iso-alfa-ácidos/L (Thesseling et al., 2019; Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022).

Quase todo o lúpulo utilizado pelas cervejarias brasileiras é importado, principalmente de países como a Alemanha e os Estados Unidos, aumentando os custos e reduzindo a qualidade devido ao longo tempo de armazenamento. Nos últimos anos, com o objetivo de diminuir a dependência internacional, produtores nacionais iniciaram o cultivo de lúpulo no país, atingindo a marca de 88 toneladas em 2023 (Aprolúpulo, 2023). O Ministério da Agricultura e Pecuária

(MAPA), por meio da Secretaria de Agricultura Familiar, e em parceria com o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA), se mobilizaram para viabilizar técnicas para produção de lúpulo no país, que poderiam reduzir os custos do processo cervejeiro no futuro (Mapa, 2021). No Brasil há 152 produtores de lúpulo, distribuídos principalmente nas regiões Sul e Sudeste, entre os estados de Santa Catarina (33,3 %), Rio Grande do Sul (20,7 %) e São Paulo (21,1 %). Outros estados produtores de lúpulo incluem Minas Gerais (14,9 %), Rio de Janeiro (14,9 %), Paraná (9,6 %), Espírito Santo (4,2 %), Distrito Federal (3,2 %), Mato Grosso do Sul, Ceará, Goiás, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Tocantins (cada um com 1,1 %) (Brasil, 2022). Com o crescimento do cultivo de lúpulo no país, há um interesse no desenvolvimento de estudos com essa matéria prima para viabilizar diversas variedades de lúpulo (Almeida e Couto, 2024), outra vantagem da colheita nacional de lúpulo é sua possível utilização ainda fresco, diferente das versões comumente utilizadas em pellet, flor e em extrato (Rohbrau, 2021).

### 1.2.3 Malte

O malte constitui outro ingrediente essencial na fabricação de cerveja. De acordo com a Instrução Normativa nº 11 de 13 de março de 2013 do MAPA, o malte é definido como um produto resultante da germinação forçada e controlada dos grãos de cevada da espécie *Hordeum* spp., sendo posteriormente secos. O processo de malteação consiste na germinação controlada de grãos de cereais (geralmente cevada), seguida de secagem. Nesta etapa, o objetivo é reduzir a concentração de β-glucanas presentes na parede celular dos grãos, bem como as proteínas insolúveis que restringem o acesso das enzimas à degradação do amido (Fox e Bettenhausen, 2023; Younis et al., 2024).

A malteação é composta por diferentes etapas, sendo a maceração (imersão em água) a primeira delas. Nessa fase, os grãos adquirem um teor de umidade necessária para iniciar o seu metabolismo por meio de imersão em água na presença de oxigênio, sendo um elemento necessário para estimular o desenvolvimento do embrião dos grãos. A etapa seguinte, denominada germinação, consiste no desenvolvimento do grão e no seu enriquecimento enzimático, como a produção de glucanases, amilases, lipases, proteases e parte das hemicelulases. Por fim, ocorre a secagem, que pode ser realizada em temperaturas de 20 ºC à 100 ºC, dependendo da cor final desejada para o grão (Piccini, Moresco e Munhoz, 2022). Além de contribuir para a definição da coloração, essa etapa final também tem o objetivo de preservar o sistema enzimático, no qual todos os processos bioquímicos são cessados (Rani e Bhardwaj, 2021).

Na produção de cerveja, a seleção dos tipos de malte é um dos principais fatores determinantes do perfil sensorial, da cor, do corpo e da complexidade da bebida (Guido e Ferreira, 2023; Nehra et al., 2024). Além do malte pilsen, o mais utilizado por seu sabor suave, baixo custo e alto poder enzimático, diversas variedades de maltes são incorporadas com o objetivo de modificar características específicas da cerveja. Tais maltes diferenciam-se pelo grau de secagem ou torrefação a que são submetidos (Carvalho et al., 2016). A intensidade do aquecimento durante o processo de secagem (*kilning*) é o principal fator que diferencia os tipos de malte, influenciando sua composição química, especialmente em termos de açúcares caramelizados, compostos fenólicos e reações de Maillard (Prado et al., 2021). Estes podem conferir uma coloração de amarelo pálido até uma cor escura como café à cerveja. Da mesma forma, aromas leves, como caramelo, baunilha ou achocolatado, entre outros, podem ser obtidos com a escolha e combinação de variedades de malte (Mosher, 2022).

Além da cevada, outros cereais também são empregados como fontes alternativas na produção cervejeira, podendo ser malteados ou não. Trigo (*Triticum aestivum* L.), centeio (*Secale cereale* L.), aveia (*Avena sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), arroz (*Oryza sativa* L.) e milho (*Zea mays* L.), são exemplos de adjuntos utilizados com diferentes finalidades, tais como alteração no sabor, na turbidez, aroma e leveza da bebida, além da possível redução de custos de produção (Bathke, Dresch e Souza, 2013; Cadenas et al., 2021). A utilização equilibrada e adequada de maltes e adjuntos permite uma ampla variedade de estilos cervejeiros, que vão desde as *lagers* leves até *stouts* robustas e complexas (Bodgan e Kordialik-Bogacka, 2017; Bimbo et al., 2023).

No contexto da produção cervejeira nacional, o abastecimento de malte, que juntamente com a água é o principal insumo para a fabricação da bebida, ainda depende majoritariamente de importações. Em 2022, a capacidade de produção de malte no Brasil alcançou 750 mil toneladas/ano, suprindo apenas 39,5 % da demanda interna, estimada em 1,9 milhão de toneladas. Este cenário gerou um déficit superior a 1,1 milhão de toneladas, compensado por meio de via importação. A produção de cevada, igualmente concentrada na região Sul do país, alcançou 482 mil toneladas de grãos cervejeiros no mesmo ano, ainda insuficiente para reduzir a dependência externa. Atualmente, estão em operação quatro maltarias, com uma capacidade combinada de cerca de 730 mil toneladas por ano (Carpentieri-Pipolo et al., 2023; Limberger e Cunha, 2025)

### 1.2.4 Leveduras cervejeiras

Leveduras são fungos unicelulares, eucarióticos, pertencentes principalmente ao filo Ascomycota e, em menor proporção, ao filo Basidiomycota. Caracterizam-se pela capacidade de se reproduzir predominantemente por brotamento ou, menos frequentemente, por fissão binária, formando colônias visíveis em meios de cultura sólidos. São microrganismos heterotróficos e anaeróbios facultativos, desse modo a depender da disponibilidade de nutrientes e oxigênio, o metabolismo pode ser aeróbio, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons para produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), ou fermentativo que é um processo anaeróbio que resulta na produção de etanol e dióxido de carbono durante a fermentação alcoólica (Hough et al., 1982).

As reações da fermentação alcoólica podem ocorrer através da via glicolítica, que envolve reações em sequência por enzimas catalisadoras originando os metabólitos primários (Stewart, 2018c) no citoplasma celular de *S. cerevisiae*. O piruvato é gerado a partir do catabolismo da glicose, no qual sofre ação da coenzima reduzida dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e é convertido em acetaldeído e posteriormente em etanol. A etapa final, catalisada pela enzima álcool desidrogenase (ADH) regenera o $NAD^+$, para que a glicólise e a produção de ATP continuem. A equação química da fermentação alcoólica é representada por: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ (Maicas, 2020).

## 1.3 Características desejáveis em leveduras cervejeiras

A seleção e utilização de microrganismos para a fermentação deve considerar aspectos sensoriais, tecnológicos, econômicos, regulatórios, culturais, genômicos e funcionais, alinhando o perfil da levedura às especificidades do estilo, da escala produtiva e do mercado-alvo (Nascimento e Barros, 2025). Entre os principais fatores, estão:

- capacidade de realizar uma fermentação rápida, sem a necessidade de propagação excessiva;
- ser capaz de assimilar os açúcares, com eficiente utilização de maltose e maltotriose;
- tolerância a variações no pH, concentrações de etanol, lúpulo e elevada pressão osmótica do mosto;
- produção reprodutível de compostos secundários, responsáveis pelo aroma e sabor característico da cerveja;
- facilidade de manipulação;
- capacidade de floculação e sedimentação;

- apresentar estabilidade genética;
- não apresentar patogenicidade.

O conceito de um bom fermento cervejeiro envolve mais do que a simples capacidade de converter açúcares em etanol. Existem um conjunto de características fisiológicas e genéticas relativamente raras na microbiota ambiental, que em conjunto garantem uma fermentação previsível, completa e sensorialmente consistente, além de fatores tecnológicos e econômicos desejáveis (Stewart e Russell, 1998). A capacidade de realizar fermentações rápidas e vigorosas, sem a necessidade de propagação excessiva, é uma característica importante, pois reduz o tempo de processo e os custos industriais. Essa competência está ligada à elevada viabilidade celular, taxas de crescimento específicas elevadas (μmax) e eficiente utilização de reservas intracelulares de glicogênio e trealose durante a fase de adaptação (Goldammer, 2022). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cervejeiras exibem regulação positiva de genes de glicólise (*HXK2*, *PFK1*, *ENO2*), garantindo rápida transição para metabolismo fermentativo após inoculação (Kornblatt et al., 2013; Zheng et al., 2024).

A capacidade de assimilar os açúcares do mosto, com eficiente utilização de maltose e maltotriose, desempenha um papel essencial na performance fermentativa. Esse processo depende de famílias gênicas *MALx1* (permeases), *MALx2* (maltases) e transportadores de maltotriose como *AGT1* e *MTT1*, cuja presença funcional é relativamente rara em leveduras selvagens (Han et al., 1995; Faz-Cortez et al., 2025). Cepas que não expressam adequadamente esses transportadores resultam em açúcares residuais e baixa atenuação aparente, enquanto leveduras cervejeiras selecionadas exibem expressão coordenada dessas vias, permitindo consumo quase completo desses açúcares mesmo em mostos de alta densidade (Dietvorst et al., 2007; Magalhaes et al., 2016).

A tolerância a variações de pH, concentrações crescentes de etanol, compostos de lúpulo e pressão osmótica elevada é igualmente determinante. Essas características fisiológicas dependem de mecanismos como ativação da via HOG (produção de glicerol), bombas de prótons de alta capacidade (*PMA1*), síntese de ergosterol (*ERG11*, *ERG3*) e presença de bombas de efluxo (*PDR12*) que conferem resistência a iso-α-ácidos do lúpulo. A regulação de proteínas de choque térmico (HSP), o metabolismo da glicose e o acúmulo de trealose são importantes para a resistência das leveduras em altas concentrações de etanol (Vianna et al., 2008; Doğan et al., 2014). Os genes de síntese de trealose (*TPS1*,*TPS2*, *TPSL1*, *PGM2* e *UPG1*) sob condições de estresse são regulados positivamente, inibindo a desnaturação de proteínas e diminuindo a permeabilidade da membrana (Singer e Lindquist, 1998;Sahana et al., 2023).

Essas respostas coordenadas são raras em microrganismos não-cervejeiros e garantem que a levedura mantenha alta viabilidade celular mesmo quando a fermentação se aproxima de seu fim e o ambiente se torna hostil (Chen et al., 2025).

Outro aspecto considerado na escolha de fermentos cervejeiros é a produção reprodutível de compostos secundários, como ésteres, álcoois superiores, ácidos orgânicos, dicetonas vicinais (VDK), fenóis e compostos fenólicos, que definem o perfil sensorial da cerveja (**Tabela 3**) (Araújo e Minim, 2003; Pires et al., 2014; Augusti, 2021; Pina, Cruz e Martelli, 2022). Leveduras cervejeiras exibem expressão estável de genes como *ATF1* e *ATF2* (acetiltransferases), responsáveis pela formação de acetato de isoamila e outros ésteres frutados (Nasuti e Solieri, 2024). A capacidade de uma cepa de produzir fenóis, por exemplo, é associada à expressão do gene *PAD1* e é desejada em estilos como *Weissbier*, mas indesejada em *lagers*, que são sensorialmente mais leves (Mukai et al., 2010; Holt et al., 2018). A estabilidade metabólica garante que a cerveja mantenha seu perfil aromático lote após lote, diferentemente de leveduras selvagens, que podem apresentar variabilidade elevada na produção de voláteis (Kucharczyk et al., 2020; Nelson et al., 2024).

Os álcoois superiores ou álcoois fúseis possuem cargas moleculares maiores que o etanol. Entre eles estão compostos como n-propanol, 2-metilpropan-1-ol (isobutanol), 3-metilbutan-1-ol e os álcoois aromáticos 2-feniletanol e álcool benzílico, que em quantidades elevadas (> 300 mg/L) causam amargor desagradável (Brányik et al., 2008). As cepas de levedura *ale* são capazes de produzir álcoois superiores em maior número com relação a leveduras *lager*, pois fermentam em uma temperatura mais elevada que acaba por alterar a fluidez da membrana plasmática da levedura, promovendo uma maior excreção destes compostos (Figueiredo, 2016).

Os ésteres são compostos que atribuem aromas frutados e florais, formados a partir de reações de ácidos orgânicos e álcoois durante a fermentação (Pires et al., 2014). São exemplos deles, o acetato de isoamila, que confere aroma de banana, acetato de feniletila (rosas e mel), acetato de etila (semelhante a solvente). O hexanoato de etila confere características como sabor de semente de anis e aroma de maçã, o octanoato de etila confere aroma de maçã azeda (Saerens et al., 2008). As leveduras do tipo *ale* são mais propensas a produzir ésteres (Bourbon-Melo et al., 2021), principalmente acetato de isoamila (Tan et al., 2021). Este éster, assim como os álcoois superiores, tem sua produção associada a altas temperaturas de fermentação (Dufour, 2003; Yu et al., 2012). Além disso, estão presente nas cervejas de trigo (Dinslaken, 2018).

**Tabela 3** - Lista de compostos associados aos sabores da cerveja

| Compostos | Sabor na cerveja | Limiar organoléptico (ppm)* |
|---|---|---|
| ***Álcoois superiores*** | | |
| Propan-1-ol (*n*-propanol) | Álcool | 800 |
| 2-Metilpropanol (álcool isobutílico) | Álcool | 200 |
| 2-Metilbutanol (álcool amílico ativo) | Álcool, banana, medicinal e solvente | 65 |
| 3-Metil butanol (álcool isoamílico) | Álcool | 70 |
| 2-Etanol fenílico | Rosas | 125 |
| ***Ésteres*** | | |
| Acetato de etila | Solvente, frutado, adocicado | 30 |
| Acetato de isoamila | Banana, maçã, solvente, éster | 1.2 |
| Acetato de 2-feniletila | Rosas, mel, maçã, adocicado | 3.8 |
| Caproato de etila | Maçã ácida | 0,21 |
| Caprilato de etila | Maçã ácida | 0,9 |
| ***Compostos carbonílicos*** | | |
| Acetaldeído | Folhas verdes, frutadas | 25 |
| 2,3-Butanodiona (diacetil) | Caramelo | 0,15 |

* menor concentração de uma substância que pode ser percebida pelos sentidos humanos representada em partes por milhão (ppm). Adaptado de Olaniran, 2017.

Os compostos carbonílicos são formados durante a preparação do mosto a partir de reações de Maillard (um complexo conjunto de reações químicas não enzimáticas desencadeadas por altas temperaturas entre açúcares redutores e grupos amínicos de aminoácidos ou proteínas) e oxidação lipídica. O acetaldeído resultante é um intermediário na formação de etanol (Olaniran et al., 2017) que, em altas concentrações, apresenta aromas de folhas verdes e, em baixas concentrações, aromas de maçã verde (Rohbrau, 2022). As dicetonas vicinais (VDK) como o diacetil (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona, nas concentrações maiores que 0,01-0,4 e 0,01-0,15 ppm respectivamente, conferem sabor e aroma amanteigado ou caramelo que são indesejáveis à cerveja (Yerolla et al., 2022).

Os compostos sulfurosos como sulfeto de hidrogênio ($H_2S$), dimetilsulfeto (DMS) e dióxido de enxofre ($SO_2$) podem ser resultantes do processo cervejeiro (Baxter e Hughes, 2001). O $H_2S$ e o $SO_2$ são compostos influenciados pelo metabolismo da levedura. A redução desses compostos forma proteínas (aminoácidos como cisteína e metionina), coenzimas (CoA, biotina,

tiamina e pirofosfato) e metabólitos celulares (glutationas, sulfetos e tióis). Durante a fermentação e maturação o $H_2S$ pode ser eliminado pelo $CO_2$, sendo mais comum em cervejas *lager* (Russel, 2003; Puccinelli, 2022). O $SO_2$ em baixas concentrações (200-20.000 mg/L) podem atuar como agente antioxidante, sendo menos volátil que o $H_2S$ (1-20 mg/L), mas em concentrações elevadas, pode apresentar odor de fósforo queimado (Landaud, Helinck e Bonnarme, 2008; Rocha, 2016).

Os compostos fenólicos presentes na cerveja podem ser derivados do malte e do lúpulo. Algumas cepas de levedura *Saccharomyces* e outras do gênero *Pichia*, *Candida*, *Kloeckera* e *Brettanomyces* apresentam um fenótipo POF+ (do inglês "*phenolic off-flavor*" positivo). Essas leveduras realizam descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos (AHC's) presentes no mosto, produzindo compostos fenólicos voláteis (CFV). Os AHC's mais comuns no mosto são os ácidos ferúlicos e *p*-cumárico que são extraídos durante a mostura, e no processo de fermentação são reduzidos a 4-vinilguaiacol, 4-etilguaiacol, 4-vinilfenol e 4-etilfenol que oferecem aromas semelhante ao de cravo, desejáveis em cervejas alemãs do tipo "*Hefeweizen*" (Gallone, et al., 2016).

Os ácidos orgânicos são produtos secundários ou intermediários excretados pelas leveduras; entre eles estão o ácido acético (30-200 mg/L), lático (20–80 mg/L) propanóico (1-5 mg/L), pirúvico (15–150 mg/L), succínico (16–140 mg/L), entre outros (Buiatti, 2009; Rodrigues et al., 2010; Dysvick et al., 2020). A presença desses compostos confere acidez à bebida que normalmente apresenta pH entre 4 e 5.

Já os ácidos graxos livres podem afetar a capacidade de formar uma espuma estável na cerveja, pois interagem com proteínas formadoras de espuma (Bravi et al., 2017). Os ácidos graxos de cadeia média, como ácidos hexanoico, octanoico e decanoico, podem oferecer um sabor rançoso (Horák et al., 2009). Os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como os ácidos linoleico e linolênico, quando são oxidados geram sabores associados a cerveja envelhecida (Bravi et al., 2014).

A capacidade de floculação e sedimentação é outro traço distintivo, mediada pela ligação específica das proteínas semelhantes à lectina na superfície da levedura com resíduos de manose ao lado externo da parede celular da levedura adjacente. Essa proteína, chamada de floculina, pertence à família das adesinas, e é codificada pelos genes *FLO*, divididos em dois grupos. Em um grupo estão *FLO11*, *FIG2*, e *AGA1,* que são responsáveis pela adesão célula-célula e crescimento invasivo. O segundo grupo inclui os genes dominantes *FLO1*, *FLO5*, *FLO8, FLO9* e *FLO10* que codificam floculinas com alto grau de homologia (Querol e Bond, 2009; Stewart, 2018b). O processo foi inicialmente descoberto em leveduras cervejeiras,

envolvidas na fermentação de cervejas *ale* e *lager*, agregando-se no final da fermentação primária, quando sedimentam no caso de leveduras *lager* ou sobem para a superfície do líquido formando uma camada de leveduras, no caso das cervejas com leveduras *ale* (Willaert, Kayacan e Devreese, 2021). Fatores ambientais como pH, influenciam fortemente a floculação, assim como o fazem temperaturas mais baixas em cepas do tipo *lager.* Ainda, altas concentrações de glicose são capazes de reprimir a expressão de *FLO1* via repressão catabólica, fazendo com que a floculação se inicie somente em estágios mais avançados da fermentação (New et al., 2014; Vergara-Álvarez et al., 2019). Essa característica permite clarificação natural da cerveja e recuperação eficiente das células, mas precisa ser bem regulada para evitar floculação precoce que interrompa a fermentação (Stewart, 2018a; Mehta et al., 2021).

A facilidade de manipulação e estabilidade genética são atributos importantes em um contexto industrial. Cepas cervejeiras mantêm cariótipos estáveis, mesmo após múltiplos ciclos de reuso, preservando performance fermentativa e reduzindo risco de deriva genética ou mutações que comprometam o processo (Large et al., 2020; Clericuzi, 2021). Essa estabilidade está associada a sistemas robustos de reparo de DNA e manutenção de ploidia, além de ser monitorada rotineiramente em programas de controle de qualidade de bancos de levedura (Kyselová e Brányik, 2015).

Por fim, a levedura utilizada para fins cervejeiros não deve apresentar patogenicidade ou risco sanitário significativo. Espécies tradicionalmente empregadas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*, são classificadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e possuem um histórico milenar de uso seguro, sem associação com doenças em indivíduos imunocompetentes (Capece et al., 2025).

No entanto, existem alguns métodos, como crescimento em alta temperatura (Klingberg et al., 2008), expressão e atividade enzimática (protease e fosfolipases) (de Llanos, Fernández-Espinar e Querol, 2006), crescimento invasivo (Zupan e Raspor, 2008), entre outros, que buscam investigar fatores de virulência para patogenicidade de *S. cerevisiae*, além de sua capacidade de distinguir entre as cepas clínicas, ambientais e utilizadas para produção de alimentos, utilizando como controle para esses estudos *Candida albicans* (Anoop et al., 2015). Há relatos esporádicos de infecções oportunistas por *S. cerevisiae* em pacientes imunossuprimidos, geralmente hospitalizados e portadores de condições graves, como neutropenia, uso de cateter venoso central ou terapias antibióticas prolongadas. Esses casos, frequentemente descritos como fungemias ou septicemias, envolvem cepas conhecidas como *Saccharomyces boulardii*, utilizadas como probióticos, mas também já foram atribuídos a cepas de panificação ou fermentação (Romanio et al., 2017; Boza et al., 2023; Vinayagamoorthy et

al., 2023). Os fatores de agressão propostos nesses episódios incluem a translocação intestinal em situações de mucosa comprometida, a adesão a superfícies de cateteres e a formação de biofilmes, além da capacidade de crescer em temperatura corporal (37 °C) (Van Nguyen et al., 2020). Apesar desses relatos, a taxa de incidência é extremamente baixa, estimada em < 0,5 casos por 100.000 admissões hospitalares e restrita quase exclusivamente a pacientes de alto risco, não havendo evidência de patogenicidade relevante em consumidores saudáveis ou trabalhadores da indústria cervejeira (Enache-Angoulvant e Hennequin, 2005).

### 1.4. Atividade Killer

A atividade *Killer* está relacionada à produção de toxinas (*Killer toxins* ou micocinas) por leveduras. Essas proteínas são de baixo peso molecular e podem ser letais a leveduras sensíveis por meio da interação com receptores superficiais específicos. Os genes que codificam essas toxinas podem estar localizados no núcleo ou em moléculas citoplasmáticas de DNA ou RNA de fita dupla (Schaffrath, Meinhardt e Klassen, 2018). É sabido que as leveduras que produzem essas toxinas apresentam imunidade às próprias toxinas, podendo representar uma vantagem seletiva entre possíveis espécies competidoras pelo mesmo *habitat* (Mannazzu et al., 2019).

Os primeiros relatos sobre esse fenótipo ocorreram em uma cepa de *S. cerevisia*e, sendo descoberta por Bevan e Makower no ano de 1963, em que descreveram que as cepas poderiam ser classificadas em um dos três fenótipos denominados: "*killer*" sendo produtora e secretora da toxina e são imunes a própria, "sensível" sendo suscetíveis à toxina e "neutro" que não produzem a toxina e também não são afetadas por ela. Para ação desta substância proteica há um espectro específico, dependente do pH, temperatura e condições específicas de aeração (Woods e Bevan, 1968). Existem 11 tipos de toxinas que são produzidas por *S. cerevisiae* (K1, K2, K28, Klus, KHR e KHS) e *S. paradoxus* (K1L, K21/K66, K45, K62 e K74) (Fredericks et al., 2021), ativas em (pH 4,6) e em temperaturas abaixo de 30 ºC (McBride, Greig e Travisano, 2008). Trata-se de um fenótipo relativamente comum em linhagens de leveduras isoladas em *habitats* naturais e industriais, com mais de cem espécies de leveduras *killer* abrangendo os gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Cyberlindnera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Tetrapisispora*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* e *Williopsis* (Klassen, Schaffrath e Buzzini, 2017; Carboni et al., 2021; Serviene e Serva, 2023). Essas leveduras têm sido exploradas para possível aplicação na produção e preservação de alimentos, assim como no controle biológico de patógenos (Kowalska, Krzymińska e Tyburski, 2022).

## 1.5. O gênero *Saccharomyces* como principal fermento cervejeiro

O gênero *Saccharomyces* foi descrito pela primeira vez por Meyer em 1838 e redefinido por Ress em 1870 a partir de observações de ascósporos e sua germinação. Suas subdivisões taxonômicas foram descritas baseadas em critérios morfológicos, genéticos e fisiológicos (Rainieri, Zambonelli e Kaneko, 2003; Alsammar e Delneri, 2020; Muxel, 2022) (**Tabela 4**).

A sua etimologia é derivada do latim, que significa "fungos do açúcar" derivado das palavras gregas *sakcharon* (açúcar) e *mykes* (fungo) (Stewart, 2014; Silva, 2019; Pereira, 2021). Por metabolizar diferentes carboidratos, estão fortemente relacionados a processos aplicados à indústria alimentícia e cervejeira, tais como espécies selvagens *S. paradoxus*, *S. arboricolus*, *S. eubayanus*, *S. uvarum* e *S. jurei*, *S. mikatae* (Forsythe, 2013; Martin e de Dea Lindner, 2022). *Saccharomyces cerevisiae* é a principal espécie utilizada como organismo modelo de células eucariontes dentre as oito espécies do gênero *Saccharomyces* (**Tabela 5**) (Karathia et al., 2011).

**Tabela 4** - Taxonômica de *Saccharomyces cerevisiae*

| **Categoria taxonômica** | **Classificação** |
|---|---|
| Reino | *Fungi* |
| Filo | *Eumycota* |
| Subfilo | *Ascomycotina* |
| Classe | *Hemiascomycetes* |
| Ordem | *Endomycetales* |
| Família | *Saccharomycetaceae* |
| Gênero | *Saccharomyces* |
| Espécie | *Cerevisiae* |

Fonte: Muxel, 2022

**Tabela 5** - Espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces*

| Espécies | Referências |
|---|---|
| *Saccharomyces arboricolus* | F.-Y. Bai e S.-A. Wang (2008) |
| *Saccharomyces bayanus* | Saccardo (1895) |
| | Naumov et al. (2000a) |
| *Saccharomyces cariocanus* | Naumov et al. (2000b) |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Meyen ex E. C. Hansen (1883) |
| *Saccharomyces eubayanus* | Libkinda et al. (2011) |
| *Saccharomyces kudriavzevii* | Naumov et al. (2000b) |
| *Saccharomyces mikatae* | Naumov et al. (2000b) |
| *Saccharomyces paradoxus* | Bachinskaya (1914) |
| *Saccharomyces pastorianus* | Hansen (1904) |

Fonte: Adaptado de Kurtzman, 2011

O genoma de *S. cerevisiae* tem 12 Mb (Cherry et al., 2012), conhecido por ser o primeiro microrganismo eucariótico a ter seu genoma integralmente sequenciado através da colaboração de 600 cientistas, no ano de 1996 (Goffeau et al., 1996; White e Zainasheff, 2022). Algumas cepas de *S. cerevisiae* e espécies relacionadas são usadas nas indústrias de cerveja, destilação, panificação e dificilmente formam ascósporos. A seleção contínua em relação a suas propriedades práticas parece causar perda de esporulação (Stewart, 2014).

O gênero abriga espécies geralmente encontradas em ambientes geográficos específicos (Naumov et al., 2000b), sendo de fácil manipulação e propagação em ambiente laboratorial, com curto tempo de geração (Zeyl, 2000). Ainda, possui grande relevância por sua fisiologia, que tem gerado maior exploração para desenvolvimento de produtos biotecnológicos de importância científica, alimentar, medicinal e agroindustrial (Jacques e Casaregola, 2008; Sicard e Legras, 2011). Por fim, sua similaridade com células eucarióticas humanas fez com que se tornasse um modelo de estudo para diferentes processos biológicos, como metabolismo (Brocard-Masson e Dumas, 2006), regulação da expressão gênica (Biddick e Young, 2009) e ciclo celular (Nasheuer et al., 2002), entre outras aplicações.

A maioria das espécies do gênero *Saccharomyces* são consideradas *status* GRAS (do inglês G*enerally Recognized as Safe*) de acordo com a legislação americana, e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) no contexto europeu. Em ambos os casos, estas determinações são atribuídas aos microrganismos que possuem segurança para serem aplicados na indústria de alimentos e bebidas (Martin e de Dea Lindner, 2022).

### 1.6. *Saccharomyces cariocanus*: aspectos gerais

A espécie *S. cariocanus* (*cariocanus*, referindo-se aos habitantes do Rio de Janeiro, conhecidos como "cariocas") foi isolada inicialmente de moscas-da-fruta do gênero *Drosophila willistoni*, que foi coletada na Floresta da Tijuca, um remanescente de reflorestamento do bioma da Mata Atlântica no Rio de Janeiro (Morais et al., 1992). Inicialmente foi identificada como *Saccharomyces cerevisiae,* com base em suas características fisiológicas (Barnett et al., 1983; Kurtzman et al., 2011).

Investigações posteriores envolvendo análises genéticas, cariótipo molecular e identificação molecular por meio de sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do gene 18S rRNA, juntamente com avaliações fisiológicas, levaram à descrição de uma nova espécie, *Saccharomyces cariocanus* UFRJ 50816$^{T}$ (Naumov et al., 2000b). Cepas equivalentes são encontradas em diversos bancos de dados como NCYC (National Collection of Yeast Culture) 2890, CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures) 7995, CBS 8841, DBVPG (Dipartimento Biologia Vegetale) 6860, PYCC (Portuguese Yeast Culture Collection) 5301.

De acordo com suas características fisiológicas, *S. cariocanus* difere de *S. cerevisiae* em sua incapacidade de fermentar maltose, sua capacidade de fermentar manitol (**Tabela 6**) e ausência de crescimento a 37 ºC (Naumov et al., 2000b; Vaughan-Martini e Martini, 2011). Segundo Kellis e colaboradores (2003) é possível que *S. cerevisiae* tenha divergido do ancestral comum de *S. paradoxus* e *S. cariocanus* há cerca de 5 a 10 milhões de anos.

**Tabela 6** - Características fisiológicas diferenciais de espécies do gênero *Saccharomyces*.

| **Espécies** | **Crescimento** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Inulina** | **Melibiose** | **Glicerol** | **Manitol** | **Maltose** | **37 ºC** |
| *S. cariocanus* | - | - | - | + | - | - |
| *S. cerevisiae* | - | - | V | - | + | + |
| *S. kudriavzevii* | + | - | V | V | + | - |
| *S. mikatae* | - | + | V | + | L | - |
| *S. paradoxus* | - | - | V | + | V | + |
| *S. pastorianus* | - | - | V | - | + | - |

"-": não fermentadora; "+": fermentadora; "V": fermentação variável; "L': fermentação lenta. Adaptado de Vaughan-Martini e Martini, 2011

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ) (Ferreira, 2017) baseados em sucessivas fermentações da estirpe UFRJ 50816$^{T}$ em mosto cervejeiro, resultaram na obtenção de estirpes

derivativas domesticadas e mais eficientes na fermentação do mosto, que foram denominadas: G01, S01 e D01.

A espécie apresenta células esféricas a ovoides, medindo entre 4 e 6 µm de diâmetro e se apresentam em pares ou isoladas (**Figura 2**). O crescimento em meio de cultura é observado após 48 h na temperatura de 24 ºC (Naumov et al. 2000b).

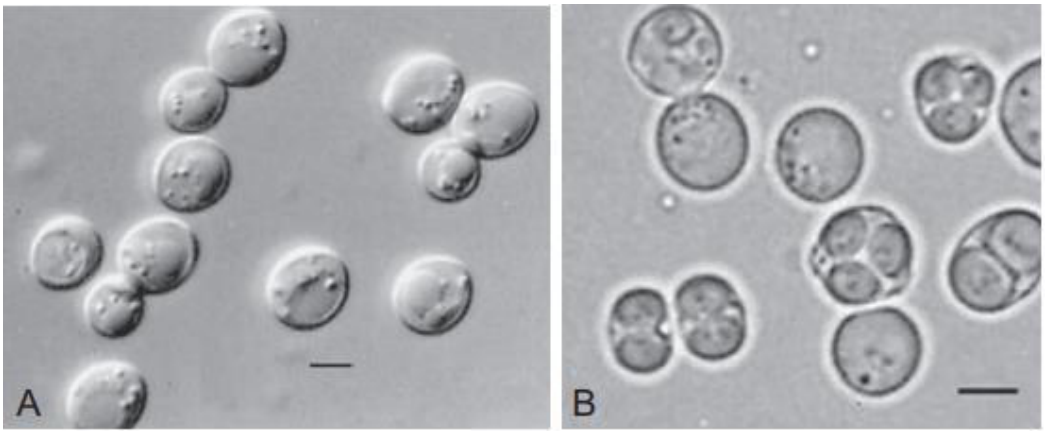



**Figura 2** - *Saccharomyces cariocanus* UFRJ 50816$^{T}$. A) Células de levedura em brotamento após 24 horas em meio YNBG (glicose 25 mM) a 25 ºC. B) Ascos persistentes com ascósporos após 2 semanas em caldo YM a 20 ºC. Barras = 5 µm. Fonte: Naumov et al. 2000b. Reprodução autorizada por *Copyright Clearance Center*® (Anexo 2).

Até o momento praticamente não existem estudos sobre a espécie *S. cariocanus*, principalmente sobre seu aproveitamento biotecnológico.

### 1.7. Inovações tecnológicas na produção de fermentos cervejeiros

A busca por inovações que otimizem o processo fermentativo e agreguem valor sensorial, tecnológico e econômico à produção de cerveja tem impulsionado o desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas na indústria cervejeira. Dentre essas estratégias, destaca-se a imobilização de leveduras (Araujo et al., 2021). A imobilização de leveduras em matrizes poliméricas, como alginato de cálcio, alginato-quitosana, carragenana e outros biopolímeros naturais (Canuto, 2012; Bolanos-Barbosa et al., 2023; Ribeiro et al., 2023), tem emergido como uma alternativa biotecnológica inovadora na produção de cerveja. Esta tecnologia protege as leveduras contra as forças de cisalhamento e mantém o rendimento de certos metabólitos, controlando a estabilidade celular (Moreno-Garcia et al., 2018). Outras vantagens são um melhor controle da fermentação, aumento da produtividade, reutilização celular e maior estabilidade dos microrganimos na presença de oxigênio e pH extremos (Griesang et al., 2018; Sadeghi et al., 2024). As partículas produzidas através da substância encapsulada e o

encapsulante geralmente apresentam diâmetros na medida de nanômetros à milímetros (Nedovic et al., 2011; Poreda et al., 2013).

O método de extrusão é um dos mais utilizados para produção dos encapsulados, no qual é produzido uma pequena gotícula forçada da solução encapsulada e encapsulante, através de fissuras em aparelhos geradores de gotas. O formato e a dimensão das gotículas sofrem influência da distância do gotejador e a superfície da solução encapsulante como o alginato, por exemplo (Bassani, 2018).

Entre os materiais encapsulantes, o alginato é normalmente utilizado para aprisionar células bacterianas e de leveduras (López-Menchero et al., 2021; Saberi et al., 2021). Sendo um polissacarídeo presente em algas marrons como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea*, o alginato é composto por blocos alternados de ácido β-D manurônico (M) e ácido α-L gulurônico (G) (**Figura 3**), que podem ser organizados em arranjos diferentes, como MG, MM, GG, dependendo do organismo e tecido no qual foi isolado. Suas propriedades mecânicas e físicas, que compreendem rigidez e resistência à compressão, dependem do tipo de arranjo que pode ser feito pelos blocos que formam sua cadeia polimérica, aumentando na ordem MG < MM < GG (Fernández-d Arlas, Castro e Eceiza, 2015; Hecht e Srebnik, 2016).

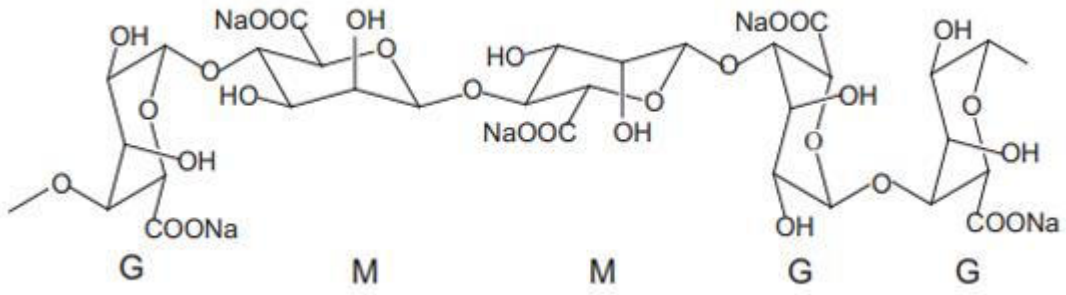



**Figura 3** - Estrutura do alginato de sódio. Fonte: Yang, Xie e He (2011). Reprodução autorizada por *Copyright Clearance Center*® (Anexo 3)

O alginato é frequentemente utilizado na indústria de alimentos (Avendaño-Romero, López-Malo e Palou, 2013) por apresentar características importantes para aplicação biotecnológica como ser atóxico, não afetar a viabilidade dos microrganismos e, na presença de íons de cálcio, produzir um reordenamento estrutural que forma um gel. Seu grau de gelificação depende da hidratação do alginato, da concentração dos íons de cálcio e da proporção de ácido gulurônico (Funami et al., 2009).

Estudos como o de Shopska, Dzhivoderova-Zarcheva e Kostov (2024) demonstraram que leveduras encapsuladas em microcápsulas de alginato e quitosana com núcleo líquido

apresentaram desempenho fermentativo eficiente na produção de cerveja tipo *lager*, com controle ajustável da cinética fermentativa por meio da manipulação da temperatura, concentração celular e gravidade do mosto, além de manter padrões sensoriais adequados e baixos níveis de compostos indesejáveis como aldeídos e dicetonas vicinais.

Comparações entre células livres e imobilizadas mostram que, embora o tempo de fermentação com células imobilizadas possa ser ligeiramente maior, o perfil sensorial da bebida é preservado, com potencial aumento na formação de ésteres e álcoois superiores (Naydenova, Kaneva e Kostov, 2013). Na mesma linha, Duarte et al. (2013) demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em esferas de alginato recobertas com quitosana manteve sua atividade fermentativa por até oito ciclos consecutivos, comprovando a viabilidade de reuso em processos industriais. Em contextos relacionados, como a produção de etanol, o uso de matrizes reforçadas com esponja vegetal associada ao alginato mostrou alta porosidade, resistência mecânica e eficiência de fermentação prolongada, indicando a aplicabilidade em sistemas contínuos e de alta gravidade (Talebnia e Taherzadeh, 2006). Além disso, a imobilização permite estratégias de bioengenharia para controle de perfis metabólicos e aromáticos, favorecendo a padronização de produtos especiais e a exploração de leveduras não convencionais (de Souza et al., 2022).

Nesse cenário, a técnica representa um avanço para a indústria cervejeira, ao unir sustentabilidade, inovação e precisão biotecnológica, especialmente em processos voltados à diferenciação sensorial, reaproveitamento celular e redução de custos operacionais, alinhando-se às demandas da produção cervejeira moderna e de base científica.

### 1.8. Seleção de novos fermentos cervejeiros

Um dos movimentos mais recentes em relação à inovação na produção de cervejas é a valorização de fermentos autóctones ou com identidade geográfica, alinhados ao conceito de *terroir* microbiano. Este movimento vem ganhando importância em projetos de pequenas e grandes cervejarias, como observado em programas de seleção de *Brettanomyces bruxellensis* com identidade regional (Menoncin e Bonatto, 2019; Di Canito et al., 2021).

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade, mas apresenta poucos estudos quanto à utilização de cepas isoladas de ambientes naturais, como frutas tropicais, flores e solos de seus biomas (Rosa et al., 2023). Avanços nas técnicas moleculares permitiram ampliar os critérios de seleção de cepas a partir de marcadores genômicos, transcriptômicos e metabólicos. Isso possibilita, por exemplo, a construção de cepas híbridas, como *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* (Hebly et al., 2015) com maior tolerância a fatores como baixa temperatura, lúpulo e eficiência

fermentativa (Liszkowska e Berlowska, 2021). Algumas dessas estirpes também podem ser geneticamente modificadas para a produção de compostos funcionais como GABA (ácido γ-aminobutírico), vitaminas ou antioxidantes, estabelecendo conexões com o mercado de alimentos funcionais (Sun, Kwak e Jin, 2019; Sadeghi et al., 2022).

O avanço da pesquisa em fermentos não convencionais, como *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri* e outras espécies de *Saccharomyces*, abre novas possibilidades para a inovação sensorial e tecnológica. Essas leveduras são exploradas por sua capacidade de modulação de acidez, produção de compostos aromáticos diferenciados e até mesmo ação antimicrobiana contra contaminantes indesejáveis (Holt et al., 2018; Kayadelen et al., 2023; Huang et al., 2024). Tal diversidade microbiana pode ser empregada de forma isolada ou em co-inoculação com fermentos clássicos (Minnar et al., 2019), ampliando a complexidade do produto final e oferecendo diferenciação mercadológica.

Esse movimento vem sendo impulsionado por um conjunto de fatores interligados, como a demanda por novos perfis sensoriais, o esgotamento criativo das linhagens comerciais tradicionais, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, o interesse crescente por produtos com identidade regional e principalmente, o reconhecimento do potencial da biodiversidade microbiana como diferencial competitivo. As cervejarias estão explorando esses caminhos de forma estratégica no isolamento de novos microrganismos com aplicação fermentativa em diferentes biomas, como a Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, que oferecem substratos naturais ideais para o isolamento de leveduras não convencionais, a partir de flores, cascas de frutas tropicais, seivas, abelhas, e exsudatos de árvores (Carvalho et al., 2024; Zapryanova et al., 2025) reforçando o conceito de "*terroir* microbiano".

Essa tendência reflete um movimento mais amplo dentro da indústria cervejeira global: o deslocamento do foco apenas tecnológico para uma abordagem biocultural da fermentação, onde a diversidade microbiológica é integrada à diversidade sensorial, cultural e geográfica. O uso de fermentos nativos pode contribuir para o desenvolvimento de novos estilos, linhas sazonais, edições limitadas e produtos com forte apelo mercadológico, além de valorizar atributos como autenticidade, inovação, complexidade aromática, e sustentabilidade (Gatrell, Reid e Steiger, 2018; Morgan, Lane e Styles, 2022).

Do ponto de vista técnico-científico, o estudo de novas leveduras cervejeiras também contribui para a ampliação do conhecimento sobre a ecologia microbiana fermentativa, a tolerância a etanol, a cinética de fermentação e os mecanismos de produção de metabólitos secundários com impacto sensorial. Leveduras como *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, entre outras, vêm sendo estudadas por apresentarem

bom desempenho fermentativo, baixa produção de álcoois superiores e geração de compostos aromáticos únicos, além de menor pH final, favorecendo a estabilidade microbiológica (Canonico et al., 2016; Domizio, 2016; Silva et al., 2020; Einfalt, 2021; Postigo, Esteban e Arroyo, 2023).

Assim, a bioprospecção de microrganismos autóctones e sua aplicação na fermentação cervejeira se alinham não apenas com os interesses de inovação da indústria, mas também com o uso sustentável da biodiversidade nacional e com a valorização do conhecimento científico como base para o desenvolvimento de novos produtos com identidade brasileira.

## 2. JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por cervejas especiais está diretamente relacionada à busca por novas experiências de consumo e pela valorização da cultura cervejeira, que vem se difundindo rapidamente em diversas regiões do Brasil e do mundo. O Brasil ocupa atualmente a terceira posição mundial tanto em produção quanto em consumo de cerveja, o que revela o potencial de expansão desse setor. Entretanto, a produção nacional de insumos essenciais para a fabricação de cerveja ainda é limitada, destacando-se a baixa disponibilidade de lúpulo e, sobretudo, de fermentos cervejeiros de origem local. Apesar do país ser reconhecido globalmente por sua biodiversidade, ainda não possui um estilo de cerveja que possa ser considerado tipicamente brasileiro.

Nesse contexto, o desenvolvimento de estudos sobre fermentos nacionais surge como oportunidade estratégica para diversificar o portfólio sensorial disponível ao consumidor e promover a criação de uma identidade cervejeira genuinamente nacional. Motivada por essa perspectiva, a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes iniciou investigações sobre o potencial de uma estirpe de *Saccharomyces cariocanus* isolada da Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Ensaios preliminares indicaram que a cepa apresenta características fermentativas capazes de produzir cervejas com perfil sensorial diferenciado, sugerindo um promissor potencial de aplicação industrial.

Esses resultados impulsionaram o aprofundamento das pesquisas, com foco na caracterização fisiológica e genética da estirpe, bem como na avaliação de técnicas de aplicação que viabilizem seu uso em escala industrial, como a imobilização de leveduras em alginato, método considerado de baixo custo, seguro, biocompatível e capaz de preservar a atividade metabólica das células. Essa técnica representa uma alternativa atrativa para microcervejarias e indústrias, uma vez que pode otimizar o processo de fermentação, reduzir custos de propagação e permitir maior reuso celular.

Trata-se, portanto, de um estudo pioneiro, uma vez que há escassez de informações científicas sobre os aspectos fisiológicos, genéticos e tecnológicos de *S. cariocanus*. Além de contribuir para a valorização da biodiversidade microbiana brasileira, o trabalho busca desenvolver um produto biotecnológico nacional como alternativa ao fermento importado, fornecendo ainda dados aplicáveis ao uso de leveduras imobilizadas em escala industrial, com potencial de impactar positivamente a eficiência e a economia dos processos cervejeiros.

## 3. OBJETIVO GERAL

Estudar as características fisiológicas, genômicas e sensoriais da levedura *Saccharomyces cariocanus* G01 visando avaliar seu potencial como um novo fermento cervejeiro, contribuindo para a inovação na produção de cervejas.

## 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de fermentação dos diferentes carboidratos presentes no mosto cervejeiro e em diferentes temperaturas
- Determinar a resistência da levedura *S. cariocanus* ao etanol e ao lúpulo
- Determinar o perfil de floculação da levedura
- Avaliar possível atividade *killer* e produção de fosfolipases
- Analisar a tolerância da levedura a elevadas concentrações de glicose
- Propor um meio de cultura diferencial para identificação de *S. cariocanus*
- Avaliar a produção da cerveja com a levedura imobilizada em alginato de sódio
- Produzir a cerveja com a levedura *S. cariocanus* G01
- Sequenciar o genoma da estirpe para busca de genes de interesse biotecnológico

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Fluxograma de trabalho

Do ponto de vista prático, o presente trabalho envolveu uma série de etapas que contribuíram para a caracterização da estirpe *S. cariocanus* G01 no que diz respeito a seus aspectos fisiológicos e de aplicação biotecnológica. A **Figura 4** apresenta esquematicamente a abordagem metodológica aplicada, que será detalhadamente descrita a seguir.

### 4.1.1. Linhagens de leveduras

O estudo investigará o potencial da estirpe de levedura *Saccharomyces cariocanus* G01. Esta estirpe foi isolada como *S. cerevisiae* em moscas-das-frutas do gênero *Drosophila*, coletada na Floresta da Tijuca, que corresponde a um bioma da Mata Atlântica no Rio de Janeiro - Brasil (Morais et al., 1992). A estirpe foi posteriormente identificada como uma nova espécie (Naumov et al., 2000b). Outras estirpes de *S. cariocanus,* isoladas na mesma ocasião*,* assim como de outros gêneros e espécies estão listadas no **Quadro 3**. Todas elas são pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ - Rio de Janeiro, Brasil). Duas linhagens de leveduras cervejeiras comerciais SafAle$^{TM}$ US-05 (*S. cerevisiae*/*Ale*) e Nottingham LalBrew® (*S. cerevisiae*/*Ale*) foram usadas como controle nos experimentos.

### 4.1.2. Reativação e preservação de leveduras

As linhagens armazenadas em glicerol à 4 ºC foram reativadas em tubos com tampa de rosca contendo 5 mL de caldo YPD (1 % (p/v) extrato de levedura (Himedia, Kennett-Square, EUA), 2 % (p/v) peptona (Kasvi, Espanha), 2 % (p/v) glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha) esterilizados. Para isso, foram transferidos 100 µL da cultura homogeneizada para os tubos, seguido de incubação a 24 ºC por 48 horas antes de iniciar os ensaios.

A preservação das linhagens foi realizada em microtubos tipo *Eppendorf* contendo 500 µL da cultura reativada e 500 µL de glicerol 30 % (p/v), homogeneizados e armazenados em ultra-freezer a -80 ºC.

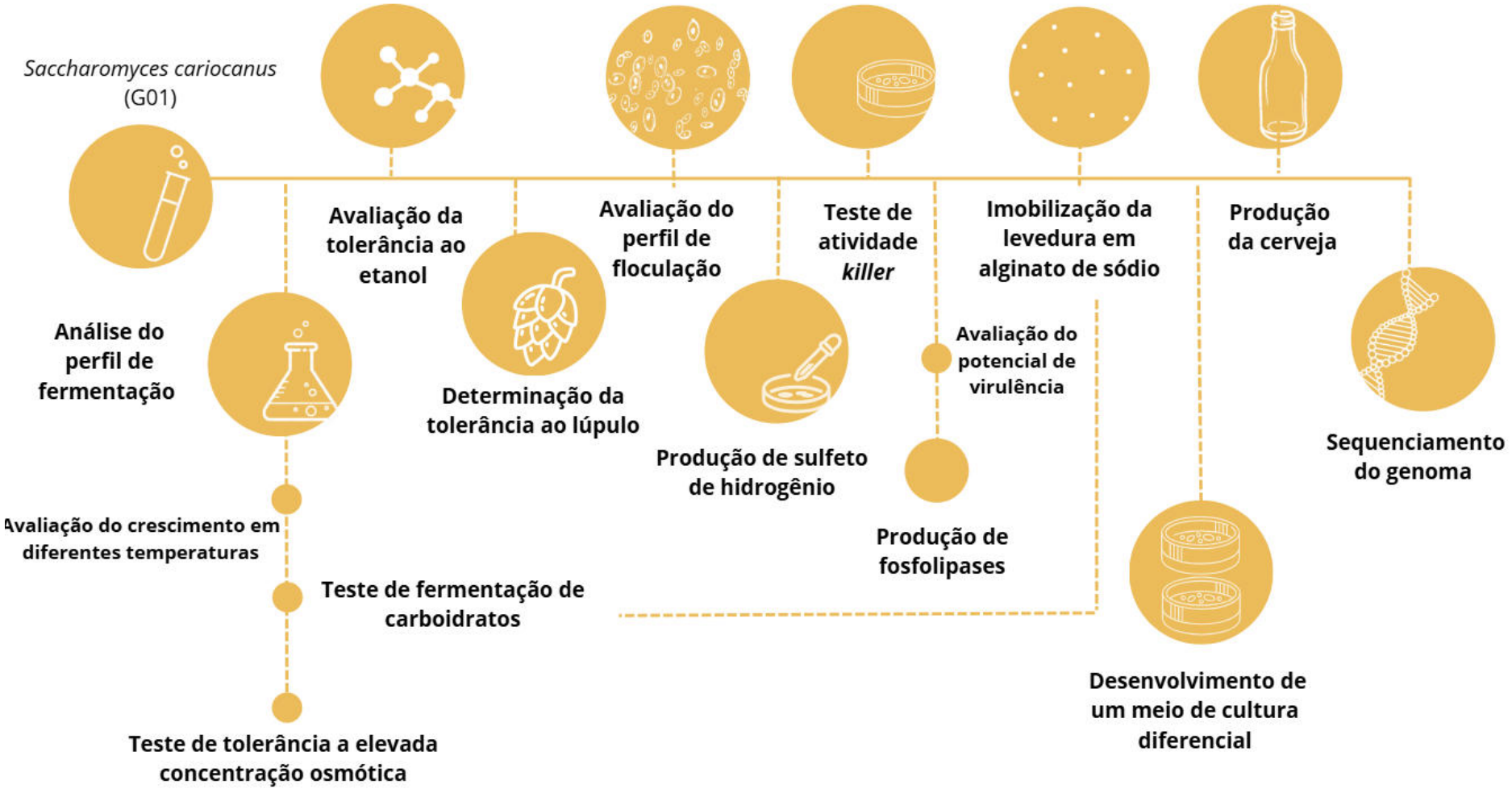



**Figura 4** - Fluxograma de trabalho

**Quadro 3** - Lista de leveduras utilizadas no estudo

| Espécies | Cepas | Fonte de isolamento |
|---|---|---|
| *S. cariocanus* | UFRJ[1] 50816$^T$ | *Drosophila willistoni*, Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, Brasil |
| | G01 | Derivativa de UFRJ[1] 50816$^T$ |
| | D01 | |
| | S01 | |
| | UFRJ[1] 50791 | *Drosophila* sp., Ponta do Catalão, Rio de Janeiro, Brasil |
| *S. cerevisiae* | SafAle$^{TM}$ US-05 | *Fermentis*, França |
| | Nottingham LalBrew® | *Lallemand Yeast Culture Collection*, Dinamarca |
| | 50605 | Xerez, Andaluzia, Espanha |
| | 50606 | Água de estuário poluído, Rio de Janeiro, Brasil |
| | 51599 | Desconhecida |
| *Nakaseomyces glabrata* | IMUFRJ[1] 50083 | Humano |
| *Candida albicans* | ATCC[2] 10231 | Humano (Broncomicose) |
| *Cyberlindnera subsufficiens* | IMUFRJ[1] 50442$^T$ | Solo, Floresta Amazônica, Estação Ecológica de Maracá, Roraima, Brasil |

[1]UFRJ Coleção de culturas do Instituto de Microbiologia Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. ATCC[2] *American Type Culture Collection*.

### 4.1.3 Preparo do inóculo

Antes de cada experimento os isolados foram semeados em ágar YPD (1% (p/v) extrato de levedura (Himedia, Kennett-Square, EUA), 2 % (p/v) peptona (Kasvi, Espanha), 2 % (p/v) glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha) 1,5 % (p/v) de ágar (Kasvi, Espanha)), utilizando a técnica de esgotamento para verificação de pureza e incubados a 24 ºC por 48h.

### 4.2. Teste de fermentação de carboidratos

A capacidade da cepa *S. cariocanus* G01 em fermentar os principais açúcares presentes no mosto cervejeiro e foi testada em tubos contendo de 4 mL de YP (1 % (p/v) extrato de levedura, 2 % (p/v) peptona) com os diferentes açúcares (glicose, maltose e sacarose) e manitol, ambos na concentração de 2 % (p/v) para os respectivos testes e adicionado de 0,001 % (v/v) de azul de bromotimol como indicador ácido/base. No interior dos tubos foram colocados tubos de Durham invertidos. O meio foi inoculado com $10^6$ células/mL de leveduras. Os cultivos foram realizados em triplicata a 24 °C por 10 dias (Vaštík et al., 2023). A fermentação foi considerada positiva na presença de bolhas dentro do tubo de Durham e mudança da cor do indicador de pH 6,5 (verde) para pH < 6 (amarelo) sinalizando a acidificação do meio. Para este teste foram utilizadas as cepas de *S. cariocanus* D01, S01, UFRJ 50816$^T$ e UFRJ 50791. Assim como as cepas de *S. cerevisiae* 51599, 50605 e 50606, além das cepas comerciais SafAle$^{TM}$ US- 05 e Nottingham LalBrew®.

### 4.3. Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

O pré-inóculo foi realizado de acordo com o item (4.1.3). Após o crescimento a absorbância foi ajustada para (DO $_{600nm}$) inicial entre 0,1 e 0,15 e posteriormente foram inoculados 1 mL da suspensão em 10 mL de YPD e as leveduras foram incubadas nas temperaturas de 17, 24, 28 e 37 ºC. As leituras foram realizadas em 12, 24, 48 e 72h em absorbância de 600 nm (Pinto, 2018). Como controle foram utilizadas SafAle$^{TM}$ US-05 (*S. cerevisiae/Ale*) e Nottingham LalBrew® (*S. cerevisiae/Ale*). As leveduras são consideradas adequadas para o processo fermentativo caso apresentem valores de crescimento ≥ 0,4 (Methner, 2019; Silva, 2022).

### 4.4. Avaliação do potencial de virulência (temperatura de crescimento) das leveduras cervejeiras

A avaliação da multiplicação em diferentes temperaturas foi realizada em ágar YPD. As amostras foram padronizadas para uma turbidez de 0,5 na escala de *McFarland* (equivalente a 1 x $10^6$ a 5 x $10^6$ UFC/mL) e submetidas a diluições seriadas na proporção 1:10, nas concentrações de $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$ e $10^{-4}$. Em seguida, 10 µL de cada diluição foram inoculados na superfície das placas contendo o meio e incubadas por até 5 dias nas temperaturas de 28, 37, 39, 42 e 49 °C, conforme metodologia adaptada de Lopes (2016).

### 4.5. Teste de tolerância a elevada concentração osmótica

A capacidade de crescimento da levedura *S. cariocanus* G01 em altas concentrações de glicose, foi avaliada seguindo o protocolo de Vaštík e colaboradores (2023). O pré-inóculo foi realizado a partir de pré-cultivos das leveduras em caldo YPD por 48 h à 24 ºC. Posteriormente foram inoculados 500 µL na concentração $10^6$ células/mL em 5mL de caldo extrato de levedura (10 g/L) adicionado de concentrações de (0, 1, 2, 5, 10, 30, 50 %) glicose (p/v) e incubados à 24 °C por 5 dias. Ao final, os tubos foram analisados em espectrofotômetro (modelo K37-VIS-Kasvi) para determinação da densidade óptica (DO $_{600nm}$). Neste ensaio foram utilizadas as cepas comerciais SafAle$^{TM}$ US-05 e Nottingham LalBrew®. Como controle foi utilizado um tubo de cada concentração sem o inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicada.

### 4.6. Avaliação da resistência ao etanol

A avaliação da levedura *S. cariocanus* G01 a resistência ao etanol foi realizada segundo Furlan (2016) com modificações. O pré-inóculo foi realizado de acordo com o Item (4.1.3), e posteriormente a levedura *S. cariocanus* G01 e os controles SafAle$^{TM}$ US-05 e Nottingham LalBrew® foram inoculados de modo a se obter entre 0,01 e 0,02 na absorbância ($DO_{600nm}$) em tubos contendo 10 mL de meio YPD com etanol nas concentrações de 0; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 % (v/v). Os tubos foram incubados à 24 ºC por até 48 h. Os resultados foram avaliados em 24 e 48 h de incubação coletando alíquotas em triplicata de 1000 µL e realizado leitura na DO $_{600nm}$. O ensaio foi realizado em triplicata. As leveduras são consideradas adequadas para o processo fermentativo caso apresentem valores de crescimento $\geq$ 0,4 (Methner, 2019; Silva, 2022).

### 4.7. Teste de resistência ao lúpulo

O teste foi realizado segundo Belutt et al., (2018), com modificações. Três tubos de ensaio contendo 5 mL de extrato de malte em pó 7,5 % (Himedia, Estados Unidos) foram ajustados para 0 (controle), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 IBU de iso-α-ácidos, no qual 1 unidade de IBU correspondeu a 0,4 g/100 L respectivamente, de iso-α-ácidos a 30 % (Prodooze, Mogi das Cruzes, São Paulo). O inóculo foi ajustado para a absorbância de (DO $600_{nm}$) inicial de 0,03. Cada tubo foi inoculado 500 µL e incubado a 24 °C durante 72 h. Os resultados foram avaliados coletando alíquotas em triplicata de 1000 µL na absorbância medida a $600_{nm}$ . As cepas comerciais *S. cerevisiae* SafAle$^{TM}$ US-05 e Nottingham LalBrew® foram utilizadas como controle. O ensaio foi realizado em triplicata. As leveduras são consideradas

adequadas para o processo fermentativo caso apresentem valores de crescimento ≥ 0,4 (Methner, 2019; Silva, 2022).

### 4.8. Avaliação da capacidade de floculação

Para determinação da capacidade de floculação, foi aplicado o teste de Helms modificado (D'Hautcourt e Smart, 1999). Para isso, a levedura *S. cariocanus* G01 e as leveduras comerciais SafAle$^{TM}$ US-05 e Nottingham LalBrew® foram cultivadas em YPD a 30°C, sob agitação a 200 rpm, por 72 horas. Após o crescimento das culturas, as células, na concentração de $10^8$ células/mL ($DO_{600nm}$ 0,35 – 0,4), foram lavadas com água destilada e ressuspensas em tampão de lavagem, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L). Após centrifugação a 10.000 RPM, as células foram ressuspensas em tampão, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L), acetato de sódio (6,8 g/L), ácido acético glacial (4,5g/L), e etanol 4 % a um (pH 4,5). Como controle, as células foram ressuspensas em EDTA 0,5M (pH 7,0). As células foram submetidas a agitação em vórtex (modelo K40-1010, Kasvi, Curitiba, Brasil), seguido de um período de sedimentação de 15 minutos. Alíquotas de 100 µL de sobrenadante para cada amostra foram retiradas e depois suspendidas em 900 µL de água destilada para realizar a leitura de absorbância a $DO_{600nm}$. Para cada cepa, foram utilizadas três réplicas e o percentual de floculação foi determinado para três determinações independentes pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Floculação} = \frac{DO_{600} \text{ controle} - DO_{600} \text{ experimental}}{DO_{600} \text{ controle}} \times 100$$

A interpretação dos valores percentuais de floculação, foi realizada com base nos critérios estabelecidos por ASBC (1992), que classifica as leveduras em três categorias: "muito floculantes" quando apresentam floculação entre 85 e 100 %; "moderadamente floculante", com valores entre 20 e 80 % e "não floculantes", quando a floculação é inferior a 20 %.

### 4.9. Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H2S)

A avaliação da produção de $H_2S$ foi realizada pela utilização de meio *Bismuth Sulfite Agar* (HiMedia, Estados Unidos), segundo a metodologia proposta por Jiranek e colaboradores (1995). As leveduras cervejeiras comerciais SafAle$^{TM}$ US-05 e Nottingham LalBrew® foram utilizadas nesta análise e *Candida albicans* ATCC 10231 como controle positivo.

O inóculo no meio de cultivo foi realizado pela técnica de esgotamento a partir de pré-cultivos por 48 h à 24 ºC realizados em caldo YPD. Cada levedura foi semeada em placa com

*Bismuth Sulfite Agar* e incubada a 24 °C por seis dias em triplicata. O crescimento de colônias brancas ou cremes são consideradas não produtora de gás; colônias beges representam baixa produção; colônias marrons uma produção média e o crescimento de colônias de coloração preta demonstram alta produção de ácido sulfídrico, gás indesejado na produção de cerveja (Ono et al, 1991; White e Zainasheff, 2022).

### 4.10. Teste de atividade *killer*

A caracterização do fator *killer* na levedura *S. cariocanus* G01, foi realizada de acordo com a metodologia de Ponzzes et al. (2007), na qual uma suspensão da levedura padrão de sensibilidade *Nakaseomyces glabrata* (IMUFRJ/50083) foi ajustada para 0,5 na escala de *McFarland* (equivalente a 1 x $10^6$ a 5 x $10^6$ UFC/mL) e então semeada com o auxílio de um swab estéril na superfície de placas ágar YEPD (1 % (p/v) de extrato de levedura, 2 % (p/v) de peptona e 2 % (p/v) de glicose) suplementado com azul de metileno a 0,003 %, tamponado com citrato-fosfato (pH 4,2) e incubadas a 24 ºC por 30 min.

Posteriormente foram realizadas suspensões das leveduras *S. cariocanus* G01, Nottingham LalBrew®, SafAle$^{TM}$ US-05, bem como a cepa padrão de produção da proteína *Killer, Cyberlindnera subsufficiens* (IMUFRJ/50442$^T$) como controle positivo, no qual foram ajustadas para 5,0 na escala de *McFarland* (equivalente a 1,5 x $10^9$ UFC/mL). Em seguida, as leveduras foram inoculadas 10 µL em *spot* sobre a superfície do meio contendo a cepa padrão de sensibilidade. As placas foram incubadas por 10 dias na temperatura de 24 ºC.

As estirpes utilizadas como padrão de sensibilidade e padrão de produção da proteína *killer* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM), localizado no Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ - Rio de Janeiro, Brasil.

### 4.11. Avaliação da produção de fosfolipase

A produção de fosfolipase foi determinada a partir do meio *Egg-Yolk*, utilizado para detectar a atividade lipolítica. Este meio consiste em Ágar *Sabouraud Dextrose* (Price et al. 1982), 11,7 g de NaCl, 0,111 g de CaCl2 e 10 % (v/v) de gema de ovo estéril em 184 mL de água destilada. As placas foram inoculadas com 10 µL de células das leveduras *S. cariocanus* G01, Nottingham LalBrew® e SafAle$^{TM}$ US-05 a partir de uma suspensão em 2,5 mL de

solução salina fisiológica estéril e incubadas a 30 °C por 7 a 10 dias. Neste ensaio a *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

### 4.12. Imobilização de leveduras em alginato de sódio

Este experimento foi realizado para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras imobilizadas. Para o processo de imobilização, as células propagadas em 300 mL de caldo YPD na concentração de $10^8$ células/mL foram centrifugadas (modelo RC2-B - Sorvall) a 4.000 x g durante 20 minutos a 4 ºC. Posteriormente na proporção de 20 % (p/v) a levedura foi adicionada a solução de alginato de sódio 1 % e 1,5 % (p/v) (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil).

Essa suspensão foi adicionada em uma seringa (20 mL) com agulha hipodérmica de 22 G (25x0,70mm) e gotejada na solução de cloreto de cálcio a 1 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) previamente esterilizada e sob agitação manual, conforme (**Figura 5**). A altura do gotejamento foi de 5 cm para formação de esferas de até 4,0 mm de diâmetro (Silva, 2018).

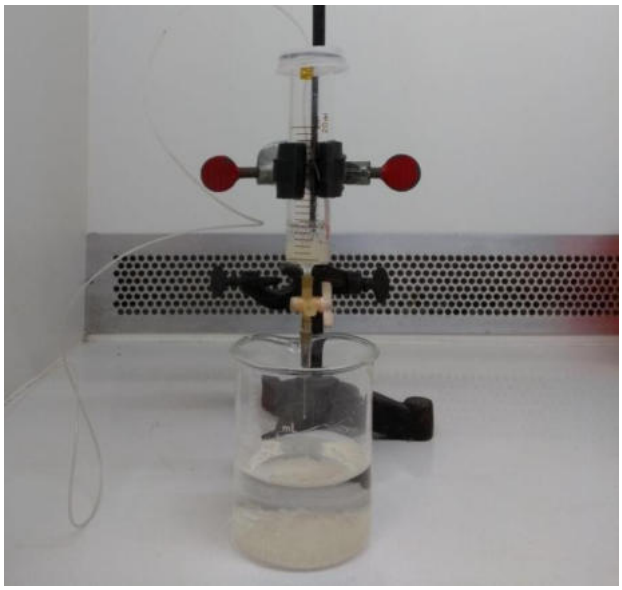


**Figura 5** - Montagem experimental para a imobilização de *S. cariocanus* G01 em alginato de sódio.

As esferas formadas foram mantidas por 2 h imersas na solução a temperatura de 4 ºC e posteriormente lavadas com água destilada esterilizada segundo Ortiz (2017).

As esferas contendo *S. cariocanus* G01 foram submetidas a caracterização físico-morfológica, avaliadas quanto ao diâmetro com o uso de um paquímetro (Maub Stainless, Polônia), peso em balança analitica (Modelo PR124BR, Ohaus, Estados Unidos), e coradas com cristal violeta (2 %) para observação em microscópio óptico (Opton®) na ampliação de 400x.

A concentração de células de levedura em cada esfera foi quantificada em quintuplicata. Para isso, cada esfera foi macerada em almofariz e posteriormente adicionados a 1 mL de solução salina 0,85 %, sendo então submetida à diluição seriada na proporção 1:10, até a concentração de $10^{-1}$. Em seguida, 10 µL da diluição foram aplicados em Câmara de Neubauer (HGB, Alemanha) para contagem celular. As esferas também foram submetidas a avaliação em diferentes fontes de carboidratos em duas concentrações de alginato de sódio (1 % e 1,5 %) seguindo a metodologia do Item 4.2.

### 4.13. Preparo do mosto cervejeiro

A elaboração da cerveja foi realizada segundo Toledo, Silveira e Capuci (2018). Foram utilizados 10 kg de malte do tipo Pilsen e 5 kg de malte Pale Ale previamente moídos.

Após a pesagem dos maltes, os mesmos foram adicionados a uma panela de brassagem com 45 L de água potável não clorada para iniciar o processo de brassagem a 63 ºC por 60 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada a 67 ºC durante 30 minutos. E, para inativação das enzimas responsáveis pela conversão do amido (*mash out*), a temperatura foi mais uma vez elevada à 78 ºC durante 10 minutos. Após isso, o mosto foi adicionado de 45 g de lúpulo variedade Cascade (Barth Haas, Estados Unidos) e 40 g de variedade Saaz (Lúpulos 1000ALT, Rio Grande do Sul, Brasil) sendo fervido por 60 minutos. O resfriamento do mosto foi realizado com uma serpentina com água gelada circulante, imersa no mosto quente para atingir a temperatura de 25 ºC. Ao ser resfriado, o mosto foi coletado (45 litros) e transferido para um fermentador plástico com capacidade de 55 litros. Para os testes foram utilizados dois lotes de 5 litros, um lote com inóculo de $10^8$ células/mL de levedura *S. cariocanus* livre, e um outro lote com $10^8$ células/mL de levedura imobilizada em alginato de sódio a 1,5 %. Os fermentadores foram incubados em temperatura de 17 ºC por 13 dias. Após o tempo de fermentação, foi iniciado o processo de maturação à 4 ºC durante 27 dias. Durante toda a fermentação a densidade do mosto foi monitorada manualmente por refratometria óptica (modelo RHB0-90, Mylabor, São Paulo, Brasil). A partir destes dados também foi calculado o ABV (*Alcohol by volume*) de acordo com Pinto (2018).

As medidas foram expressas em grau °Brix e convertidas para densidade em g/cm³. Após, foram calculadas as medidas de atenuação aparente e ABV estimado pelas fórmulas:

$$\% \text{ Atenuação aparente} = \frac{\text{sólidos solúveis do mosto - sólidos solúveis final}}{\text{sólidos solúveis do mosto}} \times 100$$

% ABV estimado = (sólidos solúveis do mosto - sólidos solúveis final) x 131,25

A carbonatação foi gerada por fermentação no envase (priming). Para tal, foram adicionados 6,5 g/L de açúcar refinado, a bebida envasada em garrafas de 600 mL e mantida por até 7 dias para a completa gaseificação.

### 4.14. Desenvolvimento de um meio de cultura diferencial

Para fins de diferenciação de leveduras das espécies *S. cariocanus* e *S. cerevisiae* foi utilizado ágar YP (peptona 2 % (p/v), extrato de levedura 1 % (p/v) e ágar 1,5 % (p/v), com adição de indicador de pH azul de bromotimol 0,001 % (p/v) e manitol 2 % (p/v) baseado no perfil de fermentação da levedura previamente estabelecido na literatura (Vaughan-Martini e Martini, 2011). A avaliação da funcionalidade do meio de cultura foi realizada pelo inóculo por esgotamento em superfície dos seguintes microrganismos: *S. cariocanus* G01, D01, S01, UFRJ 50816$^{T}$, UFRJ 50791 e as leveduras cervejeiras comerciais *S. cerevisiae* Nottingham LalBrew® e SafAle$^{TM}$ US-05. As placas foram incubadas a 24 ºC durante 48 h. O teste foi considerado positivo pela viragem da coloração do meio de azul-esverdeado para amarelo.

### 4.15. Caracterização molecular da estirpe: extração do DNA e sequenciamento

O DNA genômico de *S. cariocanus* G01 foi extraído utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega), seguindo as instruções do fabricante, com modificações. A pureza do DNA foi avaliada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram liofilizadas e 20 mg de cada amostra de levedura foram adicionados a tubos de 2,0 mL, com uma etapa de lise mecânica com esferas (1 min a 1500 rpm e 1 min em gelo, repetida por três vezes), seguida de incubação em 300 µL de solução de lise a 37 ºC por 60 min. Para a precipitação do DNA, as amostras foram incubadas a -20 ºC por 1 hora. Uma lavagem dupla foi realizada com etanol a 70 % e a etapa de reidratação do DNA foi realizada por 30 minutos a 37 ºC. O DNA foi quantificado com um fluorômetro Qubit 4 utilizando o Kit de Ensaio de Alta Sensibilidade Qubit™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific). O Kit Illumina DNA Prep foi utilizado para preparar uma biblioteca de extremidades pareadas (2 × 150 pb). O sequenciamento foi conduzido em uma plataforma Illumina NextSeq 550 utilizando um cartucho de saída média de 300 ciclos, durante uma corrida de 26 horas. Todo o processo foi realizado em parceria com o Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras, localizado no Parque Tecnológico na Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ.

As análises de sequenciamento foram realizadas em parceria com o Me. João Ricardo Vidal Amaral, do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM/UFRJ). A qualidade das leituras de sequenciamento foi avaliada usando FastQC v0.12.1 (Andrews e Babraham, 2013). Adaptadores Illumina e leituras de baixa qualidade (pontuação Phred < 30) foram removidos usando Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014). A montagem do genoma foi realizada com SPAdes v4.2.0 (Bankevich et al., 2012) de modo isolado. Para avaliar a qualidade da montagem do genoma, foi usado QUAST v5.0.2 (Gurevich et al., 2013) e BUSCO v5.8.2 (Simão et al., 2015) foi empregado para avaliar a completude do genoma, usando o conjunto de dados da linhagem saccharomycetaceae_odb12.

### 4.15.1. Anotação Funcional

O genoma de *S. cariocanus* G01 foi anotado utilizando pipeline Funannotate v1.8.17 (Palmer, 2020) para genomas eucarióticos. Primeiramente, foi aplicado softmasks em regiões repetitivas na montagem para manter apenas contigs únicos. Em seguida, foi realizada a predição de quadros de leitura abertos, utilizando o algoritmo Augustus, que foi treinado com o genoma de *S. cerevisiae* S288C. Após a predição genética, os genomas foram anotados no script Funannotate, utilizando bancos de dados publicamente disponíveis, como Pfam, CAZYmes, MEROPS, BUSCO e UniProt/SwissProt. A ferramenta egg-NOG-mapper v2 (Cantalapiedra et al., 2021) foi utilizada para identificar clusters de grupos ortólogos (COGs) nos arquivos fasta de proteínas gerados pelo pipeline Funannotate. O banco de dados UniProt foi empregado para pesquisar e recuperar informações funcionais adicionais sobre as proteínas relacionadas à maltose e proteínas relacionadas aos compostos de aroma e sabor.

### 4.15.2. Identificação filogenética

Como primeiro passo na análise filogenética, o genoma da cepa G01 foi submetido a uma busca BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados UNITE (Abarenkov et al., 2024) para identificar correspondências para a região (ITS). Após a confirmação de que o genoma da cepa G01 apresentou alto grau de identidade com *S. cariocanus*, procedemos as comparações de genomas completos de espécies *Saccharomyces* (n = 9; Quadro 4) usando o algoritmo FastANI (Jain et al., 2018). Após essas análises preliminares, uma análise de sequência multilocus (MLSA) foi conduzida como uma análise filogenética robusta. Além da cepa G01, outras espécies de *Saccharomyces* (n = 9) e *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 foram incluídas para construir a árvore filogenética

(**Quadro 4**), com *Kluyveromyces lactis* servindo como um grupo externo para enraizar a árvore. Cinco regiões genômicas foram usadas para criar a sequência concatenada para a análise filogenética: a região (ITS), os genes de rRNA da subunidade pequena (SSU) e da subunidade grande (LSU), o gene do fator de elongação da tradução 1A (*TEF1*) e o gene da subunidade *RPB2* da RNA polimerase II direcionada ao DNA (*RPB2*). O banco de dados UNITE, foi usado para recuperar sequências ITS dos genomas selecionados, enquanto o banco de dados SILVA (Quast et al., 2012) foi empregado para obter as sequências SSU e LSU. As sequências dos genes *TEF1* e RPB2 para a cepa G01 foram extraídas do arquivo de anotação obtido pelo pipeline Funannotate v1.8.17, enquanto as sequências *TEF1* e *RPB2* para os outros genomas foram adquiridas de arquivos de anotação existentes disponíveis no banco de dados NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*).

**Quadro 4**. Genomas usados na análise de sequências multilocus para identificação filogenética e seus respectivos números de acesso no NCBI.

| **Genomas** | **Números de acesso** |
|---|---|
| *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 | GCF_000002515 |
| *Saccharomyces bayanus* FM677 | GCA_019431265 |
| *Saccharomyces cerevisiae* S288C | GCF_000146045 |
| *Saccharomyces eubayanus* UCD646 | GCA_946408725 |
| *Saccharomyces jurei* UoM1 | GCA_900290405 |
| *Saccharomyces kudriavzevii* IFO1802 | GCF_947243775 |
| *Saccharomyces mikatae* IFO1815 | GCF_947241705 |
| *Saccharomyces paradoxus* LL2011-004 | GCA_030035175 |
| *Saccharomyces pastorianus* W34/70 | GCA_013179845 |
| *Saccharomyces uvarum* ZP964 | GCA_947243795 |

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o algoritmo MAFFT (Katoh e Standley, 2013). Os alinhamentos resultantes foram analisados manualmente e concatenados em uma supersequência (6,014 pb) contendo as cinco regiões mencionadas anteriormente. As relações filogenéticas entre *Saccharomyces* spp. e *Kluyveromyces lactis* foram reconstruídas utilizando o software MEGA 11 (Tamura, Stecher e Kumar, 2021). Uma análise de máxima

verossimilhança foi realizada com 1.000 réplicas bootstrap, utilizando o modelo Tamura de 3 parâmetros (TN92) com distribuição gama e proporção de sítios nucleotídicos invariantes.

### 4.15.3. Disponibilidade de dados

Este projeto utilizou o método de sequenciamento shotgun do genoma completo e as sequências foram depositadas no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso JBPAFT000000000. O BioProject tem o número de acesso PRJNA1270403 e o BioSample tem o número de acesso SAMN48825063.

## 4.16. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad prism* 8.0.2. Para a análise de variância de dois fatores (*Two-way* ANOVA), seguida do teste de *Tukey* com o objetivo de identificar diferenças significativas entre as médias dos controles e da levedura *S. cariocanus* G01.

# 5. RESULTADOS

## 5.1. Avaliação da fermentação de fontes de carboidratos

Os resultados da capacidade de fermentação de glicose, sacarose, maltose e manitol foram expressos na **Tabela 7**. A levedura *S. cariocanus* (G01) fermentou a glicose, sacarose e maltose a partir de 48 h após o inóculo, bem como fermentou manitol ao longo de 7 dias de incubação. Entretanto, ela apresenta um perfil diferente das leveduras de sua espécie, ao fermentar maltose.

**Tabela 7 -** Capacidade de fermentação de glicose, sacarose e maltose por leveduras *S. cariocanus* e *S. cerevisiae* em 24 h, 48 h, 72 h e de manitol após 7 dias.

| **Leveduras** | **Glicose** | | | **Sacarose** | | | **Maltose** | | | **Manitol** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 7 dias |
| *S. cariocanus* | | | | | | | | | | |
| G01 | - | + | + | - | + | + | - | **+** | **+** | + |
| S01 | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + |
| D01 | - | + | + | - | + | + | - | - | **-** | + |
| UFRJ 50816T | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + |
| UFRJ 50791 | - | + | + | **-** | **+** | **+** | **-** | **-** | **+** | **+** |
| *S. cerevisiae* | | | | | | | | | | |
| 50606 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | **+** |
| 51605 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 51599 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Nottingham | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| LalBrew® SafAle™ US-05 | + | + | + | **+** | + | + | **+** | + | + | **-** |

Interpretação:"+" indicativo de fermentação positiva (produção de gás e acidificação). "-" indicativo de ausência de fermentação (produção de gás e acidificação não detectada).

## 5.2. Análise do crescimento em diferentes temperaturas

No teste com as diferentes temperaturas, *S. cariocanus* G01 mostrou uma capacidade de multiplicação semelhante aos fermentos cervejeiros comerciais, embora tenha apresentado numericamente uma menor alteração na leitura da absorbância. Exceto para a temperatura de 37 ºC, onde *S. cariocanus* G01 não foi capaz de se multiplicar (**Figura 6**). Ainda que a estirpe SafAle™ US-05 tenha mostrado uma ligeira vantagem na média de seu crescimento, na temperatura de 37 ºC os dois fermentos comerciais mostraram comportamento diferentes ao longo da fermentação.

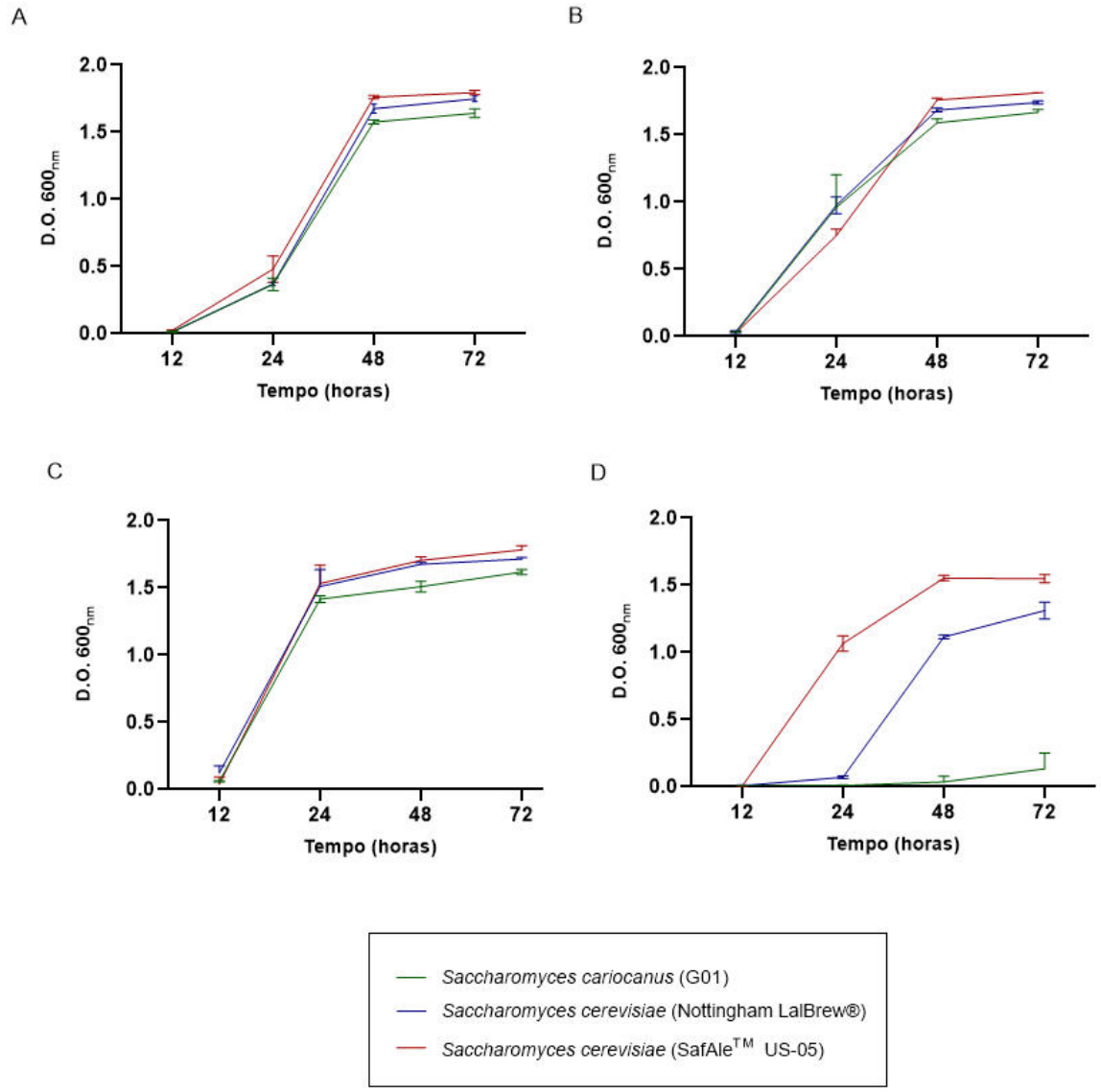



**Figura 6** - Média e desvio padrão do crescimento de *S. cariocanus* G01 (representada pela linha verde), *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew® representada pela linha azul) e SafAle™ US-05 (representada pela linha vermelha) em 12, 24, 48 e 72h em diferentes temperaturas A) 17 ºC; B) 24 ºC; C) 28 ºC; D) 37 ºC.

*Saccharomyces cariocanus* G01 mostrou média significativamente menor (0,8994) que o grupo controle com relação ao seu crescimento em 17 ºC. Em comparação com a levedura *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) e média (0,9517). Com relação a *S. cerevisiae* SafAle™ US-05, a diferença foi de ($p < 0,001$) e média (1,016), sendo a levedura que obteve a maior média entre os dois controles.

No crescimento em 24 ºC, a levedura G01 também apresentou média de crescimento menor (1,061), que a do grupo controle Nottingham LalBrew® (1,109) e US-05 (1,086). No

entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle, indicando desempenho semelhante nas condições testadas.

Já no crescimento em 28 ºC, *S. cariocanus* G01 também apresentou média (1,151) significativamente inferior a *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) (1,256) e *S. cerevisiae* SafAle$^{TM}$ US-05 (1,265). Nessa temperatura, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle, apresentando média estatisticamente semelhante.

Em temperatura de 37 ºC, *S. cariocanus* G01 apresentou valores de média inferiores aos dois grupos controles, com valor de (0,0464 e $p < 0,0001$). No qual a temperatura de 37 ºC não parece favorável ao seu crescimento, enquanto SafAle$^{TM}$ US-05 apresentou maior valor médio de crescimento.

### 5.3. Avaliação do potencial de virulência (temperatura de crescimento) das leveduras cervejeiras

A levedura *S. cariocanus* (G01), assim como os controles, não apresentou capacidade de multiplicação acima dos 42 ºC, considerado indicativo de potencial de patogenicidade do microrganismo (**Figura 7**) e (**Tabela 8**). Entretanto, *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) apresentou crescimento em 39 ºC, considerado por alguns autores a temperatura de alerta.

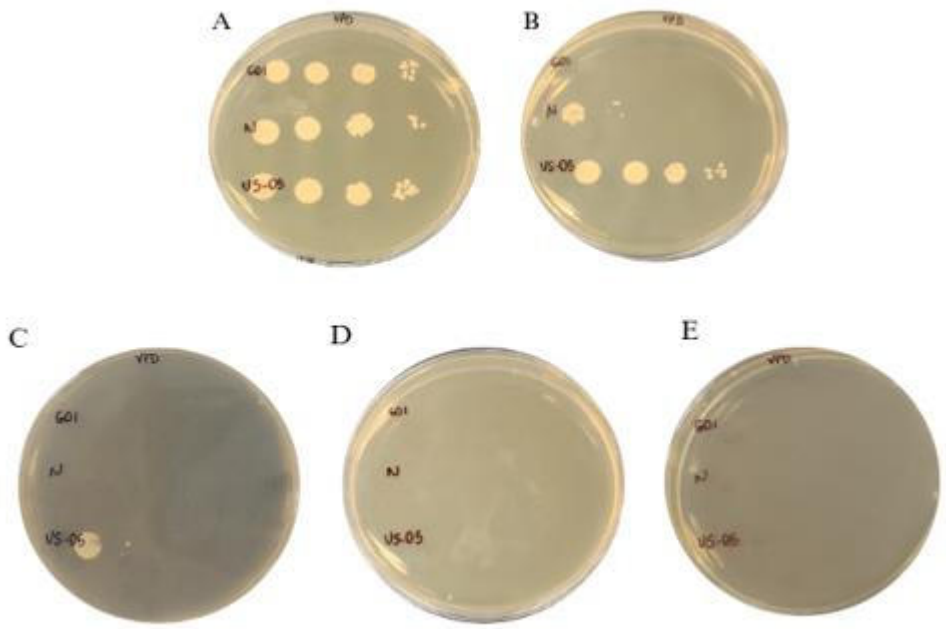



**Figura 7** - Avaliação da capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas em meio YPD, sendo A) 28 ºC; B) 37 ºC; C) 39ºC; D) 42 ºC e E) 49 ºC.

**Tabela 8** - Capacidade de multiplicação de leveduras em altas temperaturas

| **Leveduras** | **Inóculo inicial** | **Temperatura (ºC)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **28** | **37** | **39** | **42** | **49** |
| *S. cariocanus* | | | | | | |
| G01 | $5x10^4$ | + | - | - | - | - |
| | $5x10^3$ | + | - | - | - | - |
| | $5x10^2$ | + | - | - | - | - |
| | $5x10^1$ | + | - | - | - | - |
| *S. cerevisiae* | | | | | | |
| Nottingham LalBrew® | $5x10^4$ | + | + | - | - | - |
| | $5x10^3$ | + | - | - | - | - |
| | $5x10^2$ | + | - | - | - | - |
| | $5x10^1$ | + | - | - | - | - |
| SafAle™ US-05 | $5x10^4$ | + | + | + | - | - |
| | $5x10^3$ | + | + | - | - | - |
| | $5x10^2$ | + | + | - | - | - |
| | $5x10^1$ | + | + | - | - | - |

Interpretação: "+" indicativo de crescimento. "-" indicativo de ausência de crescimento.

### 5.4. Teste de tolerância a elevada concentração osmótica

A levedura *S. cariocanus* G01 apresentou osmotolerância, ainda que ligeiramente inferior aos microrganismos controles. O microrganismo foi capaz de crescer na concentração de 50 % de glicose (**Figura 8**). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 % de glicose entre *S. cariocanus* G01 em comparação com leveduras cervejeiras comerciais. Já na concentração de 30 %, G01 diferiu significativamente da levedura *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) ($p \leq 0,05$) e na concentração de 50 % de glicose *S. cariocanus* G01 diferiu de *S. cerevisiae* (SafAle US-05) com ($p \leq 0,05$).

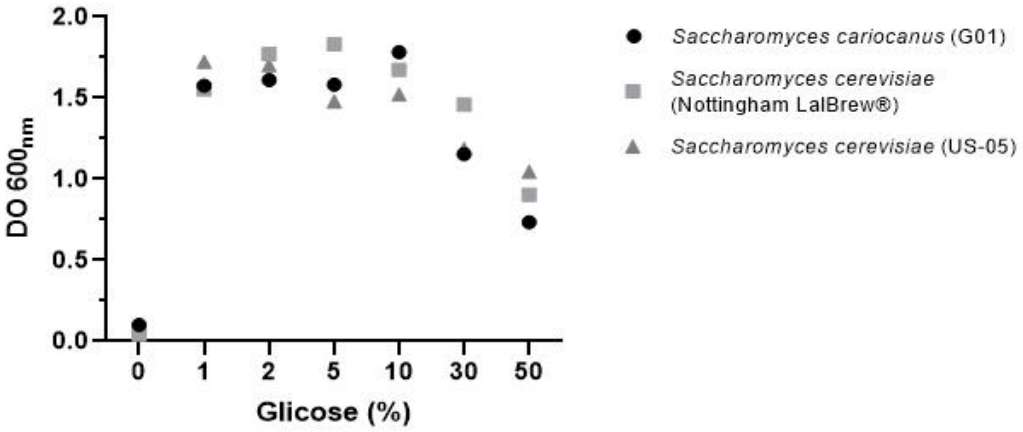



**Figura 8** - Média das triplicatas do ensaio de tolerância ao meio com extrato de levedura a 1% em diferentes concentrações de glicose.

### 5.5. Avaliação da resistência ao etanol

Os resultados de crescimento da levedura *S. cariocanus* G01 e das leveduras cervejeiras comerciais, estão demonstrados nas **Figuras 9 e 10**. Os valores de absorbância ≥ 0,4 indicam um crescimento celular significativo, frequentemente considerado como um limite mínimo.

A levedura *S. cariocanus* em 24h de incubação apresentou capacidade de multiplicação na concentração de 5 % de etanol (**Figura 9**), o mesmo apresentado por leveduras controle, contudo com diferenças significativas nas taxas de crescimento em comparação às leveduras cervejeiras comerciais ($p < 0,0001$).

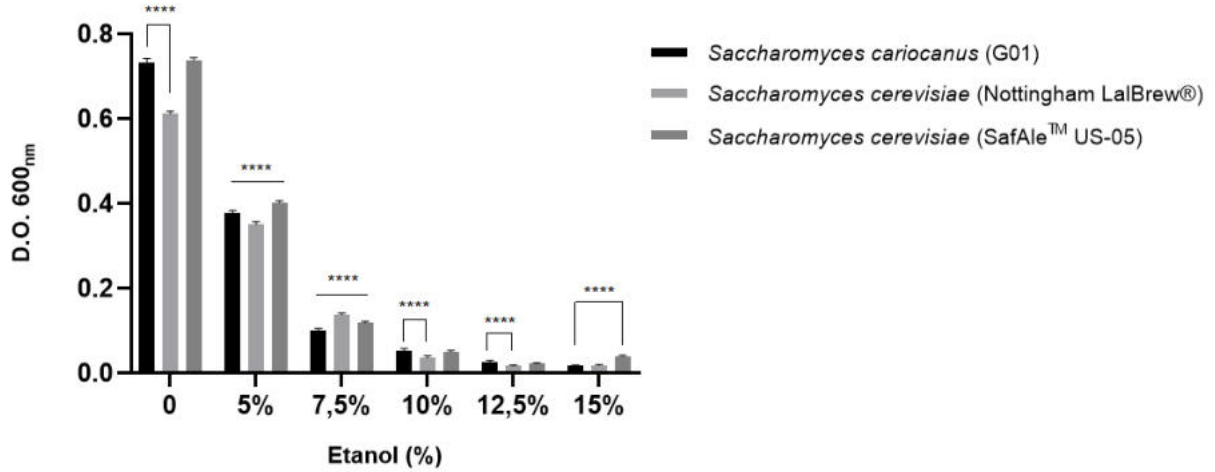



**Figura 9** - Média e desvio padrão do crescimento em 24h das leveduras em meio YPD com concentrações de etanol 0 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 % e 15 %. As diferenças entre *S. cariocanus* e as leveduras cervejeiras comerciais foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey,* as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*): **** ($p < 0{,}0001$).

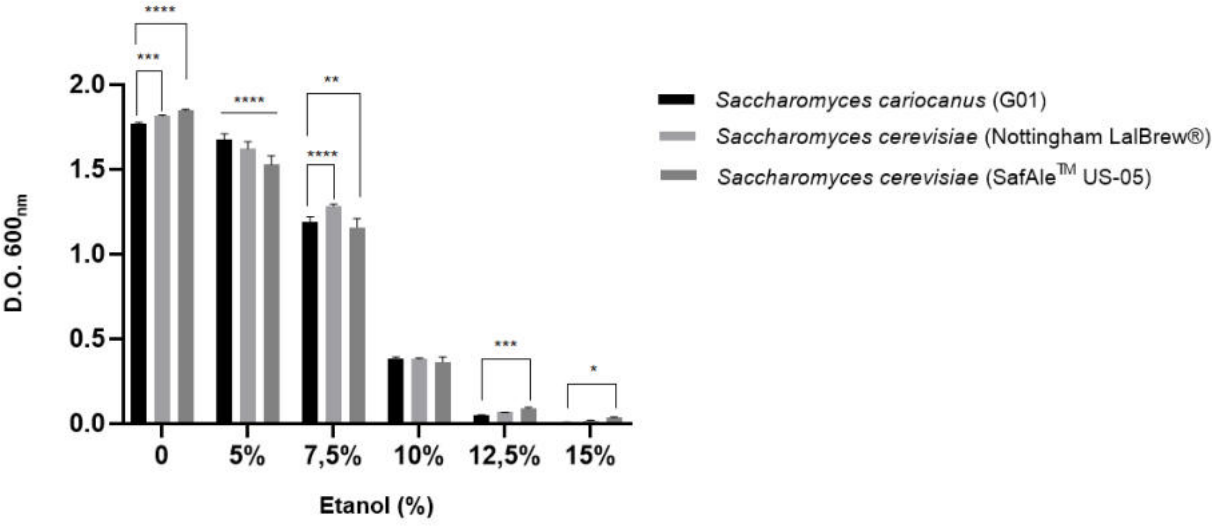



**Figura 10** - Média e desvio padrão do crescimento em 48h das leveduras em meio YPD com concentrações de etanol 0 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 % e 15 %. As diferenças entre *S. cariocanus* e as leveduras cervejeiras comerciais foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey,* as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*): **** ($p < 0{,}0001$); *** ($p < 0{,}001$); ** ($p < 0{,}01$) e * ($p < 0{,}05$).

Após 48h de incubação, as leveduras mantiveram a tolerância ao etanol com um notório aumento de biomassa nas condições de 5 % e 7,5 % de etanol em relação ao crescimento em 24 h. Especificamente em 7,5 %, o crescimento de *S. cariocanus* G01 foi estatisticamente diferente de *Saccharomyces cerevisiae* Nottingham LalBrew® ($p < 0{,}0001$) e *S. cerevisiae* SafAle™ US-05 ($p < 0{,}01$). Ao mesmo tempo, elas foram capazes de crescer a 10 % de etanol

sem diferenças significativas (**Figura 10**), porém com menor crescimento em relação à concentração anterior. De acordo com os dados do fabricante, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Nottingham LalBrew® pode tolerar até 14 %, assim como a levedura SafAle$^{TM}$ US-05 apresenta tolerância de até 11 % de etanol em relação ao mosto cervejeiro.

### 5.6. Resistência ao lúpulo

Os resultados do ensaio de resistência ao lúpulo em diferentes concentrações de IBU demonstraram que, em 24 h, a levedura *S. cariocanus* (G01) apresentou um menor crescimento celular nas concentrações de 45, 50 e 55 IBU, quando comparada a leveduras cervejeiras comerciais (**Figura 11**). Foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ($p$ < 0,0001) entre *S. cariocanus* (G01) e os controles nas concentrações 50 e 55 IBU. Além disso, na concentração de 40 IBU, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre *S. cariocanus* G01 e *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) de ($p$ < 0,0004).

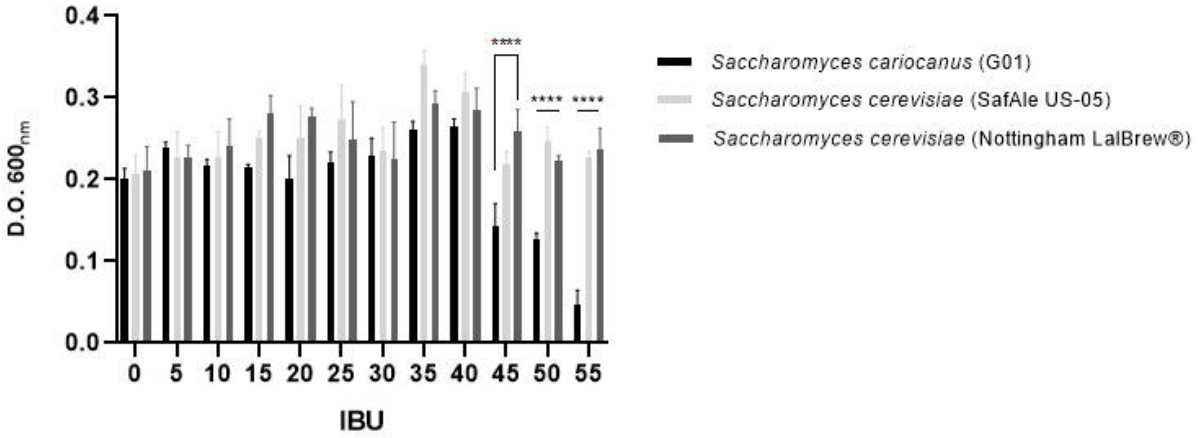



**Figura 11** - Média e desvio padrão do crescimento em 24h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05), *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew) em diferentes concentrações de IBU. As diferenças entre *S. cariocanus* e as leveduras cervejeiras comerciais foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey,* as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*), **** ($p$ < 0,0001).

Com 48 h de crescimento a levedura *S. cariocanus* (G01) obteve crescimento similar em todas as concentrações de IBU testadas (**Figura 12**), porém significativamente inferior ao crescimento das leveduras controle ($p$ < 0,0001). As leveduras são consideradas adequadas para o processo fermentativo caso apresentem valores de crescimento ≥ 0,4 (Methner, 2019; Silva, 2022).

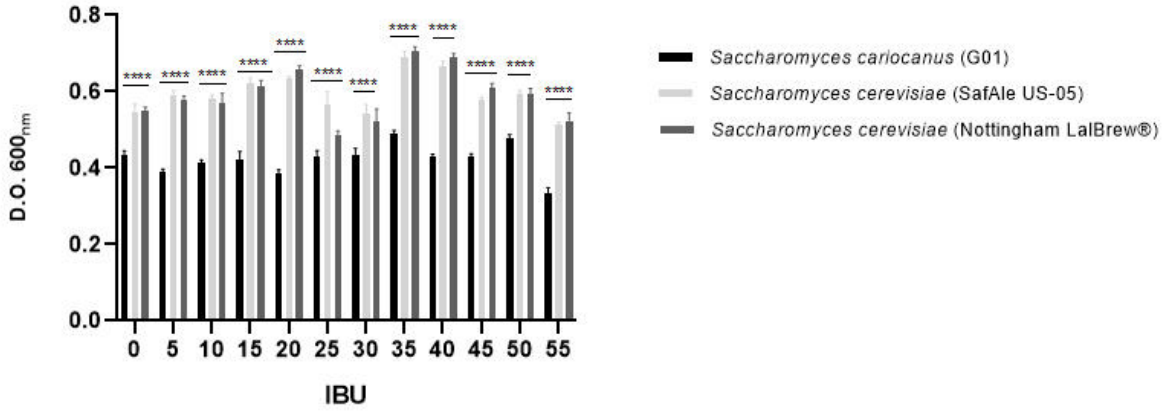



**Figura 12** - Média e desvio padrão do crescimento em 48h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) e *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) em diferentes concentrações de IBU. As diferenças entre *S. cariocanus* e as leveduras cervejeiras comerciais foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey,* as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*): **** ($p < 0,0001$).

Já em 72 h de crescimento em diferentes concentrações de IBU, a levedura *S. cariocanus* G01 apresentou diferenças significativas ($p < 0,0001$) em 30 IBU em relação à *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®). Em 45, 50 e 55 IBU também foram apresentadas diferenças significativas (**Figura 13**), porém na maioria das concentrações a levedura *S. cariocanus* G01 apresentou um crescimento constante, representando tolerância às diferentes concentrações de IBU.

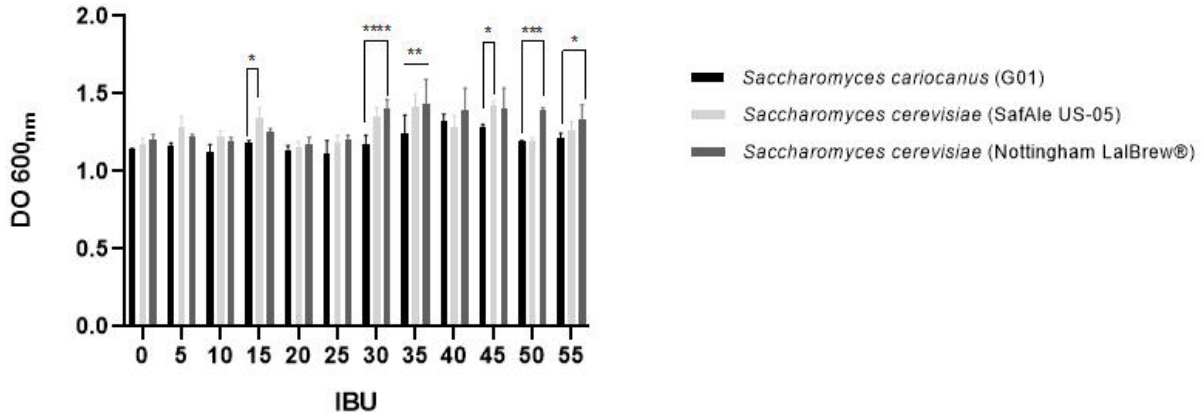



**Figura 13** - Média e desvio padrão do crescimento em 72 h das leveduras *S. cariocanus* (G01), *S. cerevisiae* (SafAle$^{TM}$ US-05) e *S. cerevisiae* (Nottingham LalBrew®) em diferentes concentrações de IBU. As diferenças entre *S. cariocanus* e as leveduras cervejeiras comerciais foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey,* as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*), * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); e *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$).

### 5.7. Avaliação da capacidade de floculação

Os percentuais de floculação foram dispostos na média total das triplicatas, na qual a levedura *S. cariocanus* apresentou floculação classificada como moderada (41,17 %). Enquanto as leveduras cervejeiras comerciais apresentaram perfis diferentes entre si, *S. cerevisiae* Nottingham LalBrew® apresentou alta floculação (86,01 %) e SafAle$^{TM}$ US-05 floculação moderada (62,57 %) (**Tabela 9**).

**Tabela 9** - Avaliação da capacidade de floculação das leveduras

| Leveduras | Percentual (%) | Classificação* |
|---|---|---|
| *S. cariocanus* | | |
| G01 | 41,17 ± 0,02 | Moderada |
| *S. cerevisiae* | | |
| Nottingham LalBrew® | 86,01 ± 0,08 | Alta |
| SafAleTM US-05 | 62,57 ± 0,05 | Moderada |

* Com base nos critérios estabelecidos por ASBC (1992).

### 5.8. Teste de atividade *killer*

Conforme observado na **Figura 14**, a levedura *S. cariocanus* (G01) não apresentou halo de inibição ao redor da colônia, indicando ausência de atividade *killer* contra a estirpe sensível. Resultados semelhantes foram apresentados nas estirpes controle *S. cerevisiae* SafAle$^{TM}$ US- 05 e Nottingham LalBrew®.

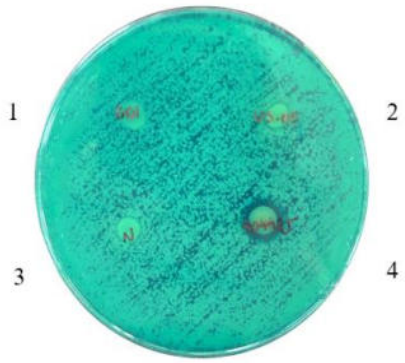



**Figura 14** - Ensaio de caráter *killer* em meio YEPD-azul de metileno. As leveduras foram inoculadas usando o método de *drop test* sob a levedura padrão de sensibilidade *Nakaseomyces glabrata* (IMUFRJ/50083). 1) *S. cariocanus* G01; 2) SafAle$^{TM}$ US-05; 3) Nottingham LalBrew® e 4) *Williopsis saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/50442$^{T}$) como controle positivo.

### 5.9. Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$)

*S. cariocanus* (G01) produziu $H_2S$ conforme crescimento de colônias marrons na superfície do meio de cultura, representando uma média produção desse composto. As estirpes cervejeiras utilizadas como controle apresentaram fraca produção de $H_2S$ no meio (**Figura 15**).

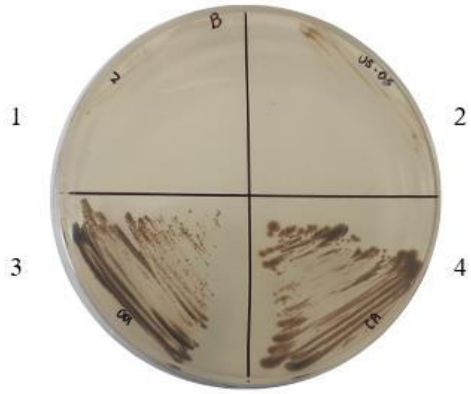



**Figura 15** - Análise da produção de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$) por leveduras em meio Ágar Bismuto Sulfito. 1) Nottingham LalBrew®; 2) SafAle$^{TM}$ US-05; 3) *S. cariocanus* (G01) e 4) *Candida albicans* ATCC 10231.

### 5.10. Avaliação da produção de fosfolipase

A produção de fosfolipase não foi detectada em *Saccharomyces cariocanus* G01 (**Figura 16**), nem nas estirpes cervejeiras controle, sugerindo ausência de potencial patogênico relacionado à expressão dessa enzima nas cepas avaliadas.




**Figura 16** - Teste de produção de fosfolipase em meio Ágar *Sabouraud Dextrose* suplementado com gema de ovo. 1) *Candida albicans* ATCC 10231; 2) *S. cariocanus* G01; 3) *Nakaseomyces glabrata* IMUFRJ 50083; 4) SafAle$^{TM}$ US-05 e 5) Nottingham LalBrew®.

### 5.11. Imobilização de leveduras em alginato de sódio

As microcápsulas contendo a levedura *S. cariocanus* G01 (**Figura 17**) apresentaram um diâmetro médio de 2,16 mm ± 0,1 e um peso médio de 0,010 g ± 0,001. Em cada esfera foram detectadas 1,0 x $10^7$ ± 0,1 células/mL.

Após 13 dias de fermentação à 17 ºC, a contagem média de células no interior das esferas reduziu de 1,0 x $10^7$ para 3,8 x $10^6$ células/mL.

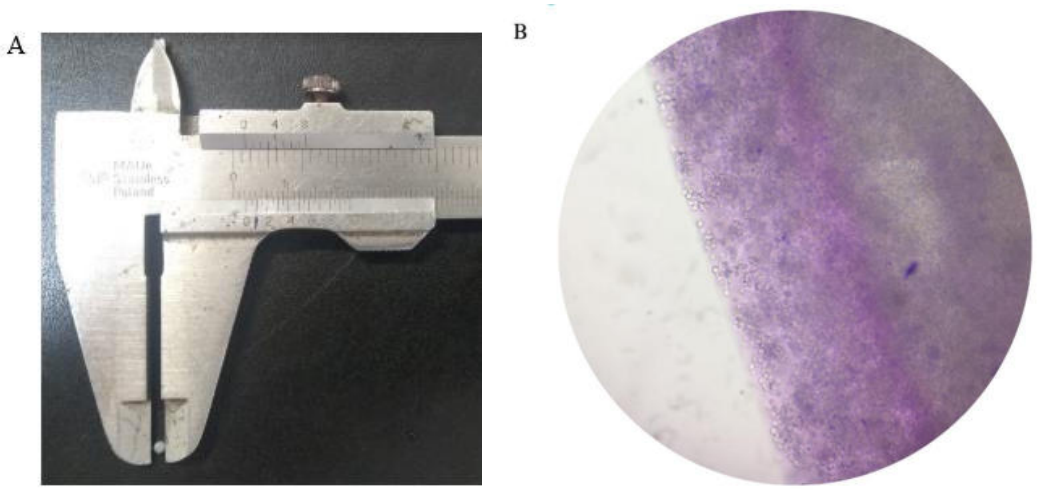



**Figura 17** - A) Levedura *S. cariocanus* G01 imobilizada medida em paquímetro com diâmetro de 2,2 mm; B) Imagem obtida por microscopia de luz (Opton®), ampliação de 400x da levedura *S. cariocanus* G01 imobilizada.

#### 5.11.1 Perfil de fermentação de *S. cariocanus* G01 para leveduras livres e imobilizadas em 1 % e 1,5 % de alginato de sódio

A imobilização com 1,5 % de alginato de sódio promoveu um consumo mais rápido de açúcares como a glicose e a sacarose, em comparação às leveduras livres e em alginato de sódio a 1 % (**Tabela 10**). Com base nesse experimento, realizado em triplicata, definiu-se a concentração de 1,5 % de alginato como a mais adequada para testes subsequentes de fermentação em mosto cervejeiro.

**Tabela 10** - Perfil de fermentação de carboidratos da levedura *S. cariocanus* (G01) na sua forma livre e imobilizada em alginato de sódio 1 % e 1,5 % em diferentes tempos de fermentação (horas)

| Açúcares | **Livres** | | | **Imobilizadas em alginato de sódio 1 %** | | | **Imobilizadas em alginato de sódio 1,5 %** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| Glicose | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Sacarose | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Maltose | - | + | + | - | - | + | - | + | + |

Interpretação: "+" indicativo de fermentação positiva (produção de gás e acidificação). "-" indicativo de ausência de fermentação (produção de gás e acidificação não detectada).

### 5.11.2. Atenuação aparente do mosto cervejeiro com leveduras livres e imobilizadas

A levedura livre levou a uma queda mais acentuada da densidade do mosto nas primeiras 48 horas de fermentação em relação à estirpe imobilizada; contudo, nos demais momentos da fermentação, o comportamento das leveduras se mostrou semelhante (**Figura 18**)

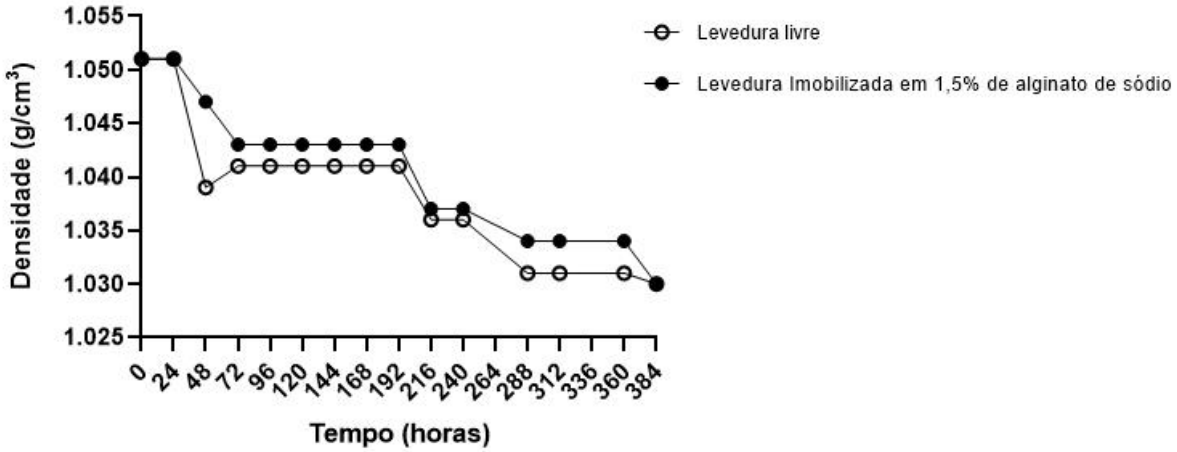



**Figura 18**. Determinação da densidade do mosto com relação ao tempo de fermentação por *S. cariocanus* G01 livre e imobilizadas em 1,5 % de alginato de sódio

### 5.11.3. Atenuação Aparente e ABV estimado

*S. cariocanus* G01, quando fermentada em mosto cervejeiro em sua forma livre e imobilizada a 1,5 % de alginato de sódio, não apresentou diferenças ao final da fermentação, com valores finais de densidade 1,030 g/cm$^3$. A partir deste dado foram realizados os cálculos para determinar atenuação aparente e o ABV estimado, com resultados de ≈ 41,18 e de 2,76 % para ambas as formulações.

## 5.12. Desenvolvimento de um meio de cultura diferencial

O meio de cultura diferencial utilizado para o crescimento de leveduras da espécie *S. cariocanus*, originalmente de coloração azul-esverdeado, ao realizar o esgotamento com as estirpes (G01, D01, UFRJ 50816$^T$, UFRJ 50791 e S01) apresentou colônias amarelas (**Figura 19**). Nas estirpes de *S. cerevisiae* testadas não houve alteração da cor do indicador, apesar de ser observado o desenvolvimento das colônias.

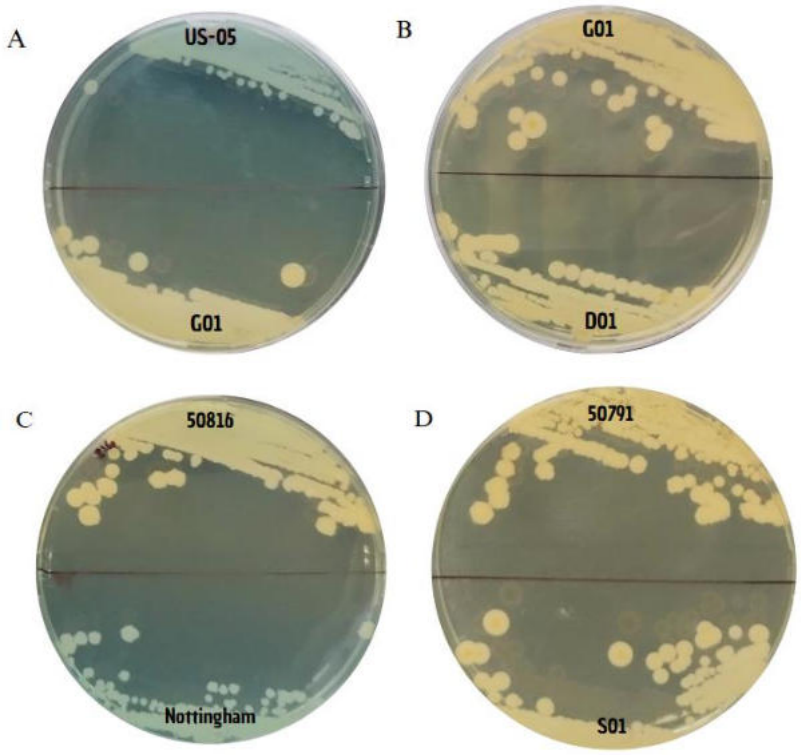



**Figura 19.** Ilustração do esgotamento de leveduras em meio de cultura diferencial para identificação da espécie *S. cariocanus*. A) crescimento da levedura SafAle$^{TM}$ US-05 e G01; B) crescimento da levedura G01 e D01; C) crescimento da levedura UFRJ 50816$^T$ e Nottingham LalBrew®; D) crescimento da levedura 50791 e S01.

## 5.13. Montagem do genoma e anotação funcional

A levedura *S. cariocanus* foi previamente descrita (Morais et al., 1992; Naumov et al., 2000b) mas ainda não há genoma disponível para este microrganismo. Assim, o material descrito neste trabalho representa o primeiro genoma de *S. cariocanus*. O genoma contém 11.564.381 pb e possui um GC de 38,29 %. A predição e anotação genética revelaram 5.878 sequências codificadoras de DNA (CDSs do inglês, *Coding DNA Sequence*), das quais 5.344 representam mRNAs. Além disso, 314 ncRNAs foram identificados, dos quais 147 são tRNAs e 5 são rRNAs (**Tabela 11**).

**Tabela 11 -** Métricas e características gerais para o genoma de *S. cariocanus* G01

| **Características** | **Valores** | **Características** | **Valores** |
|---|---|---|---|
| Número de acesso GenBank | JBPAFT010000000 | Número de mRNAs | 5.344 |
| Tamanho total do genoma (bp) | 11,564,381 | Número de ncRNAs | 314 |
| Conteúdo GC (%) | 38.29 | Número de tRNAs | 147 |
| Número de contigs | 323 | Número de rRNAs | 5 |
| Tamanho do maior contig | 242,189 | Número de exons | 6.025 |
| N50 | 87,407 | Número de íntrons | 311 |
| L50 | 44 | Índice de completude genômica BUSCO (%) | 99,6 |
| N's por 100 Kbp | 0 | Sequências alinhadas (%) | 98,87 |
| Contigs mitocondriais | 8 | Leituras devidamente pareadas (%) | 96,87 |
| Número total de CDS | 5,878 | Cobertura média de sequenciamento | 139 |
| Tamanho mitocondrial | 77,380 | - | - |

A análise BUSCO resultou em 99,6 % de completude genômica, com um total de 3.269 genes completos, incluindo 3.268 genes de cópia única e 1 gene duplicado, bem como 3 genes fragmentados e 10 ausentes.

A anotação funcional de Clusters de Grupos Ortólogos (COGs) no genoma de *Saccharomyces cariocanus* G01 revelou uma ampla distribuição de funções proteicas. Um total de 1.265 proteínas foram atribuídas a categorias COG relacionadas ao metabolismo, 1.607 a processos e sinalização celular e 1.495 a armazenamento e processamento de informações.

Além disso, 1.065 proteínas (19,6 % do total) foram classificadas como mal caracterizadas, destacando genes para investigação funcional mais aprofundada e o potencial para a descoberta de novas funções (**Figura 20**). No grupo Metabolismo, todas as categorias COG foram razoavelmente equilibradas, sugerindo um envolvimento abrangente em múltiplas vias metabólicas sem a dominância de nenhuma função única. As categorias menos representadas no geral foram estruturas extracelulares e motilidade celular, contendo 5 e 2 proteínas, respectivamente, o que está de acordo com seus papéis limitados na fisiologia da levedura.

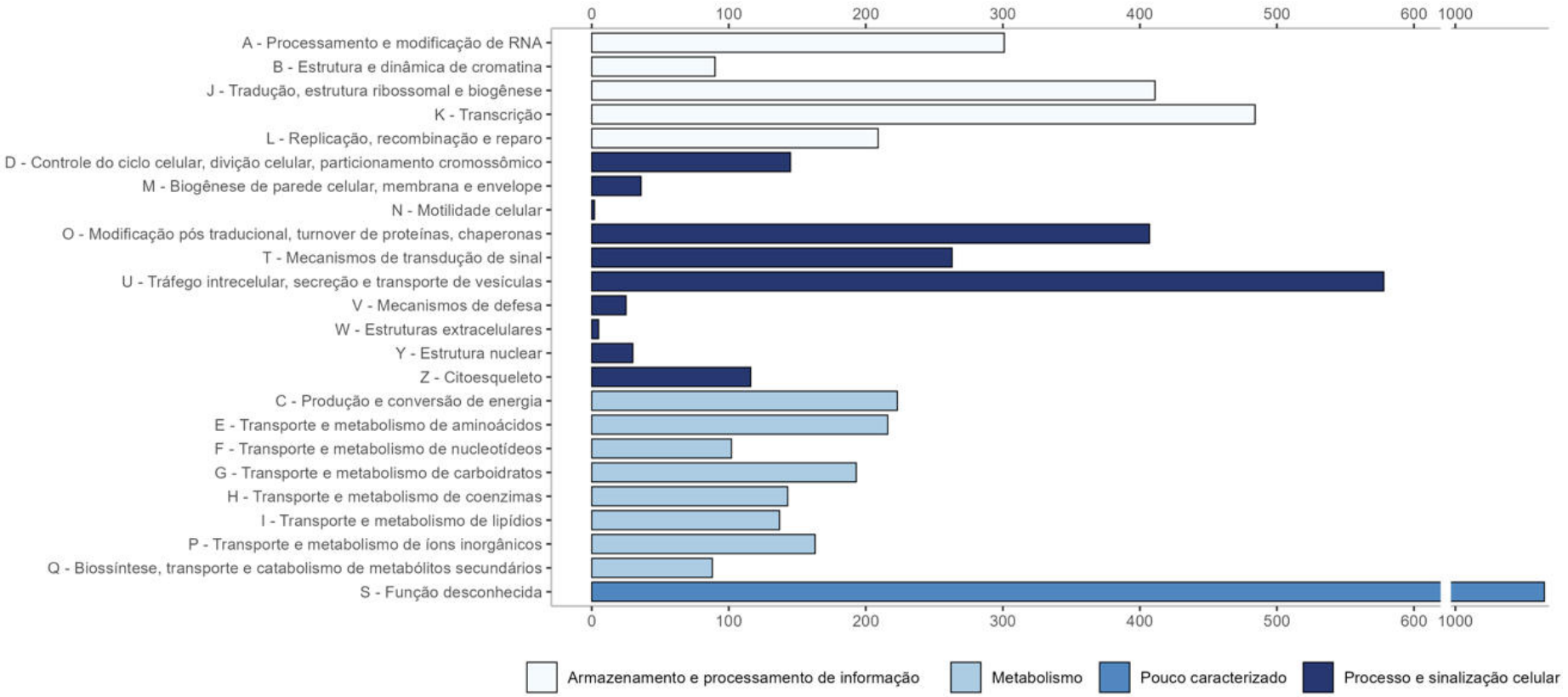



**Figura 20 -** Gráfico de barras representando a anotação funcional de grupos ortólogos (COGs) no genoma *S. cariocanus* G01. O eixo x exibe o número de proteínas atribuídas a cada categoria COG, enquanto o eixo y mostra as categorias funcionais COG. As barras são coloridas de acordo com os principais grupos de classificação COG.

### 5.13.1 Identificação filogenética

A análise por BLAST no banco de dados UNITE revelou uma correspondência da região ITS com *S. cariocanus* (UNITE ID: KY104988), apresentando 99,765 % de identidade em um alinhamento de sequência de 850 pb. O alinhamento revelou apenas duas incompatibilidades, nenhuma lacuna e um *e-value* igual a 0,0, indicando alta confiabilidade na identificação da sequência.

A análise fastANI agrupou as espécies de *Saccharomyces* em 4 grupos principais (**Figura 21**). Um desses grupos inclui *S. paradoxus* LL2011-044, *S. cariocanus* G01 e *S. cerevisiae* S288C, também compartilhando similaridades com *S. pastorianus* W34-70. Notavelmente, *S. cariocanus* G01 exibiu 97,4 % de identidade com *S. paradoxus*, 87,7 % de identidade com *S. cerevisiae* e 87,5 % de identidade com *S. pastorianus*.

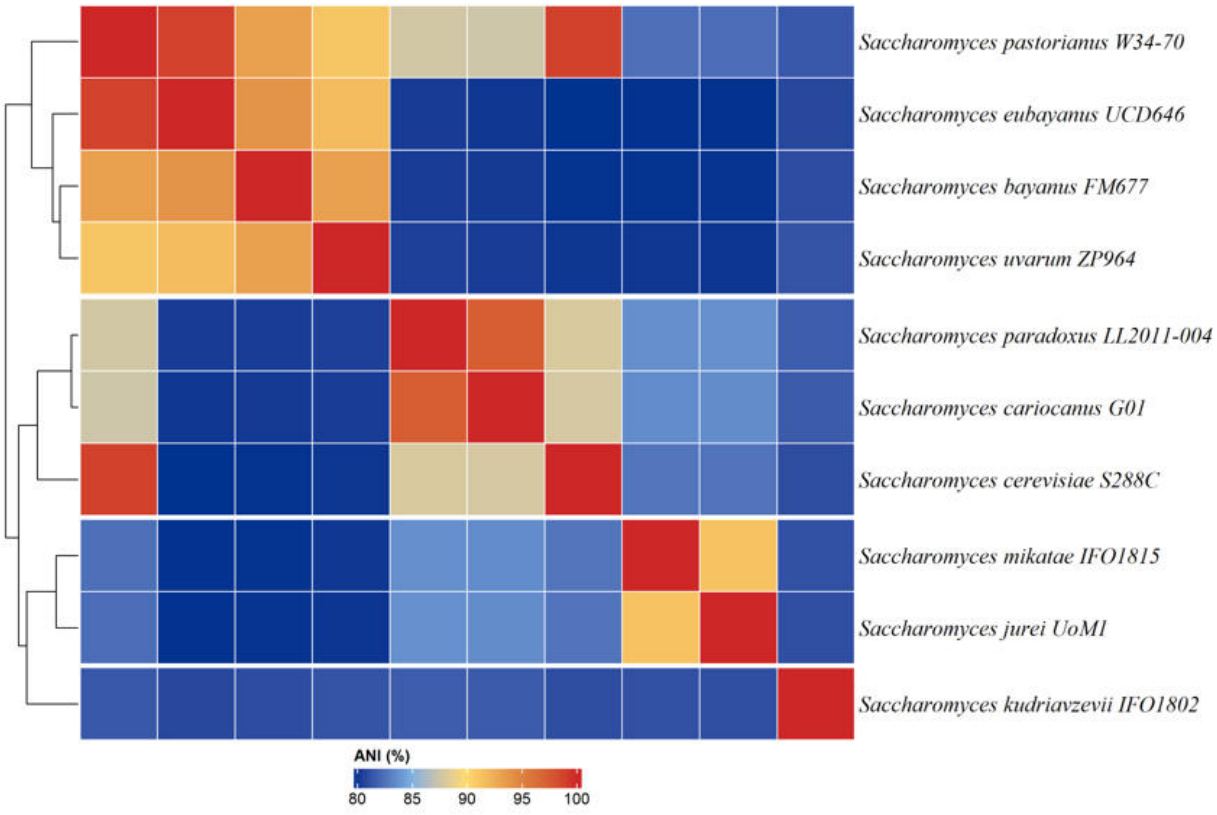



**Figura 21** - Mapa de calor representando os resultados da análise de identidade média de nucleotídeos (ANI) conduzida usando o algoritmo fastANI (Jain et al., 2018).

A análise da sequência multilocus estabeleceu uma distinção clara entre *Saccharomyces* spp. e *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140, com estatísticas bootstrap robustas que sustentam os clados (**Figura 22**). Além disso, a árvore filogenética inferida demonstrou que *S. cariocanus* G01 está mais próximo de *S. paradoxus* LL2011-004, com estatísticas bootstrap de 99 %.

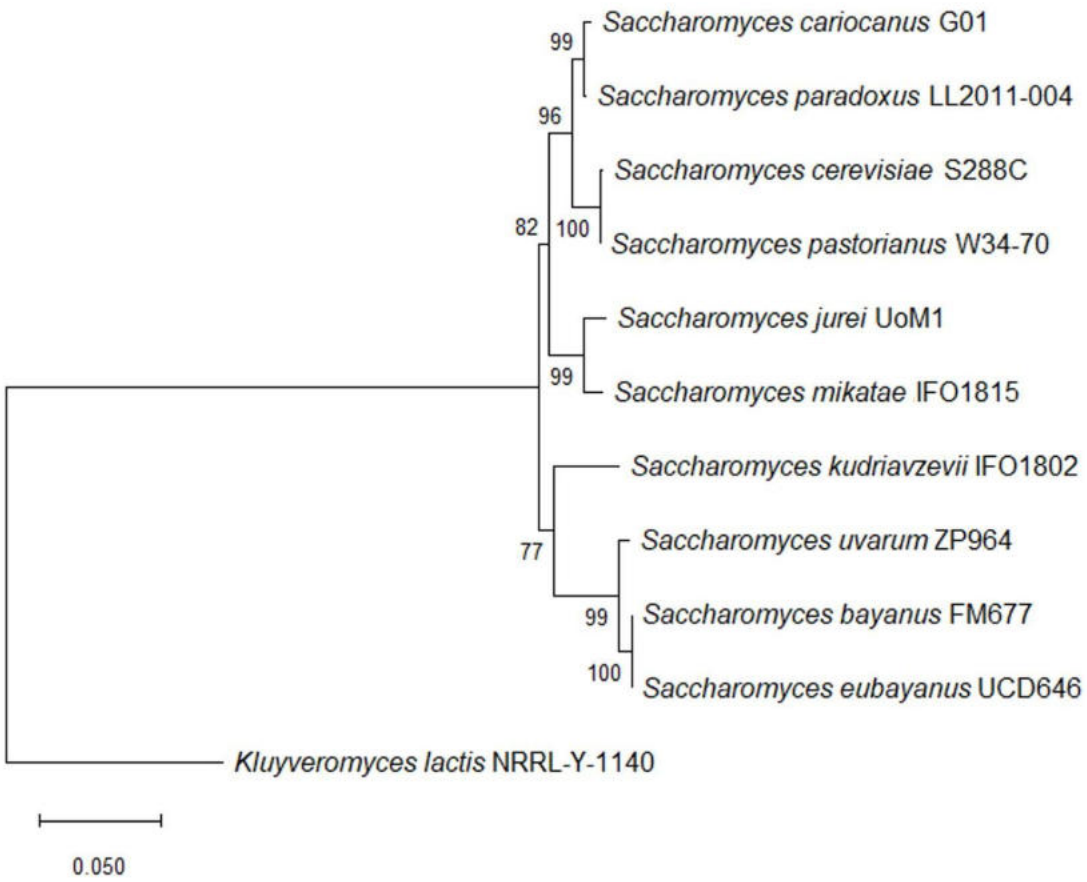



**Figura 22** - Árvore filogenética, utilizando as regiões ITS, SSU, LSU e os genes *TEF1* e *RPB2*, gerando uma supersequência com comprimento de 6.014 nucleotídeos. A árvore foi inferida com o método da máxima verossimilhança e o modelo de Tamura de 3 parâmetros, com distribuição gama e proporção de sítios nucleotídicos invariantes. *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 foi utilizado como grupo externo para o enraizamento da árvore. Os números ao lado representam os valores estatísticos bootstrap.

### 5.13.2 Genes envolvidos na fermentação e no perfil sensorial da levedura *S. cariocanus* G01

A análise genômica concentrou-se na identificação de genes associados à capacidade fermentativa de sacarose e glicose (**Tabela 12**) conforme descrito na literatura, especialmente o gene *SUC2*, responsável pela produção de invertase para hidrólise da sacarose, e os transportadores de glicose da família *HXT*. Além disso, foram encontradas cópias dos genes

*MAL*, para investigar a base genética subjacente à capacidade de fermentação da maltose. Os loci *MAL* (*MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* e *MAL6*) codificam componentes vitais para a utilização da maltose: *MAL_1* codifica uma permease de maltose responsável pelo transporte de maltose para dentro da célula; *MAL_2* codifica a maltase (α-glicosidase), que hidrolisa a maltose em moléculas de glicose; e *MAL_3* codifica um ativador transcricional que regula a expressão de *MAL_1* e *MAL_2* em resposta à presença de maltose. No total, três cópias do fator de transcrição *MAL_3*, três cópias da permease *MAL_1* e uma cópia da maltase *MAL_2* foram identificadas em quatro contigs diferentes no genoma preliminar. Buscas BLAST complementares na seção Swiss-Prot do banco de dados UniProt revelaram ocorrências em sequências homólogas de genes *MAL* de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 13**).

**Tabela 12** - Genes relacionados a fermentação de sacarose e glicose encontrados no genoma de *S. cariocanus* G01

| Função | Gene | Contig | Início | Parada | Fita | Produto |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Estrutural** | *SUC2* | NODE_01_G01 | 16193 | 17791 | + | Beta-fructofuranosidase |
| **Regulação** | *SNF1* | NODE_010_G01 | 103710 | 105611 | + | Proteína quinase |
| | *SNF2* | NODE_001_G01 | 96917 | 100987 | + | Regulador transcricional |
| | *SNF3* | NODE_038_G01 | 78918 | 81209 | + | Sensor de baixa glicose na membrana plasmática |
| | *SNF4* | NODE_112_G01 | 5046 | 6014 | + | Subunidade reguladora da proteína quinase serina/treonina ativada por AMP |
| | *SNF5* | NODE_008_G01 | 21024 | 23665 | - | Subunidade do complexo SNF/SWI de remodelação da cromatina |
| | *SNF6* | NODE_062_G01 | 29505 | 30500 | - | Subunidade do complexo SNF/SWI de remodelação da cromatina |
| **Transporte** | *HXT6* | NODE_227_G01 | 14 | 199 | - | Transportador de hexose |
| | *HXT5_7* | NODE_116_G01 | 840 | 2465 | - | Transportador de hexose |
| | *HXTT7* | NODE_227_G01 | 3734 | 3952 | - | Transportador de hexose |
| | *HXT14* | NODE_050_G01 | 56296 | 57918 | + | Transportador de hexose |

**Tabela 13 -** Cópias dos genes do loci *MAL* (*MAL1*, *MAL3* e *MAL* 6) encontrados no genoma de *S. cariocanus* G01 e sua similaridade com *S. cerevisiae*

| Contig | Início | Parada | Fita | Gene | Produto | UniProtKB/Swiss-Prot best hit | Identidade (%) | Similaridade (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NODE_008_G01 | 1533 | 2939 | - | *MAL*33 | Proteína reguladora da fermentação de maltose | P38157 | 83 | 89 |
| NODE_009_G01 | 139202 | 140623 | + | *MAL*13 | Proteína reguladora da fermentação de maltose | P53338 | 81 | 89 |
| NODE_009_G01 | 147349 | 149583 | + | *MAL*33 | Proteína reguladora da fermentação de maltose | P38157 | 71 | 82 |
| NODE_009_G01 | 149640 | 151499 | - | *MAL*31 | Maltose permease | P38156 | 87 | 93 |
| NODE_067_G01 | 8806 | 10653 | + | *MAL*11 | Maltose permease | N1PA11 | 87 | 93 |
| NODE_206_G01 | 1625 | 3469 | - | *MAL*61 | Maltose permease | P15685 | 94 | 98 |
| NODE_206_G01 | 4345 | 6099 | + | *MAL*32 | α-glicosidase (maltase) | P38158 | 92 | 96 |

De igual modo, foi realizada uma busca direcionada para identificar genes associados à biossíntese de compostos de sabor e aroma, como a produção de álcoois, ésteres, fenóis voláteis, compostos contendo enxofre e terpenos (**Tabela 14**). Entre os genes identificados, *ATF1* está envolvido na síntese de acetato de isoamila, composto associado a um aroma semelhante ao de banana. Em contraste, os genes *PAD1* e *FDC1* codificam enzimas envolvidas na descarboxilação do ácido fenilacrílico e do ácido ferúlico, respectivamente, contribuindo para um aroma característico semelhante ao de cravo. Ambas as notas aromáticas são perceptíveis na cerveja obtida a partir da fermentação por *S. cariocanus* G01.

Embora os genes presentes em leveduras cervejeiras possam estar associados a funções tecnológicas e ao desempenho de processos celulares desejáveis, alguns desses genes também podem estar envolvidos em mecanismos de resistência ou atuar como marcadores de virulência em contextos clínicos. A partir da anotação genômica de *S. cariocanus* G01, foi possível identificar genes com duplo papel funcional, listados na **Tabela A1**, localizada no Anexo 4. A presença simultânea dessas funcionalidades tecnológicas e potenciais riscos em determinadas cepas de *Saccharomyces* reforça a importância da triagem genômica na seleção de novas linhagens para uso cervejeiro.

**Tabela 14** - Genes responsáveis pela produção de compostos de aroma e sabor identificados no genoma *S. cariocanus* G01. BCAA[1] Aminácido de cadeia ramificada mitocondrial.

| Grupos Químicos | Compostos de aroma e sabor | Contig | Início | Final | Fita | Gene | Produto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Álcoois | Álcoois superiores | NODE_033_G01 | 42336 | 43382 | - | *ADH1* | Álcool desidrogenase |
| | Álcoois superiores | NODE_051_G01 | 35321 | 36367 | - | *ADH2* | Álcool desidrogenase |
| | Álcoois superiores | NODE_025_G01 | 68227 | 69354 | - | *ADH3* | Álcool desidrogenase |
| | Álcoois superiores | NODE_070_G01 | 4328 | 5476 | + | *ADH4* | Álcool desidrogenase |
| | Álcoois superiores | NODE_007_G01 | 54796 | 55851 | + | *ADH5* | Álcool desidrogenase |
| | Álcoois superiores | NODE_051_G01 | 72872 | 73954 | - | *ADH6* | Álcool desidrogenase |
| | 2-feniletanol | NODE_221_G01 | 856 | 1968 | + | *ARO3* | 3-deoxi-7-fosfoheptulonato sintase |
| | 2-feniletanol | NODE_008_G01 | 85149 | 86261 | + | *ARO4* | 3-deoxi-7-fosfoheptulonato sintase |
| | 2-feniletanol | NODE_029_G01 | 25077 | 25847 | + | *ARO7* | Corismato mutase |
| | 2-feniletanol | NODE_072_G01 | 52984 | 54891 | + | *ARO10* | Fenilpiruvato descarboxilase |
| | Álcoois superiores e outros compostos aromáticos | NODE_074_G01 | 50796 | 51977 | + | *BAT1* | BCAA[1] aminotransferase |
| | Álcoois superiores e outros compostos aromáticos | NODE_034_G01 | 20513 | 21643 | - | *BAT2* | Transaminase de aminoácidos de cadeia ramificada |
| | Geraniol → citronellol | NODE_055_G01 | 72510 | 73712 | + | *OYE2* | NADPH desidrogenase 2 |
| | Álcool isoamílico | NODE_044_G01 | 33880 | 37398 | + | *LEU4* | α-isopropilmalato sintase |
| Ésteres | Ésteres de acetato | NODE_125_G01 | 22404 | 23981 | - | *ATF1* | Álcool acetiltransferase |
| | Ésteres de acetato | NODE_117_G01 | 3166 | 4772 | - | *ATF2* | Álcool O-acetiltransferase |

| Grupos Químicos | Compostos de aroma e sabor | Contig | Início | Final | Fita | Gene | Produto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ésteres de acetato | NODE_044_G01 | 72493 | 73209 | + | *IAH1* | Esterase hidrolisante de acetato de isoamila |
| | Acetato de etila | NODE_030_G01 | 98612 | 99607 | - | *EAT1* | Etanol acetiltransferase 1 |
| | Hexanoato de etila | NODE_004_G01 | 10029 | 11399 | + | *EEB1* | Éster etílico sintase/esterase 1 de ácido graxo de cadeia média |
| | Hexanoato de etila | NODE_007_G01 | 105947 | 107302 | - | *EHT1* | Éster etílico sintase/esterase 2 de ácido graxo de cadeia média |
| Fenóis voláteis | Ácidos fenólicos | NODE_175_G01 | 5948 | 6676 | + | *PAD1* | Descarboxilase do ácido fenilacrílico |
| | Ácidos fenólicos | NODE_175_G01 | 7124 | 8635 | + | *FDC1* | Descarboxilase do ácido ferúlico |
| Compostos de enxofre | Tióis polifuncionais | NODE_043_G01 | 51045 | 52442 | - | *STR3* | Cistationina beta-liase |
| | Tióis polifuncionais | NODE_058_G01 | 67710 | 69199 | + | *IRC7* | Beta-liase conjugada com cisteína-S |
| Terpenos | Terpenóides | NODE_088_G01 | 43547 | 44641 | - | *BTS1* | Geranilgeranil pirofosfato sintetase |
| | | NODE_019_G01 | 102796 | 104151 | + | *ERG8* | Fosfomevalonato quinase |
| | | NODE_019_G01 | 74697 | 76130 | + | *ERG12* | Mevalonate quinase |
| | | NODE_041_G01 | 77715 | 78773 | + | *ERG20* | Farnesil pirofosfato sintetase |
| | | NODE_027_G01 | 53971 | 55317 | - | *EXG1* | Exo-1,3-beta-glucanase |
| | | NODE_053_G01 | 49660 | 52824 | + | *HMG1* | Hidroximetilglutaril-coA redutase |
| | | NODE_037_G01 | 23178 | 24365 | - | *MVD1* | Difosfato mevalonato descarboxilase |
| | Monoterpenos | NODE_113_G01 | 15845 | 17266 | + | *COQ1* | Hexaprenil difosfato sintase |
| | | NODE_004_G01 | 50610 | 51476 | + | *IDI1* | Isopentenil-difosfato delta-isomerase |
| | | NODE_025_G01 | 34880 | 35914 | + | *SRT1* | Prenil difosfato sintase |

## 6. DISCUSSÃO

O setor cervejeiro no Brasil nos últimos anos apresentou crescimento significativo no número de cervejarias e no consumo (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2024). As tendências atuais do mercado, impulsionadas pela exigência dos consumidores que procuram novas experiências sensoriais, criaram uma demanda por novos fermentos cervejeiros, levando à prospecção de leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces,* caracterizadas como selvagens, mas também leveduras não convencionais, como as leveduras não-*Saccharomyces* (Basso et al., 2016; Canonico et al., 2023). Neste estudo, a estirpe G01, uma derivativa obtida em nosso laboratório da estirpe tipo *S. cariocanus* 50816$^{T}$, mostrou preliminarmente um potencial cervejeiro. Tal potencial não foi observado ao longo deste estudo e de estudos preliminares em outras derivativas como D01 e S01. Da mesma forma, a sua valorização geográfica, em função do local de isolamento, também foi considerada para que esta fosse selecionada para o estudo.

A identificação da estirpe G01 foi confirmada pelo sequenciamento de seu genoma através da análise por BLAST no banco de dados UNITE que revelou uma correspondência com a espécie *S. cariocanus.* Na abordagem adotada não foi possível concluir o sequenciamento da estirpe, uma vez que a tecnologia Illumina se baseia em leituras curtas com limitações intrínsecas, que dificultam o fechamento completo dos cromossomos. Para contornar essas restrições e alcançar uma montagem genômica mais precisa, teria sido necessário o uso de uma abordagem híbrida, integrando à análise dados de sequenciamento de leitura longa, como os gerados pela plataforma PacBio, que permitiriam a resolução de regiões ambíguas e o fechamento dos gaps genômicos. Não foi possível obter sequências longas a tempo de escrever esta dissertação; mesmo assim, considerando as sequências obtidas por Illumina, este estudo resultou no primeiro sequenciamento da espécie *S. cariocanus*, onde os dados apresentaram alta qualidade e uma cobertura média de sequenciamento de 139 vezes.

A capacidade da estirpe G01 em fermentar a glicose, maltose e sacarose confirmam seu potencial cervejeiro. Esta capacidade não foi observada nas derivativas S01 e D01. Um fato importante a se considerar é que a capacidade de fermentação da maltose para a espécie apresenta resultados conflitantes na literatura. Nas coleções de cultura onde estão depositadas, a estirpe tipo é descrita como não fermentadora da maltose (Naumov et al., 2000b; Vaughan-Martini e Martini, 2011), por outro lado algumas referências citam o microrganismo como variável nesta característica (Boekhout et al., 2018). Estes resultados justificam e dão suporte à escolha da estirpe G01. Estudos atuais mostram que as leveduras cervejeiras (*S. cerevisiae*)

possuem mais de um gene para efetivar a fermentação da maltose, sendo necessário para isso pelo menos um dos cinco loci multigênicos de maltose *MAL* (*MAL 1, 2, 3, 4* ou *6*). Estes grupos são semelhantes entre si, porém com funcionamentos independentes, e estão localizados em regiões subteloméricas, cada um consistindo em três genes que codificam: (*i*) um gene estrutural para α-glicosidade (maltase), (*ii*) maltose permease e (*iii*) um ativador cujo produto é capaz de regular coordenadamente a expressão dos genes α-glicosidade e permease (Stewart, 2016). A estirpe G01 apresentou cópias dos grupamentos genéticos que determinam a fermentação da maltose, como os genes do loci *MAL* (*MAL1*, *MAL*3 e *MAL* 6). Ainda que não tenha sido realizada uma caracterização completa quanto à funcionalidade total destes genes, a capacidade de fermentação da maltose pela estirpe sugere que, pelo menos, um grupamento determinante genético funcional esteja presente. Os dados de similaridade de cópias de genes *MAL* de *S. cariocanus* com os de *S. cerevisiae* apresentaram um percentual de 89 a 98 %. Também foram encontrados determinantes genéticos da fermentação de glicose e sacarose, entre os genes estão os transportadores de hexoses *HXT* e o gene *SUC 2*, genes comuns ao gênero (Ciriacy e Reifenberger, 2024).

A análise fastANI indicou proximidade genômica de *S. cariocanus* G01 com *S. paradoxos*; contudo, estes não são suficientes, isoladamente, para afirmar a distinção em nível de espécie. Evidências adicionais de isolamento reprodutivo, divergência genômica em ortólogos de cópia única e identificação de rearranjos cromossômicos são necessárias para consolidar essa proposição.

Atualmente existem estudos divergentes quanto a posição taxonômica da levedura *S. cariocanus* G01 ser uma espécie ou subespécie de *S. paradoxus* (Fischer et al., 2000; Liti et al., 2005; Liti et al., 2006; Sulo et al., 2017; Alsammar e Delneri, 2020).

A fermentação do manitol por *S. cariocanus* foi um importante fator para o desenvolvimento do meio de cultura diferencial proposto neste estudo. A rápida distinção entre esta espécie e *S. cerevisiae* foi facilmente realizada durante o estudo. Entretanto, as espécies *S. kudriavzevii, S. mikatae* e *S. paradoxus* também podem fermentar o manitol, fato que necessita da associação de outras provas para distinguir *S. cariocanus* destas 3 espécies. Estudos adicionais devem ser realizados de modo a buscar uma distinção definitiva de *S. cariocanus* neste meio.

Entre os demais fatores relacionados às características fisiológicas desejáveis de um fermento cervejeiro, a estirpe G01 mostrou capacidade de se multiplicar nas temperaturas entre 17 e 28 ºC, o que a enquadra como uma levedura do tipo *Ale*. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no estudo de Kempf, Lengeler e Wendland (2017), onde

*S. cariocanus* (UFRJ 50816$^{T}$), assim como *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum,* também não foram capazes de se multiplicar a 37 ºC.

O estudo da capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas também forneceu informações quanto ao potencial de patogenicidade da estirpe. A incapacidade de crescimento da estirpe G01 a 37 ºC sugere ausência de patogenicidade, como sugerido por estudos de McCusker e colaboradores (1994) e de Llanos e colaboradores (2006). Entretanto, a estirpe comercial SafAle$^{TM}$ US-05 foi capaz de se multiplicar a 39 ºC, fato não observado na estirpe Nottingham LalBrew®. A patogenicidade das leveduras também tem sido associada à produção da enzima fosfolipase, cuja atividade não foi detectada na estirpe G01. A fosfolipase hidrolisa fosfolipídeos de membrana, ocasionando lise celular e facilitando a invasão tecidual, sendo um fator bem estabelecido em *Candida spp.* (Ghannoum, 2000). A estirpe G01 apresentou alguns genes cuja função na patogenicidade ainda é incerta, uma vez que estão associados a diversas funções biológicas. Como exemplo os genes *FLO5*, *FLO9* e *FLO11* que controlam o fenótipo de floculação, podem também estar associados a características de adesão célula-célula, sendo homólogos às proteínas de adesão responsáveis pela patogenicidade de leveduras como *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) (Guo et al., 2000). O gene *FTR1* também encontrado na estirpe G01, está associado com a captação de ferro. Homólogos deste gene são encontrados em todos os genomas fúngicos (Terzulli e Kosman, 2010), incluindo em patógenos *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

O gene *HOG1*, também detectado na estirpe G01, regula em *S. cerevisiae* os processos celulares em resposta aos estresses ambientais (Du et al., 2025). Este gene também está presente em *C. albicans*, sendo mediador da resistência ao estresse e virulência (Day et al., 2024). O gene *PKC1* também foi encontrado, e tem sido relacionado com a defesa contra estresses oxidativos. Ele foi originalmente identificado em *S. cerevisiae* (Watanabe, Chen e de Levin, 1994).

Apesar de alguns genes relacionados à patogenicidade nos gêneros *Saccharomyces* e *Candida* terem sido detectados na estirpe G01, sua completa relação com a patogenicidade, assim como sua funcionalidade ainda não estão completamente compreendidos em *Saccharomyces*, principalmente em *S. cariocanus.*

Atualmente a fabricação de cerveja em mostos de alta gravidade é uma alternativa para o aumento da produtividade, onde o mosto é fermentado com gravidade específica maior que 18 ºP. Após a fermentação, ele é diluído com água carbonatada até a gravidade prescrita (Puligundla et al., 2011). Neste estudo, a estirpe G01 mostrou resistência a elevadas pressões osmóticas, semelhante à observada nos fermentos comerciais.

No estudo de Vaštík e colaboradores (2023) para a produção de cerveja com baixo teor alcoólico, o perfil de osmotolerância foi realizado com cepas mutantes de *S. cerevisiae* e parentais de *S. mikatae*, as quais foram capazes de suportar 30 % (p/p) de glicose, enquanto aos seus descendentes híbridos (*S. cerevisiae* maltose negativa e *S. mikatae* tipo selvagem) suportaram 10 % (p/p). Em outro estudo, em que Matos (2021) analisava a capacidade de crescimento de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça, os controles *S. cerevisiae* T58 (*ale*) e *S. pastorianus* W3470 (*lager*) foram capazes de crescer a 25 ºC nas concentrações de 20, 25 e 30 % de glicose (p/v). Até o momento nenhum estudo avaliou a osmotolerância de *S. cariocanus.*

Em relação à resistência ao etanol, a estirpe G01 também mostrou resultados semelhantes quando comparado aos fermentos controle, sendo capaz de se multiplicar na presença de 10 % de etanol. Kempf, Lengeler e Wendland (2017) mostraram que a cepa de *S. cariocanus* CBS 8841 (equivalente a UFRJ 50816$^{T}$) foi capaz de se multiplicar em concentração de até 9 %, mas não a 12 % de etanol. Segundo Christofoleti-Furlan e colaboradores (2020), leveduras utilizadas na produção de bioetanol foram resistentes a 10% de etanol. Neste mesmo estudo, as cepas cervejeiras comerciais utilizadas como controle, Safbrew-S-33, SafAle-S-04 (ambas *S. cerevisiae*) e Saflager-W-34/70 (*S. pastorianus*) foram incapazes de crescer nas concentrações de 12,5 % e 15 % de etanol.

Segundo Briggs e colaboradores (2004), as leveduras que são utilizadas em processos de produção de cervejas são geralmente tolerantes a concentrações entre 3 e 6 % (v/v) de etanol, mas existem as linhagens que são empregadas em cervejas de alta gravidade que pode ultrapassar a tolerância a 10 % (v/v) de etanol. Em nosso estudo, as estirpes utilizadas como controle são descritas pelo fabricante como resistentes à concentração de 14 % (*S. cerevisiae* Nottingham LalBrew®) e 11 % para SafAle$^{TM}$ US-05 (Lallemand, 2025; Lamas Brew Shop, 2019). Contudo nas análises realizadas a tolerância foi um pouco menor (10 % para ambas as estirpes). Entretanto, deve ser considerado que os valores relatados pelos fabricantes são para a condição de multiplicação em mosto cervejeiro durante o processo de fabricação, enquanto neste trabalho a análise foi feita em tubo de ensaio com meio YPD. A resistência a 10 % de etanol parece ser comum entre leveduras selvagens, como mostrado no estudo de Valério e colaboradores (2024). Nele, foram isoladas 110 leveduras selvagens de frutos do Cerrado, entre as quais 20 cresceram em 10 %, 10 em 12 % e 7 em 15 % de etanol. Contudo, para a maioria das leveduras isoladas, um teor de álcool entre 5 a 10 % de etanol garantiu maior viabilidade celular. Corniani (2023) encontrou leveduras isoladas de fermentado de caldo de cana-de açúcar que foram resistentes a 8 %, mas não a 12 % de etanol.

Os genes encontrados em *S. cariocanus* G01 relacionados a função biológica biossíntese de ergosterol (*ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e os gene regulador *UPC2*) estão intimamente associados à tolerância ao etanol em *S. cerevisiae* (Novotny et al., 1992; Dickey et al., 2009) mantendo a espessura ideal da membrana (Piva et al., 2022). Foram também encontrados no genoma da estirpe os genes de síntese de trealose *TPS1* e *TPS2*, sendo expressos em *S. cerevisiae* quando expostos a altas concentrações de etanol (Chandler et al., 2004).

Assim como a resistência ao etanol, a resistência ao lúpulo é uma importante característica de fermentos cervejeiros, uma vez que este ingrediente apresenta características antimicrobianas. *S. cariocanus* G01 foi capaz de se multiplicar em até 55 IBUs, onde devemos considerar que as principais cervejas comerciais apresentam faixa de 8 a 21 IBUs (**Tabela 15**). Estes dados permitem sua utilização em cervejas que são amplamente consumidas pela população.

**Tabela 15** - Valores de IBU encontrados em cervejas comerciais mais consumidas do Brasil

| Marca | Estilo (rótulo) | IBU | Marca | Estilo (rótulo) | IBU |
|---|---|---|---|---|---|
| Brahma Chopp | Pilsen/American Lager | 10 | Stella Artois | Pilsner | ≈20 |
| Heineken | International Pale Lager | 23 | Antarctica Original | American Lager | 9 |
| Skol | American Lager | 8 | Spaten München | Helles | 21 |
| Amstel | Lager/Pale | 12 | Corona Extra | Mexican lager | 19,3 |
| Budweiser | American Lager | 12 | Eisenbahn Pilsen | Pilsen | 10 |
| Itaipava Pilsen | Pilsen | 9 | Kaiser | American Lager | 8-18 |
| Antarctica (Pilsen) | American/Pilsen | 9 | Bavaria | Pilsen | 8-18 |
| Devassa (Puro malte) | Tropical Lager | 7 | Petra Origem (Puro Malte) | American Lager | 9 |
| Bohemia (Puro Malte) | Lager | 9 | Skol (Puro Malte) | Premium American Lager | 11 |
| Schin | American Lager | 8-18 | Brahma (Duplo Malte) | American Premium Lager | 11 |

Fonte: BJCP (2021); Brahma (2024); COBEB (2024).

Methner e colaboradores (2019) investigaram a capacidade de fermentação de leveduras não-*Saccharomyces* em mosto cervejeiro com valores de 50 e 100 IBU de iso-α-ácidos. No estudo, foram utilizadas leveduras dos gêneros *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Nakazawaea*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora,* *Wickerhamomyces,* *Zygosaccharomyces* e *Zygotorulaspora,* onde todas foram capazes de resistir a 50 IBU.

Os genes encontrados na estirpe G01 associados à sequestração vacuolar, como *VMA5*, *VMA6*, *VMA8, VMA10* e *VMA13*, responsáveis pelas respostas ao estresse oxidativo, também são ativados para tolerância de *S. cerevisiae* aos iso-α-ácidos (Hazelwood et al., 2010; Zhang et al., 2017). Além disso, no estudo de Wang e colaboradores (2024), foi demonstrado que a deleção do gene *POX1* encontrado na estirpe G01, em leveduras cervejeiras tornou a levedura incapaz de suportar altas concentrações de iso-α-ácidos.

A capacidade de floculação da estirpe G01 no presente estudo foi classificada como moderada, conforme descrito no manual dos métodos de análise da ASBC (1992). Esta característica, em uma cerveja não filtrada, apresenta uma turbidez mais acentuada. No genoma de *S cariocanus* G01 foram encontrados os genes *FLO5*, *FLO8*, *FLO9* e *FLO11*, mas não o gene *FLO1*. Este último é considerado um dos principais efetores no fenótipo de floculação em leveduras cervejeiras, e sua ausência pode explicar a moderada floculação da estirpe G01. A presença deste gene modula a atividade de adesinas (Govender et al., 2008; Di Gianvito, 2017).

Atualmente a turbidez pode ser reduzida pelo processo de filtração da cerveja, mas quanto menor a capacidade de floculação do fermento, maior será o custo do processo de filtração. Entretanto, em alguns estilos de cerveja, a turvação é uma característica sensorial importante. Entre estes estilos destacam-se as cervejas tipo *Witbier* e *Weiss*.

No estudo de Pinto e colaboradores (2023), o perfil de floculação foi caracterizado para levedura *S. cerevisiae* WB-06, um fermento comercial utilizado para a produção de cervejas tipo *Weiss*, apresentando um percentual de 46 %, resultado semelhante ao encontrado para *S. cariocanus* G01. Curiosamente, a estirpe G01 mostrou um perfil sensorial (geralmente associado a ésteres) compatível com cervejas belgas, como as *Witbier*, além das tipo *Weiss* (alemãs), que normalmente apresentam uma turvação desejavelmente mais acentuada, mostrando o potencial desta levedura para produzir este tipo de cervejas.

Os genes *PAD1* e *FDC1*, responsáveis pela produção de aroma de cravo em cervejas como as Weiss, foram encontrados no genoma de *S. cariocanus* G01, bem como na cerveja por ela produzida. Ambos os genes são necessários para assegurar que a levedura seja caracterizada como *Phenolic Off-Flavor positiva* ($POF^+$), devido à sua capacidade de descarboxilar ácidos

hidroxicinâmicos em fenóis (Lentz, 2018). A característica também pode estar associada a um sistema de desintoxicação, que garante que as leveduras possam sobreviver a ambientes derivados de plantas ricas em compostos fenólicos (Mukai et al., 2010). Mutações relacionadas à perda da função desses genes podem indicar um sinal de domesticação da estirpe (Gallone et al., 2018). Este fato pode ser explicado pela ampla difusão do fenótipo POF $^{+}$ nas populações selvagens de *S. cerevisiae,* enquanto é incomum em cepas industriais (Gallone, 2016). As leveduras *lager* são conhecidas por serem tradicionalmente POF $^{-}$ (Diderich et al., 2018).

Os genes *ATF1* e *ATF2*, encontrados na estirpe G01 e também presentes em cepas de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (Yoshimoto et al., 1998), desempenham um papel fundamental no perfil de ésteres, especialmente acetato de isoamila, aroma característico de banana (Verstrepen et al., 2003a) e acetato de etila. Um estudo de Verstrepen e colaboradores (2003b), evidenciou que a deleção do gene *ATF1*, foi capaz de causar redução de 40 % na formação de acetato de etila, enquanto em *ATF2* resultou em uma diminuição de 13 % de acetato de etila, propondo que este gene tem um papel menos significativo na formação deste composto.

Segundo Zhang e colaboradores (2012), com a superexpressão do gene *ATF1* e a interrupção do gene *IAH1* (codificador da esterase), foi possível aumentar significativamente o teor de ésteres de acetato, sendo a cepa modificada utilizada para melhorar a produção de ésteres para aplicação em vinhos de arroz. No estudo de Úmido, Smid e Notebaart (2018), mutantes de *S. cerevisiae* foram construídos com deleção dos genes *IAH1* e *TIP1* (gene que codifica uma proteína com atividade esterase putativa), utilizando edição do genoma CRISPR-Cas9, para que perfis de aroma fossem afetados pela deleção, diminuindo a atividade da éster sintase.

A capacidade de produção in vitro do $H_2S$ pela estirpe G01 não afetou negativamente as características sensoriais da cerveja produzida. Este fato pode ser explicado pela possível eliminação do gás durante a fermentação. Em cervejas como as *English Pale Ale,* a presença de $H_2S$ em baixos níveis pode ser aceita, sem comprometer a característica sensorial da bebida (Matos, 2021; Thomas, 2025). Este fato faz com que a produção de $H_2S$ não seja, para alguns autores, um fator de exclusão de uma levedura na fermentação cervejeira. Leon (2020), que testou leveduras não *Saccharomyces* na produção de cervejas especiais utilizando também o meio base *Bismuth Sulfite Agar,* identificou que *Torulaspora delbrueckii* foi produtora do composto, mesmo assim considerou a levedura apta para a produção de cerveja. Por outro lado, Lopes (2016) avaliou o potencial cervejeiro de leveduras selvagens e descartou as estirpes produtoras de $H_2S$. A levedura da espécie *Starmerella bacillaris* também foi testada quanto à produção deste composto no estudo de Englezos e colaboradores (2015), onde todos os 63 isolados da espécie apresentaram média produção através do meio ágar BIGGY.

A estirpe G01 não apresentou o fenótipo *killer*. O fenótipo também não foi encontrado nas estirpes fermentadoras comerciais. Até o momento, não há relatos públicos de uso rotineiro de leveduras com fenótipo *killer* como cepa de produção em cervejarias, embora a aplicação como remediação de contaminações por *S. cerevisiae* var. *diastaticus* já esteja suportada por evidências recentes (Zhong et al., 2024; ASM, 2024; Rhinegeist Brewery, 2024). Em ensaios controlados, as toxinas *killer* de *Saccharomyces*, principalmente K1 e variantes K2, inibiram aproximadamente 90–95 % das diastáticas testadas e, em brassagem simulada, a adição de uma levedura produtora de toxina evitou a hiperatenuação, caracterizando o uso como intervenção pontual, não como fermento principal (Zhong et al., 2024).

No estudo publicado por Reis (2011), foram avaliadas vinte e duas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* isoladas de processos fermentativos quanto à presença de toxina *killer,* utilizando como controle positivo as leveduras *S. cerevisiae* K1 e K2 sobre leveduras sensíveis CCA003 (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e CCA039 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). Porém, nenhuma das cepas demonstrou a produção desta toxina. Outro trabalho que buscou identificar cepas *killer* em sessenta e oito leveduras selvagens isoladas de processos fermentativos de vinhos tropicais, como leveduras *killer* sensíveis *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006*, Candida glabrata* Y55 e *Pichia kluyveri* CAY15, como resultado, apenas sete leveduras apresentaram halo de inibição somente sobre a amostra padrão Y55 (Ponzzes et al., 2007).

De acordo com Goto e colaboradores (1990), em leveduras *Saccharomyces*, as toxinas KHR e KHS são codificadas cromossomicamente e estão presentes em muitas cepas de *S. cerevisiae* e *S. paradoxus*. Além disso, a maioria das toxinas de *Saccharomyces* dependem da presença de vírus fúngicos (micovírus) da família *Totiviridae* (Wickner et al., 2013) que atuam auxiliando a replicar e empacotar pequenos dsRNAs satélite, que codificam apenas genes de toxinas *killer*, sendo transmitidos verticalmente por divisão celular e fusão célula-célula. A presença dessas toxinas no gênero é utilizada para inferir a presença de dsRNAs satélites, porém leveduras que não possuem expressão dessa toxina podem abrigar outros dsRNAs, codificando genes de toxinas não funcionais (S-dsRNAs) (Tipper e Bostian, 1984; Esteban e Wickner, 1988). Embora tenham sido detectados dois genes relacionados à síntese de parede celular em *S. cerevisiae* e à resistência à toxina *killer* (*KRE1* e *KRE5*), nenhum gene associado à sua produção foi detectado no genoma da estirpe G01, o que explica o resultado negativo para esta atividade.

A imobilização de leveduras é um método vantajoso em processos fermentativos, por diminuir o risco de contaminação microbiológica, ser de baixo custo e não possui componentes tóxicos para a célula. A imobilização da estirpe G01 por extrusão em alginato de sódio a 1,5 %

resultou em uma vida de prateleira estável de 13 dias do fermento, não demonstrou nenhuma alteração sensorial do mosto, assim como uma mais rápida fermentação da glicose e sacarose em meio de cultura e a mesma capacidade de atenuação quando comparada com as células livres.

A contagem de células obtidas no interior das esferas está de acordo com os achados em outros estudos. Como exemplo, em alginato microporoso, Kręgiel et al. (2013) contaram aproximadamente $10^6$–$10^7$ células por esfera ao longo da fermentação.

No estudo de Bevilacqua e colaboradores (2020), cinco cepas (quatro *S. cerevisiae* "selvagens" e *S. cerevisiae var. boulardii*) foram microencapsuladas em alginato (extrusão em $CaCl_2$). A viabilidade a 4 °C manteve-se estável por até 30 dias, com contagens iniciais de 7,07–7,81 log UFC/g e sem queda significativa no período de até 30 dias. Já a 25 °C por 7 dias, houve queda de aproximadamente 3 log, caracterizando a refrigeração como condição crítica para retenção de células viáveis. Esses resultados confirmam observações anteriores de Gallo e colaboradores (2014) sobre sobrevivência em 4 °C por até 90 dias com *S. boulardii* em sistemas análogos de alginato.

Naydenova, Kaneva e Kostov (2013) demonstraram que a encapsulação de *S. pastorianus* S23 em matriz de alginato e quitosana para produção de cervejas *lager*, não alterou a condução da fermentação, mas foi capaz de produzir níveis ligeiramente mais elevados de álcoois superiores e ésteres em comparação com leveduras livres que apresentaram níveis mais elevados de aldeídos. A qualidade da cerveja produzida com essas células foi comparável à de cervejas convencionais. Este resultado reforça o potencial do método como uma estratégia promissora para a comercialização e aplicação na produção industrial de cervejas. Após o período de estocagem teste, as esferas não mostraram alterações estruturais.

Por fim, os resultados obtidos evidenciam o elevado potencial biotecnológico da estirpe *S. cariocanus* G01 como fermento cervejeiro nacional, com desempenho fermentativo comparável a cepas comerciais e perfil sensorial enriquecido por ésteres e compostos fenólicos. A tolerância fisiológica, a viabilidade pós-imobilização e a estabilidade estrutural das esferas após a estocagem reforçam sua aplicabilidade industrial. A correlação entre os genes aromáticos identificados e os atributos sensoriais observados sugere forte influência genotípica na expressão de compostos voláteis. Assim, o estudo não apenas destaca a aplicabilidade na indústria cervejeira, como também valoriza a biodiversidade brasileira com a bioprospecção de leveduras nativas.

## 7. CONCLUSÃO

- Os resultados de caracterização fisiológica da levedura *S. cariocanus* G01, foram promissores para aplicação desta levedura como fermento cervejeiro;
- *S. cariocanus* G01 foi capaz de fermentar os principais açúcares presentes no mosto cervejeiro, resistência a 10 % de etanol, elevada tolerância osmótica e resistência a 55 IBU;
- O crescimento *S. cariocanus* G01 nas temperaturas entre 17 ºC e 28 ºC demonstraram que a levedura pode ser classificada como *Ale*;
- O presente estudo apresentou o primeiro genoma de *S. cariocanus*, destacando sua similaridade com *S. paradoxus*;
- Os genes funcionais de *MAL* estão presentes, confirmando os resultados das análises de fermentação. Além disso, foram identificados os genes *ATF1* (associado ao aroma de banana), *PAD1* e *FDC1* (relacionados ao aroma de cravo) perceptíveis sensorialmente na bebida;
- O fenótipo *killer* não foi observado contra fermentos comerciais e a levedura sensível *Nakaseomyces glabrata*, sendo capaz de realizar cofermentações. Assim como na anotação genômica foi possível identificar *KRE1* e *KRE5* relacionados a resistência à toxina *killer* e a síntese de parede celular;
- A bioprospecção de microrganismos autóctones e sua aplicação na fermentação cervejeira se alinham não apenas com os interesses de inovação da indústria, mas também com a preservação da biodiversidade nacional.

Como continuidade deste estudo, propõe-se o sequenciamento genômico das estirpes de *S. cariocanus* visando uma análise comparativa e identificação de marcadores genéticos relevantes, bem como análises transcriptomicas e metabolômicas com o objetivo de aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fermentação e na produção de compostos bioativos. Além do estudo do reaproveitamento das leveduras imobilizadas para avaliação da viabilidade celular, produtividade fermentativa e estabilidade fisiológica, em ciclos sucessivos de fermentação para otimização e redução de custos na aplicação industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F., May, T. W., Frøslev, T. G., Kõljalg, U. (2024). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research*, *52*(D1), D791-D797.

Almeida, A., & de Conto, L. C. (2024). Lúpulo no Brasil: Uma cultura promissora em ascensão. *Food Science Today*, *3*(1), 1-6.

Alsammar, H., & Delneri, D. (2020). An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS yeast research*, *20*(3), foaa013.

Alves Jr, S. L., Herberts, R. A., Hollatz, C., Trichez, D., Miletti, L. C., de Araujo, P. S., & Stambuk, B. U. (2008). Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. *Applied and environmental microbiology*, *74*(5), 1494-1501.

Alves-Jr, S. L., Herberts, R. A., Hollatz, C., Miletti, L. C., & Stambuk, B. U. (2007). Maltose and maltotriose active transport and fermentation by S*accharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *65*(2), 99-104.

Ambrosi, A., Cardozo, N. S. M., & Tessaro, I. C. (2014). Membrane separation processes for the beer industry: A review and state of the art. *Food and bioprocess technology*, *7*(4), 921-936.

Andrews, S. & Babraham, I. (2013) Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence. Disponível em: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. Acesso em 20 de junho de 2025.

Anoop, V., Rotaru, S., Shwed, P. S., Tayabali, A. F., & Arvanitakis, G. (2015). Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *FEMS yeast research*, *15*(6), fov057.

Aprolúpulo (2023). Lúpulo é incluído no programa moderagro e ganha impulso para acelerar crescimento. Disponível em:<https://www.aprolupulo.com.br/noticia/lupulo-e-incluido-no-programa-moderagro-e-ganha-impulso-para-acelerar-crescimento> Acesso em: 14 de julho de 2025.

Araújo, F. B., Silva, P. H. A., & Minim, V. P. R. (2003). Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Food Science and Technology*, *23*, 121-128.

Araujo, T. M., Barga, M. C., Della-Bianca, B. E., & Basso, T. O. (2021). Yeast immobilisation for brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *127*(4), 302-316.

Arlas, F. D., Castro, C., & Eceiza, A. (2015). Obtención de fibras de alginato mediante hilado por coagulación con sulfatos de metales multivalentes. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, *35*(2), 189-200.

ASBC (1992). Methods of analysis. (4th ed.), St Paul, Minnesota, USA.

ASM (2024). *Killer* yeasts may help remedy a craft beer brewing bother. Disponível em: <https://asm.org/press-releases/2024/september/killer-yeasts-may-help-remedy-a-craft-beer-brewing>. Acesso em 24 de setembro de 2025.

Augusti, R. (2021). Perfil de compostos voláteis de um novo estilo de cerveja. *Ciências Agrárias: O Avanço da Ciência no Brasil*, *1*, 291-308.

Barbosa, L. M. (2018). A produção de cerveja ao longo da história. Trabalho de conclusão de curso (Técnico em alimentos integrado ao ensino médio) -Instituto Federal de São Paulo-Campus Barretos.

Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1983). *Yeasts: characteristics and identification* (pp. viii+-811).

Barth Haas (2025). BarthHass Report 2024/2025. Disponível em: <https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/01-barthhaas-2022/Resources/BarthHaas_Report/2025/eng/Web_BarthHaas_Report_2024_25..pdf >. Acesso em 10 de julho de 2025.

Bassani, J. C. (2018). Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná), Paraná, 77 f.

Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations ? *Food Research International*, *86*, 112-120.

Bathke, L. D., Dresch, M. R., & de Souza, C. F. V. (2013). Elaboration and evaluation of some aspects of the quality of gluten-free beer. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, *9*(1), 11.

Baxter, E. D., & Hughes, P. S. (2001). *Beer: Quality, safety and nutritional aspects* (Vol. 27). Royal Society of Chemistry.

Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., Daenen, L., Lynch, M. l., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2018). Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation*, *4*(3), 66.

Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Racioppo, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2020). Microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* into alginate beads: A focus on functional properties of released cells. *Foods*, *9*(8), 1051.

Biddick, R., & Young, E. T. (2009). The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*, *26*(4), 205-220

Billerbeck, S., Walker, R. S., & Pretorius, I. S. (2024). *Killer* yeasts: expanding frontiers in the age of synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, *42*(9), 1081-1096.

Bimbo, F., De Meo, E., Baiano, A., & Carlucci, D. (2023). The value of craft beer styles: Evidence from the Italian market. *Foods*, *12*(6), 1328.

BJCP (2021). Style Guidelines. Disponível em: <https://www.bjcp.org/style/2021/beer/>. Acesso em: 25 de setembro de 2025.

Boekhout, T., Bai, F., Daniel H., Groenewald, M., Robert V., Tan S., Yurkov A. (2018) *Saccharomyces cariocanus.* Disponível em: <https://theyeasts.org/page/Yeasts%20species%20display%20book/2280>. Acesso em: 24 de setembro de 2025.

Bogdan, P., & Kordialik-Bogacka, E. (2017). Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*, *65*, 1-9.

Bolanos-Barbosa, A. D., Rodríguez, C. F., Acuña, O. L., Cruz, J. C., & Reyes, L. H. (2023). The impact of yeast encapsulation in wort fermentation and beer flavor profile. *Polymers*, *15*(7), 1742.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.

Bourbon-Melo, N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Sá-Correia, I. (2021). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 95, 103678.

Boynton, P. J., & Greig, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, *31*(12), 449-462.

Boza, K. C., Tano, Z. N., Bellinati, P. Q., Wiechmann, S. L., Nader, P. A., & Cassela, P. C. (2023). Infecção por *Saccharomyces cerevisiae*: devemos nos preocupar? The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 27, 103301.

Brahma (2024). Brahma duplo malte black. Disponível em: <https://www.brahma.com.br/pt-br/produto/brahma-duplo-malte-black>. Acesso em: 25 de setembro de 2025.

Braidwood, R. J., Sauer, J. D., Helbaek, H., Mangelsdorf, P. C., Cutler, H. C., Coon, C. S., ... & Oppenheim, A. L. (1953). Symposium: did man once live by beer alone ?. *American Anthropologist*, *55*(4), 515-526.

Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., & Teixeira, J. A. (2008). A review of flavour formation in continuous beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, *114*(1), 3-13.

Brasil (2022). Lúpulo no Brasil: perspectivas e realidades (A. Creuz & S. G. Kretzer (eds.); 1st ed. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Brasil (2024). Ministério da Agricultura e Pecuária. Anuário da Cerveja 2024 : ano de referência 2023 / Ministério da Agricultura e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/SDA, 2024.

Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2019). Instrução normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Diário Oficial da União: edição 239: seção 2: Brasília, DF, p. 31.

Bravi, E., Benedetti, P., Marconi, O., & Perretti, G. (2014). Determination of free fatty acids in beer wort. *Food chemistry*, *151*, 374-378.

Bravi, E., Marconi, O., Sileoni, V., & Perretti, G. (2017). Determination of free fatty acids in beer. *Food Chemistry*, *215*, 341-346.

Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., ... & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* species tolerant to brewing-related stress factors for controlled and rapid production of sour beer. *Frontiers in microbiology*, *11*, 279.

Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. B. C. A., & Boulton, C. A. (2004). *Brewing: science and practice*. Elsevier.

Brocard-Masson, C., & Dumas, B. (2006). The fascinating world of steroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *22*(1), 213-252

Buiatti, S. (2009). Beer composition: An overview. *Beer in health and disease prevention*, 213-225.

Cabras, I., Kogler, D. F., Davies, R. B., & Higgins, D. (2023). Beer, brewing, and regional studies. *Regional Studies*, *57*(10), 1905-1908.

Cadenas, R., Caballero, I., Nimubona, D., & Blanco, C. A. (2021). Brewing with starchy adjuncts: Its influence on the sensory and nutritional properties of beer. *Foods*, *10*(8), 1726.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food microbiology*, *56*, 45-51.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2023). Unravelling the potential of non-conventional yeasts and recycled brewers spent grains (BSG) for non-alcoholic and low alcohol beer (NABLAB). *Lwt*, *190*, 115528.

Canuto, M. F. C. S. (2012). Remoção do íon Cd2+ por processo de biossorção em leito fixo usando levedura imobilizada em quitosana.

Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, *38*(12), 5825-5829.

Capece, A., Libkind, D., Burini, J., & Romano, P. (2025). Conventional brewer's yeast: *Saccharomyces*. *Craft Beer*, 97-122.

Carboni, G., Marova, I., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., & Mannazzu, I. (2021). Evaluation of recombinant Kpkt cytotoxicity on HaCaT cells: Further steps towards the biotechnological exploitation yeast *killer* toxins. *Foods*, *10*(3), 556.

Carey, J. (2023). Unearthing the origins of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(15), e2304407120.

Carpentieri-Pipolo, V., Vilarinho, A. A., Caierão, E. & Scagliusi, S.(2023) Linha do tempo da pesquisa com cevada cervejeira no Brasil. (Documentos, 204). Embrapa Trigo

Carvalho, A., Costa, B., Rodrigues F., Bassol, T. O. & Francony, T. M. (2024). Prospecting wild fermenting yeasts from brazilian biomes for application in breweries. In: I Congresso Brasileiro de Biotecnologia Industrial.

Carvalho, D. O., Gonçalves, L. M., & Guido, L. F. (2016). Overall antioxidant properties of malt and how they are influenced by the individual constituents of barley and the malting process. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *15*(5), 927-943.

Cascudo, L. C. (1967). História da alimentação no Brasil. Companhia Editora Nacional.

Chandler, M., Stanley, G. A., Rogers, P., & Chambers, P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Ann Microbiol*, *54*(4), 427-454.

Chen, A., Si, Q., Xu, Q., Pan, C., Qu, T., & Chen, J. (2025). Evaluation of stress tolerance and fermentation performance in commercial yeast strains for industrial applications. *Foods*, *14*(1), 142.

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., ... & Wong, E. D. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*, *40*(D1), D700-D705.

Chopeiras Eltz (2023). Série Herança: a influencia na produção de cerveja. Disponível em: <https://loja.chopeiraseltz.com.br/serie-heranca-a-influencia-alema-na-producao-da-cerveja-blog-chopeiras-eltz?srsltid=AfmBOopwYYH5ekxtZJ0aIAkLHfi5tro5HJdOtBWlCVuoesubka9xp8zt>. Acesso em: 19 de julho de 2025.

Christofoleti-Furlan, R. M., Portugal, C. B., Varize, C. S., Muynarsk, E. D. S. M., Alcarde, A. R., & Basso, L. C. (2020). Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel starters for high-gravity brewing. *Food Research International*, *135*, 109282.

Ciriacy, M., & Reifenberger, E. (2024). Hexose transport. In *Yeast sugar metabolism* (pp. 45-65). CRC Press.

Civil, M (1964). A Hymn to the beer goddess and a drinking song. The Oriental Institute. University of Chicago

Clericuzi, G. Z. (2021). Principais impactos na qualidade da fermentação cervejeira.

Cliften, P. F., Hillier, L. W., Fulton, L., Graves, T., Miner, T., Gish, W. R., & Johnston, M. (2001). Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome research*, *11*(7), 1175-1186.

COBEB (2024). Cerveja Antarctica Original. Disponível em: <https://cobeb.com.br/loja/cervejas/antarctica-original/>. Acesso em: 25 de setembro de 2025.

Corniani, L. S. (2023). Bioprospecção de leveduras nativas em fermentações de cachaça: avaliação de aplicação no desenvolvimento de cervejas especiais. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo. 110 f.

Couto, C. (2022). *Fermentados, destilados e outras bebidas compostas: história e cultura*. Editora Senac São Paulo.

D'Hautcourt, O., & Smart, K. A. (1999). Measurement of brewing yeast flocculation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *57*(4), 123-128.

Damerow, P. (2012). Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. *Cuneiform Digital Library Journal*, *2*(1).

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., ... & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, *27*(15), 2156-2158.

Dank, A., Smid, E. J., & Notebaart, R. A. (2018). CRISPR-Cas genome engineering of esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* steers aroma formation. *BMC research notes*, *11*(1), 682

Day, A. M., Cao, M., Dantas, A. D. S., Ianieva, O., Herrero-de-Dios, C., Brown, A. J., & Quinn, J. (2024). Stress contingent changes in Hog1 pathway architecture and regulation in Candida albicans. *PLoS Pathogens*, *20*(12), e1012314.

De Ávila, R. A., Souza, M. D. C. B., de Paula Dutra, G., & D'arc das Neves Batista, J. (2022). Influência da composição mineral da água na qualidade da cerveja. In *Ciência e Tecnologia de alimentos: o avanço da ciência no Brasil* (Vol. 1, pp. 121-131). Editora Científica Digital.

de Mattos, R. (2021). Os limites da "abertura dos portos às nações amigas". *Navigator*, *17*(34), 58-75.

de Oliveira, N. A. M. (2011). Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. (Monografia em Microbiologia Ambiental e Industrial). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 45f.

de Souza, W. F. C., Almeida, F. L. C., de Melo, A. M., Soares, A. S. P., Forte, M. B. S., de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2022). Immobilization techniques on bioprocesses: Current applications regarding enzymes, microorganisms, and essential oils. *Food and bioprocess technology*, *15*(7), 1449-1476.

Di Canito, A., Foschino, R., Mazzieri, M., & Vigentini, I. (2021). Molecular tools to exploit the biotechnological potential of Brettanomyces bruxellensis: A review. *Applied Sciences*, *11*(16), 7302.

Di Gianvito, P., Tesnière, C., Suzzi, G., Blondin, B., & Tofalo, R. (2017). *FLO 5* gene controls flocculation phenotype and adhesive properties in a *Saccharomyces cerevisiae* sparkling wine strain. *Scientific reports*, *7*(1), 10786.

Díaz, A. B., Durán-Guerrero, E., Lasanta, C., & Castro, R. (2022). From the raw materials to the bottled product: Influence of the entire production process on the organoleptic profile of industrial beers. *Foods*, *11*(20), 3215.

Dickey, A. N., Yim, W. S., & Faller, R. (2009). Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. *The journal of physical chemistry B*, *113*(8), 2388-2397.

Diderich, J. A., Weening, S. M., Van den Broek, M., Pronk, J. T., & Daran, J. M. G. (2018). Selection of Pof- *Saccharomyces eubayanus* variants for the construction of *S. cerevisiae*× *S. eubayanus* hybrids with reduced 4-vinyl guaiacol formation. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1640.

Dietvorst, J., Blieck, L., Brandt, R., Van Dijck, P., & Steensma, H. Y. (2007). Attachment of *MAL32*-encoded maltase on the outside of yeast cells improves maltotriose utilization. *Yeast*, *24*(1), 27-38.

Dinslaken, D. (2018). Ésteres - Série *Off flavours* (falhas na cerveja). Concerveja. Disponível em: <https://concerveja.com.br/esteres/> Acesso em: 10 de julho de 2025.

Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *122*(4), 599-604.

Doğan, A., Demirci, S., Aytekin, A. Ö., & Şahin, F. (2014). Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. Applied biochemistry and biotechnology, 174(1), 28-42.

Du, G., Zheng, K., Sun, C., Sun, M., Pan, J., Meng, D., ... & Zhao, H. (2025). The relationship mammalian p38 with human health and its homolog Hog1 in response to environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *13*, 1522294.

Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J., Valença, G. P., & Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB express*, *3*(1), 31.

Tipper, D. J., & Bostian, K. A. (1984). Double-stranded ribonucleic acid *killer* systems in yeasts. *Microbiological Reviews*, *48*(2), 125-156.

Dufour, J. P., Malcorps, P. H., & Silcock, P. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation. *Brewing yeast fermentation performance*, 213-233.
Durello, R. S., Silva, L. M., & Bogusz Jr, S. (2019). Química do lúpulo. *Química Nova*, *42*(8), 900-919.

Einfalt, D. (2021). Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains. *European Food Research and Technology*, *247*(2), 385-393.

Enache-Angoulvant, A., & Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(11), 1559-1568.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., & Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*, *199*, 33-40

Esteban, R. O. S. A., & Wickner, R. B. (1988). A deletion mutant of LA double-stranded RNA replicates like M1 double-stranded RNA. *Journal of virology*, *62*(4), 1278-1285.

Fangel, J. U., Eiken, J., Sierksma, A., Schols, H. A., Willats, W. G., & Harholt, J. (2018). Tracking polysaccharides through the brewing process. *Carbohydrate polymers*, *196*, 465-473.

Faz-Cortez, O. A., García-García, J. H., Carrizales-Sánchez, A. K., Fonseca-Peralta, H. M., Herrera-Gamboa, J. G., Perez-Ortega, E. R. & Pereyra-Alférez, B. (2025). Maltose and Maltotriose Transporters in Brewer's *Saccharomyces* Yeasts: Polymorphic and Key Residues in Their Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(13), 5943.

Ferreira, L. E. L. (2017). Seleção de leveduras com potencial cervejeiro. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 49 f.

Figueiredo, B. I. C. D. (2016). Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 61 f.

Fischer, G., James, S. A., Roberts, I. N., Oliver, S. G., & Louis, E. J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces. Nature*, *405*(6785), 451-454.

Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Artmed Editora.

Fox, G. P., & Bettenhausen, H. M. (2023). Variation in quality of grains used in malting and brewing. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1172028.

Fredericks, L. R., Lee, M. D., Crabtree, A. M., Boyer, J. M., Kizer, E. A., Taggart, N. T., ... & Rowley, P. A. (2021). The species-specific acquisition and diversification of a K1-like family of *killer* toxins in budding yeasts of the *Saccharomycotina*. *PLoS genetics*, *17*(2), e1009341.

Freitas, C. F. (2023). Brasil consumiu quase 16 bilhões de litros em 2022, um novo recorde. Catalisi. Disponível em: <https://catalisi.com.br/brasil-consumiu-quase-16-bilhoes-de-litros-em-2022-um-novo-recorde/>. Acesso em: 10 de julho de 2025.

Gallo, M., Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2014). Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii,* as representative of yeast functional starter cultures. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(9), 2092-2100.

Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Baele, G., Maere, S. & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, *166*(6), 1397-1410.

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.

García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L. M., Götz, S., Tarazona, S., ... & Conesa, A. (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*, *28*(20), 2678-2679.

Gatrell, J., Reid, N., & Steiger, T. L. (2018). Branding spaces: Place, region, sustainability and the American craft beer industry. *Applied Geography*, *90*, 360-370.

Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, *13*(1), 122-143.

Girardi Piva, G., Casalta, E., Legras, J. L., Tesnière, C., Sablayrolles, J. M., Ferreira, D., ... & Mouret, J. R. (2022). Characterization and role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during white wine alcoholic fermentation. *Fermentation*, *8*(2), 90.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546-567.

Goldammer, T. (2022) *The Brewer's Handbook*, 3rd ed.; Chapter 4. Apex Publishers.

Gomaa, A. (2018). Application of enzymes in brewing. *J. Nutr. Food Sci. Forecast*, *1*(5).

González-Salitre, L., González-Olivares, L. G., & Basilio-Cortes, U. A. (2023). *Humulus lupulus L.* a potential precursor to human health: High hops craft beer. *Food Chemistry*, *405*, 134959.

Goto, K., Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T., & Hara, S. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the KHR *killer* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and biological chemistry*, *54*(4), 979-984.

Govender, P., Domingo, J. L., Bester, M. C., Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2008). Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, *74*(19), 6041-6052.

Griesang, J. I., Rosso, A. C., Kuzniewski, F. C., Bertoldo, V. C., dos Santos Oliveira, M., & Severo, J. (2019). Microencapsulação de compostos bioativos em alimentos. *Boletim Técnico-Científico*, *5*(2).

Guido, L. F., & Ferreira, I. M. (2023). The role of malt on beer flavour stability. *Fermentation*, *9*(5), 464.

Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q., & Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(22), 12158-12163.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072-1075.

Habschied, K., Živković, A., Krstanović, V., & Mastanjević, K. (2020). Functional beer—A review on possibilities. *Beverages*, *6*(3), 51.

Han, E. K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., & Michels, C. A. (1995). Characterization of AGT1 encoding a general α-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Molecular microbiology*, *17*(6), 1093-1107.

Hao, J., Speers, RA, Fan, H., Deng, Y., & Dai, Z. (2020). Uma revisão de derivados amargos cíclicos e oxidativos de ácidos alfa, iso-alfa e beta-lúpulo. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *78* (2), 89-102.

Harper, D. (2025). Beer - Etymology, Origin & Meaning. Disponível em: <https://www.etymonline.com/word/beer>. Acesso em: 17 de setembro de 2025.

Hazelwood, L. A., Walsh, M. C., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2010). Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso-α-acids. *Applied and environmental microbiology*, *76*(1), 318-328

Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, M. R., de Hulster, E. A., van den Broek, M., ... & Daran-Lapujade, P. (2015). *S. cerevisiae*× *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research*, *15*(3), fov005.

Hecht, H., & Srebnik, S. (2016). Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules*, *17*(6), 2160-2167.

Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. Food microbiology, 72, 55-66.

Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V., Dvořák, J., & Hašková, D. (2009). Analysis of free fatty acids in beer: comparison of solid-phase extraction, solid-phase microextraction, and stir bar sorptive extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(23), 11081-11085.

Hornsey, I. S. (2013). *Brewing*. Royal Society of Chemistry.

Hornsey, I. S. (2003). *A history of beer and brewing* (Vol. 34). Royal Society of Chemistry.

Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., Young, T. W., Hough, J. S., Briggs, D. E. & Young, T. W. (1982). Metabolism of wort by yeast. *Malting and Brewing Science: Volume II Hopped Wort and Beer*, 566-614.

Huang, P. H., Lin, Y. C., Lin, Y. W., Zhang, Y. W., & Huang, D. W. (2024). The Potential of Co-Fermentation with *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Low-Alcohol Craft Beer. *Foods*, *13*(23), 3794.

Iorizzo, M., Coppola, F., Letizia, F., Testa, B., & Sorrentino, E. (2021). Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. *Processes*, *9*(5), 839.

Jackson, L. S., & Lee, K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Lebensm. Wiss. Technol*, *24*(4), 289-297.

Jacques, N., & Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *International journal of food microbiology*, *126*(3), 321-326.

Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, *9*(1), 5114.

Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H2S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*(2), 269-273.

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one*, *6*(2), e16015.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, *30*(4), 772-780.

Kayadelen, F., Agirman, B., Jolly, N. P., & Erten, H. (2023). The influence of *Torulaspora delbrueckii* on beer fermentation. *FEMS yeast research*, *23*, foad006.

Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., & Lander, E. S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, *423*(6937), 241-254.

Kempf, C., Lengeler, K., & Wendland, J. (2017). Differential stress response of *Saccharomyces* hybrids revealed by monitoring Hsp104 aggregation and disaggregation. Microbiological research, 200, 53-63.

Kerruish, D. W., Cormican, P., Kenny, E. M., Kearns, J., Colgan, E., Boulton, C. A., & Stelma, S. N. (2024). The origins of the Guinness stout yeast. *Communications Biology*, *7*(1), 68.

Khalid, Sultan (2024). 15 larged beer companies in the world. Disponível em <https://finance.yahoo.com/news/15-largest-beer-companies-world-182520362.html> Acesso em: 10 de julho de 2025.

Kirin (2024). Global Beer Consumption by Country in 2023. Disponível em: <ww.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2024/1219_01.html>. Acesso em 3 de julho de 2025

Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and *killer* yeasts. In *Yeasts in natural ecosystems: Ecology* (pp. 229-275). Cham: Springer International Publishing.

Klimczak, K., & Cioch-Skoneczny, M. (2023). Changes in beer bitterness level during the beer production process. *European Food Research and Technology*, *249*(1), 13-22.

Klingberg, T. D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P., & Jespersen, L. (2008). Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS yeast research*, *8*(4), 631-640.

de Llanos, R., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2006). A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *90*(3), 221-231.

Knez Hrnčič, M., Španinger, E., Košir, I. J., Knez, Ž., & Bren, U. (2019). Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*, *11*(2), 257.

Kornblatt, M. J., Richard Albert, J., Mattie, S., Zakaib, J., Dayanandan, S., Hanic-Joyce, P. J., & Joyce, P. B. M. (2013). The *Saccharomyces cerevisiae* enolase-related regions encode proteins that are active enolases. *Yeast*, *30*(2), 55-69.

Kovaleski, Gabriela. (2019) Estudo da imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de sódio. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 77 f.

Kowalska, J., Krzymińska, J., & Tyburski, J. (2022). Yeasts as a potential biological agent in plant disease protection and yield improvement—A short review. *Agriculture*, *12*(9), 1404.

Kucharczyk, K., Tuszyński, T., Żyła, K., & Puchalski, C. (2020). The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer. *Czech Journal of Food Sciences*, *38*(3).

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex'determined from multigene sequence analyses. *FEMS yeast research*, *3*(4), 417-432.

Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Kyselová, L., & Brányik, T. (2015). Quality improvement and fermentation control in beer. In *Advances in fermented foods and beverages* (pp. 477-500). Woodhead Publishing.

Lallemand (2025). SafAle™ US-05. Disponível em: <https://fermentis.com/en/product/safale-us%E2%80%9105/> . Acesso em: 5 de agosto de 2025.

Lamas Brew Shop (2019). Fermento Lallamand - Nottingham. Disponível em: <https://www.lamasbrewshop.com.br/insumos/levedura/ale/fermento-lallemand-nottingham?srsltid=AfmBOoq-Gu96-EshbwmSvvLYcndMrRrJNl3UMDVKIo4ePJo73vUozFR1>. Acesso em: 5 de agosto de 2025.

Landaud, S., Helinck, S., & Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied microbiology and biotechnology*, *77*(6), 1191-1205.

Large, C. R., Hanson, N., Tsouris, A., Saada, O. A., Koonthongkaew, J., Toyokawa, Y., ... & Dunham, M. J. (2020). Genomic stability and adaptation of beer brewing yeasts during serial repitching in the brewery. *BioRxiv*, 2020-06.

Leker, J., & Maye, J. P. (2023). Discovery of Acetohumulone and Acetolupulone a New Hop Alpha Acid and Beta Acid. *Journal of the american Society of Brewing chemiStS*, *81*(2), 276-281.

Lentz, M. (2018). The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation*, *4*(1), 20.

Leon, M. P. (2020). Seleção de leveduras não *Saccharomyces* para produção de cervejas especiais. (Mestrado em Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144 f.

Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics*, *25*(14), 1754-1760.

Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., ... & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(35), 14539-14544.

Limberger, S. C. (2013). O setor cervejeiro no Brasil: Gênese e evolução. *CaderNAU*, *6*(1).

Limberger, S. C., & Cunha, R. C. C. (2025). Dinâmica da produção e das importações de cevada e lúpulo para a indústria cervejeira no Brasil. *Revista Ciência Geográfica*, *29*(2)

Liszkowska, W., & Berlowska, J. (2021). Yeast fermentation at low temperatures: Adaptation to changing environmental conditions and formation of volatile compounds. *Molecules*, *26*(4), 1035.

Liti, G., Barton, D. B., & Louis, E. J. (2006). Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, *174*(2), 839-850.

Liti, G., Peruffo, A., James, S. A., Roberts, I. N., & Louis, E. J. (2005). Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto complex*. *Yeast*, *22*(3), 177-192.

Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G., & Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, *21*, 783-793.

Lomuscio, E., Bianchi, F., Cervini, M., Giuberti, G., Simonato, B., & Rizzi, C. (2022). Durum wheat fresh pasta fortification with trub, a beer industry by-product. *Foods*, *11*(16), 2496.

Lopes, T. (2016). Isolamento e identificação de leveduras selvagens de Citrus reticulata com potencial para a fermentação de cervejas. Monografia (Bacharel em Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 60f.

López-Menchero, J. R., Ogawa, M., Mauricio, J. C., Moreno, J., & Moreno-García, J. (2021). Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system. *Lwt*, *144*, 111250.

Maekawa, H., & Takegawa, K. (2020). Yeast flocculin: Methods for quantitative analysis of flocculation in yeast cells. *Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols*, 437-444.

Magalhaes, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., & Gibson, B. (2016). Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast S*accharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Research*, *16*(5), fow053.

Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, *8*(8), 1142.

Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M. & Ciani, M. (2019). Yeast *killer* toxins: From ecological significance to application. Critical reviews in biotechnology, 39(5), 603-617.

MAPA (2021). Mercado cervejeiro cresce no Brasil e aumenta interesse pela produção nacional de lúpulo e cevada. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/08/mercado-cervejeiro-cresce-no-brasil-e-aumenta-interesse-pela-producao-nacional-de-lupulo-e-cevada> Acesso em: 10 de julho de 2025

Martin, J. G. P., & de Dea Lindner, J. (2022). *Microbiologia de alimentos fermentados*. Editora Blucher.

Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., & Batista, N. N. (2024). Beer and Wine Production and Bioreactor Technology. In *Bioreactor Technology in Food Processing* (pp. 243-270). CRC Press.

Matos, T. T. S. (2021). Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho. Tese (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. 178 f.

McBride, R., Greig, D., & Travisano, M. (2008). Fungal viral mutualism moderated by ploidy. *Evolution*, *62*(9), 2372-2380.

McGovern, P. E. (2010). *Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages*. University of California Press

McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A. & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(51), 17593-17598.

Mehta, D. V., Curtis, S. J., Rudolph, A. B., Mary, C. S., Goodrich, R., Schneider, K. R., & MacIntosh, A. J. (2021). A Mini review: The history of yeast flocculation with an emphasis on measurement techniques. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *79*(4), 333-339.

Menoncin, M., & Bonatto, D. (2019). Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, *125*(4), 402-411.

Methner, Y., Hutzler, M., Matoulková, D., Jacob, F., & Michel, M. (2019). Screening for the brewing ability of different non-*Saccharomyces* yeasts. *Fermentation*, *5*(4), 101.

Michel, R. H., McGovern, P. E., & Badler, V. R. (1993). The first wine & beer. *Analytical chemistry*, *65*(8), 408A-413A.

McCusker, J. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A., & Davis, R. W. (1994). Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*, *136*(4), 1261-1269.

Microambiental (2021). Por que monitorar qualidade da água na indústria de cerveja? Disponível em: <https://microambiental.com.br/analises-de-agua/por-que-monitorar-a-qualidade-da-agua-na-industria-de-cerveja/>. Acesso em: 20 de julho de 2025.

Milani, E. A., & Silva, F. V. (2022). Pasteurization of beer by non-thermal technologies. *Frontiers in Food Science and Technology*, *1*, 798676.

Ministério da Agricultura e Pecuária (2024). Com 1.847 cervejarias registradas no Brasil, setor cresce 6,8% em 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-1-847-cervejarias-registradas-no-brasil-setor-cresce-6-8-em-2023> Acesso em: 02 de fevereiro de 2025

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2013). *Instrução Normativa nº 11, de 13 de março de 2013*. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-11-de-13-de-marco-de-2013.pdf>. Acesso em 3 de fevereiro de 2025.

Minnaar, P. P., Du Plessis, H. W., Jolly, N. P., Van Der Rijst, M., & Du Toit, M. (2019). Non-*Saccharomyces* yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine. *Food Chemistry: X*, *4*, 100070.

Morado, R. (2017) Larousse da cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo. São Paulo: Alaúde Editorial

Morais, P. B., Hagler, A. N., Rosa, C. A., Mendonca-Hagler, L. C., & Klaczko, L. B. (1992). Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, *38*(11), 1150-1155.

Moreiras, P. (2014). *Pão & vinho: mil e uma histórias de comer e beber*. Leya.

Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 241.

Morgan, D. R., Thomas Lane, E., & Styles, D. (2022). Crafty marketing: an evaluation of distinctive criteria for "craft" beer. *Food Reviews International*, *38*(5), 913-929.

Mosher, R. (2022). *Radical Brewing: receitas, contos e ideias transformadoras em um copo de cerveja*. Editora Krater.

Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., & Iefuji, H. (2010). *PAD1* and *FDC1* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, *109*(6), 564-569.

Muxel, A. A. (2022). *Química da Cerveja: Uma Abordagem Química e Bioquímica das Matérias-Primas, Processo de Produção e da Composição dos Compostos de Sabores da Cerveja*. Editora Appris

Nascimento, A. P. S., & Barros, A. N. (2025). Sustainable Innovations in Food Microbiology: Fermentation, Biocontrol, and Functional Foods. *Foods*, *14*(13), 2320.

Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H., Michaels, C. J., Gini, B., Nueno-Palop, C., ... & Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from Quercus robur. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(6), 2046-2052.

Nasheuer, H. P., Smith, R., Bauerschmidt, C., Grosse, F., & Weisshart, K. (2002). Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms.

Nasuti, C., & Solieri, L. (2024). Yeast bioflavoring in beer: Complexity decoded and built up again. *Fermentation*, *10*(4), 183.

Naumov, G. I. (2000a). *Saccharomyces bayanus var. uvarum* comb, nov., a new variety established by genetic analysis. *Microbiology*, *69*(3), 338-342.

Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J., & Roberts, I. N. (2000b). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto complex*: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *50*(5), 1931-1942.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., & Michels, C. A. (1994). Genetic variation of the repeated *MAL* loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, *136*(3), 803-812.

Naydenova, V., Vassilev, S., Kaneva, M., & Kostov, G. (2013). Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: comparative study of beer fermentation with immobilized and free cells. *Bulgarian J Agric Sci*, *19*(Suppl 2), 123-127.

Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., ... & Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast*, *32*(1), 173-216.

Nehra, M., Grover, N., Sandhu, K. S., & Thory, R. (2024). Raw Material for Beer Manufacturing. In *Fruit Fortification of Craft Beer* (pp. 37-72). Cham: Springer International Publishing.

Nelson, F. B., Pickering, J., Murray, C., & Eskiw, C. (2024). Serial Re-Pitching of Yeast Impacts Final Flavor Profiles of Commercial Beer. *Fermentation*, *10*(11), 593.

New, A. M., Cerulus, B., Govers, S. K., Perez-Samper, G., Zhu, B., Boogmans, S. & Verstrepen, K. J. (2014). Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS biology*, *12*(1), e1001764.

Novotny, C., Flieger, M., Panos, J., & Karst, F. (1992). Effect of 5, 7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and applied biochemistry*, *15*(3), 314-320.

Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, *123*(1), 13-23.

Ono, B., Ishii, N., Fujino, S., & Aoyama, I. (1991). Role of hydrosulfide ions (HS-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, *57*(11), 3183-3186.

Ortiz, S. (2017). *Imobilização de Saccharomyces cerevisiae em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas*. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. 97 f.

Oxford English Dictionary (2023). Beer, n. Oxford English Dictionary Online. Disponível em: <https://www.oed.com/dictionary/beer_n1?tl=true>. Acesso em: 17 setembro de 2025.

Palmer, J. J. (2006). *How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time*. Brewers Publications.

Palmer, J. M., & Stajich, J. (2020). Funannotate v1. 8.1: Eukaryotic genome annotation. *Zenodo*, *2020*(4054262).

Pereira, C. M. (2021). *Cerveja: história e cultura*. Editora Senac São Paulo.

Piccini, Ana Rita, Cristiano, Moresco, Larissa, Munhoz (2022). Secagem. Disponível em; <https://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prcerea/cerveja/secama.htm>. Acesso em: 10 de julho de 2025.

Pina, R. L., Cruz, D. C. P., & Martelli, M. C. (2022). Avaliação da influência de aromas gerados por leveduras não convencionais utilizadas na produção de cerveja: uma revisão. *Research, Society and Development*, *11*(17), e43111738868-e43111738868.

Pinto, F. O. (2018). Isolamento, seleção e caracterização de leveduras selvagens com potencial para a produção de cerveja. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 80 f.

Pinto, F. O., Lopes, T., Vieira, A. M., Oliveira, R. O., Gomes, F. F., Fabricio, M. F., ... & Valente, P. (2023). Isolation, selection and characterization of wild yeasts with potential for brewing. *Journal of the american Society of Brewing chemiStS*, *81*(2), 221-232.

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*, 1937-1949.

Polak, N., Kalisz, S., & Kruszewski, B. (2024). High-temperature short-time and ultra-high-temperature processing of juices, nectars and beverages: influences on enzyme, microbial inactivation and retention of bioactive compounds. *Applied Sciences*, *14*(19), 8978.

Ponzzes, C. D., Santana, C., Pereira, G., Gava, C., Santos, J. D. O., Siqueira, S., & de Cássia T., R. (2007). Caracterização do fator *killer* em leveduras selvagens isoladas durante o processo fermentativo de vinhos tropicais no Brasil.

Poreda, A., Tuszyński, T., Zdaniewicz, M., Sroka, P., & Jakubowski, M. (2013). Support materials for yeast immobilization affect the concentration of metal ions in the fermentation medium. *Journal of the Institute of Brewing*, *119*(3), 164-171.

Postigo, V., Esteban, S., & Arroyo, T. (2023). *Lachancea thermotolerans*, an innovative alternative for sour beer production. *Beverages*, *9*(1), 20.

Prado, R., Gastl, M., & Becker, T. (2021). Aroma and color development during the production of specialty malts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(5), 4816-4840.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, *20*(1), 7-14.

Puccinelli, F (2022). Como evitar *off-flavor* na cerveja?. Disponível em: <https://www.lamasbrewshop.com.br/blog/2022/10/como-evitar-off-flavor-na-cerveja.html#:~:text=Leveduras%20lagers%20s%C3%A3o%20bem%20conhecidas,e%20sumir%20com%20o%20tempo.>. Acesso em: 10 de janeiro de 2025.

Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R., & Ko, S. (2011). Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(9), 1133-1144.

Punčochářová, L., Pořízka, J., Diviš, P., & Štursa, V. (2019). Study of the influence of brewing water on selected analytes in beer. *Slovak Journal of Food Sciences/Potravinarstvo*, *13*(1).

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D590-D596.

Querol, A., & Bond, U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS microbiology letters*, *293*(1), 1-10.

Raafat, M., & Fouad, M. (2018). Egyptian Beverages: A Journey through Ancient to Modern Times. *International Academic Journal Faculty of Tourism and Hotel Management*, *4*(4), 194-230.

Raihofer, L., Zarnow, M., Gastl, M., & Hutzler, M. (2022). A short history of beer brewing: Alcoholic fermentation and yeast technology over time. *EMBO reports*, *23*(12), e56355.

Rainieri, S., Zambonelli, C., & Kaneko, Y. (2003). *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. *Journal of bioscience and bioengineering*, *96*(1), 1-9.

Ramírez, A., & Viveros, J. M. (2021). Brewing with *Cannabis sativa* vs. *Humulus lupulus*: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, *127*(3), 201-209.

Rani, H., & Bhardwaj, R. D. (2021). Quality attributes for barley malt “The backbone of beer”. *Journal of Food Science*, *86*(8), 3322-3340

Ray, R. C., Paramithiotis, S., Thekkangil, A., Nethravathy, V., Rai, A. K., & Martin, J. G. P. (2024). Food fermentation and its relevance in the human history. In *Trending topics on fermented foods* (pp. 1-57). Cham: Springer Nature Switzerland.

Reis, V. R. (2011). Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. Dissertação (Mestre em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. 81 f.

Rettberg, N., Biendl, M., & Garbe, L. A. (2018). Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools—A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *76*(1), 1-20.

Rhinegeist (2024) Attack of the *killer* yeasts!!!(Is a good thing). Disponível em: <https://rhinegeist.com/blog/features/attack-of-the-killer-yeasts-is-a-good-thing/>. Acesso em: 24 de setembro de 2025.

Ribeiro, B. P., Marra, B. M., Nucci, E. R., Fabiano, D. P., Parreira, C. C. A., & Laizo, W. S. (2023). Imobilização de microrganismos em esferas de carragena. *Conjecturas*, *23*(2), 273-289.

Ricarte, S. (2024). História da cerveja: suas mudanças ao longo do tempo. Disponível em: <https://cervejaeresenha.com.br/historia-da-cerveja-suas-mudancas-ao-longo-do-tempo/>. Acesso em: 19 de julho de 2025

Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A., ... & Gil, A. M. (2010). Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*, *674*(2), 166-175.

Rohbrau (2021). Diferentes formas de lúpulo e os processos envolvidos. Disponível em: <https://rohbrau.com/diferentes-formas-de-lupulo-e-os-processos-envolvidos/>. Acesso em: 20 de junho de 2025

Romanio, M. R., Coraine, L. A., Maielo, V. P., Abramczyc, M. L., Souza, R. L. D., & Oliveira, N. F. (2017). Fungemia por *Saccharomyces Cerevisiae* em paciente pediátrico após tratamento com probiótico. *Revista Paulista de Pediatria*, *35*(3), 361-364.

Rosa, N. A., & Afonso, J. C. (2015). A química da cerveja. *Revista Química Nova. São Paulo*, *37*, 98-105.

Russell, I. (2003). Compreendendo os fundamentos da levedura. *The alcohol textbook*, *4* (2003), 531-537.

Saavedra, D., Godoy, P., Narváez, C., Zepeda, S., Urrutia, M., Brevis, P., & Reyes, E. (2005). Brettanomyces, un contaminante en nuestras viñas. *Cienc Trab*, *7*, 93-96.

Saberi Riseh, R., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20), 11165.

Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2024). Potential applications of encapsulated yeasts especially within alginate and chitosan as smart bioreactors and intelligent micro-machines. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *7*, 100513.

Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022). Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science & Technology*, *128*, 278-295.

Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and environmental microbiology*, *74*(2), 454-461

Sahana, G. R., Balasubramanian, B., Joseph, K. S., Pappuswamy, M., Liu, W. C., Meyyazhagan, A., & Joseph, B. V. (2024). A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: current knowledge in biotechnological applications and future directions. *Process Biochemistry*, *138*, 1-13.

Salimbeni, J. F., Meneguetti, M., & Rolim, T. F. (2016). Caracterização da água e sua influência sensorial para a produção de cerveja artesanal.

Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. Applied and environmental microbiology, 77(7), 2292-2302

Samuel, D. (1996). Archaeology of ancient Egyptian beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *54*(1), 3-12.

Schaffrath, R., Meinhardt, F., & Klassen, R. (2018). Yeast *killer* toxins: Fundamentals and applications. *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects*, 87-118.

Servienė, E., & Serva, S. (2023). Recent advances in the yeast *killer* systems research. *Microorganisms*, *11*(5), 1191.

Shen, D., He, X., Weng, P., Liu, Y., & Wu, Z. (2022). A review of yeast: High cell-density culture, molecular mechanisms of stress response and tolerance during fermentation. *FEMS Yeast Research*, *22*(1), foac050.

Shopska, V., Dzhivoderova-Zarcheva, M., & Kostov, G. (2024). Continuous Primary Beer Fermentation with Yeast Immobilized in Alginate–Chitosan Microcapsules with a Liquid Core. *Beverages*, *10*(3), 87.

Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto complex*. *Comptes rendus biologies*, *334*(3), 229-236.

Silva, Carlos Henrique Pessôa de Menezes. (2019). Microbiologia da cerveja: do básico ao avançado, o guia definitivo. Editora Livraria da Física. São Paulo

Silva, J. d. C (2018). Produção de cerveja artesanal com uso de leveduras livres e leveduras imobilizadas em alginato. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília. 57 f.

Silva, P. A. D. (2022). Potencial tecnológico de leveduras *Não-Saccharomyces.* Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco. 44 f.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics, 31(19), 3210-3212.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, *31*(19), 3210-3212.

SINDICERV (2024). Produção de cerveja no Brasil atinge volume recorde em 2023. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/noticias/producao-de-cerveja-no-brasil-atinge-volume-recorde-em-2023/> Acesso em: 7 de junho de 2025

Singer, M. A., & Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. Molecular cell, 1(5), 639-648.

Siqueira, P. B., Bolini, H. M. A., & Macedo, G. A. (2009). O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, *19*(4), 491-498.

Spósito, M. B., Ismael, R. V., Barbosa, C. D. A., & Tagliaferro, A. L. (2019). A cultura do lúpulo. *Série Produtor Rural*, *68*.

Stewart, G. G. (2013). Biochemistry of brewing. In *Biochemistry of foods* (pp. 291-318). Academic Press.

Stewart, G. G. (2014). *Saccharomyces* | *Saccharomyces cerevisiae*. Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3, 297-301.

Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces* species in the Production of Beer. *Beverages*, *2*(4), 34.

Stewart, G. G. (2018a). Yeast flocculation—sedimentation and flotation. *Fermentation*, *4*(2), 28.

Stewart, G. G. (2018b). Harvesting and cropping yeast: flocculation and centrifugation. In *Brewing and distilling yeasts* (pp. 259-308). Cham: Springer International Publishing.

Stewart, G. G. (2018c). Stress Effects on Yeast During Brewing and Distilling Fermentations: High-Gravity Effects. In *Brewing and Distilling Yeasts* (pp. 199-240). Cham: Springer International Publishing.

Stewart, G. G., & Russell, I. (1998). An introduction to brewing science and technology series III. *Brewer's Yeast. Institute of Brewing, London*.

Sulo, P., Szabóová, D., Bielik, P., Poláková, S., Šoltys, K., Jatzová, K., & Szemes, T. (2017). The evolutionary history of *Saccharomyces* species inferred from completed mitochondrial genomes and revision in the ‘yeast mitochondrial genetic code’. *DNA Research*, *24*(6), 571-583.

Sun, L., Kwak, S., & Jin, Y. S. (2019). Vitamin A production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* from xylose via two-phase in situ extraction. *ACS synthetic biology*, *8*(9), 2131-2140.

Talebnia, F., & Taherzadeh, M. J. (2006). In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated S. cerevisiae. *Journal of biotechnology*, *125*(3), 377-384.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022-3027.

Tan, M., Caro, Y., Shum-Cheong-Sing, A., Robert, L., François, J. M., & Petit, T. (2021). Evaluation of mixed-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Saprochaete suaveolen*s to produce natural fruity beer from industrial wort. *Food Chemistry*, *346*, 128804.

Terzulli, A., & Kosman, D. J. (2010). Analysis of the high-affinity iron uptake system at the *Chlamydomonas reinhardtii* plasma membrane. *Eukaryotic cell*, *9*(5), 815-826.

Thesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. *Current protocols in microbiology*, *54*(1), e91.

Thomas, K. (2025). The Oxford Companion to Beer definition of hydrogen sulfide. Disponível em: https://beerandbrewing.com/dictionary/1gutkReoew/ . Acesso em: 17 de julho de 2025.

Thompson, A., & Dawson, P. (2023). Historical Perspective and Current Challenges for Microbreweries on Bacterial Spoilage of Beer: Bacterial spoilage of beer. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, *5*(1), 80-84.

Toledo, A., Silveira, P., & Capuci, A. S. (2018). Produção de cerveja artesanal. II Encontro de Desenvolvimento de Processos Agroindustriais - Universidade de Uberaba (Uniube).

Tongeren, F. V. (2011). Standards and international trade integration: a historical review of the German'Reinheitsgebot'.

Unger, R. W. (2004). *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*. University of Pennsylvania Press.

Valério, H. M., de Novais Capuchinho, L. M., de Sousa Lima, B., Versiani, M. S., Borges, M. A. Z., & da Silva Alves, J. M. (2024). Leveduras não-*Saccharomyces* com potencial cervejeiro isoladas de frutos do Cerrado. *Revista Unimontes Científica*, *26*(2).

Van Nguyen, P., Plocek, V., Váchová, L., & Palková, Z. (2020). Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild. *npj Biofilms and Microbiomes*, *6*(1), 7.

Vaštík, P., Sulo, P., Rosenbergová, Z., Klempová, T., Dostálek, P., & Šmogrovičová, D. (2023). Novel *Saccharomyces cerevisiae*× *Saccharomyces mikatae* Hybrids for Non-alcoholic Beer Production. *Fermentation*, *9*(3), 221.

Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (1998). *Saccharomyces* meyen ex reess. In *The yeasts* (pp. 358-371). Elsevier.

Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (2011). *Saccharomyces* meyen ex reess (1870). In *The yeasts* (pp. 733-746). Elsevier.

Venturini Filho, W. G. (2021). *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia* (Vol. 1). Editora Blucher.

Vergara-Álvarez, I., Quiroz-Figueroa, F., Tamayo-Ordóñez, M. C., Oliva-Hernández, A. A., Larralde-Corona, C. P., & Narváez-Zapata, J. A. (2019). Flocculation and expression of FLO genes of a *Saccharomyces cerevisiae* mezcal strain with high stress tolerance. *Food technology and biotechnology*, *57*(4), 544-553.

Verstrepen, K. J., Moonjai, N., Bauer, F. F., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., ... & Smart, K. (2003a). Genetic regulation of ester synthesis in yeast: new facts, insights and implications for the brewer.

*Brewing yeast fermentation performance*, *234*, 248.

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., ... & Delvaux, F. R. (2003b). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, Lg-*ATF1,* and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and environmental microbiology*, *69*(9), 5228-5237.

Vianna, C. R., Silva, C. L., Neves, M. J., & Rosa, C. A. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaca: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. Antonie Van Leeuwenhoek, 93(1), 205-217.

Vijayraghavan, S., Kozmin, S. G., Strope, P. K., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., & McCusker, J. H. (2023). RNA viruses, M satellites, chromosomal *killer* genes, and *killer*/non*killer* phenotypes in the 100-genomes *S. cerevisiae* strains. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *13*(10), jkad167.

Vinayagamoorthy, K., Pentapati, K. C., & Prakash, H. (2023). Epidemiology of *Saccharomyces* fungemia: A systematic review. *Medical Mycology*, *61*(2), myad014.

Wang, O., Gellynck, X., & Verbeke, W. (2017). Chinese consumers and European beer: Associations between attribute importance, socio-demographics, and consumption. *Appetite*, *108*, 416-424.

Wang, S. A., & Bai, F. Y. (2008). *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *58*(2), 510-514.

Wang, Z., Xiao, Y., Li, X., Li, Z., Wang, Y., He, W., ... & Deng, Y. (2024). POX1 regulates the formation of viable but non-culturable brewer's yeast induced by iso-alpha acid from hops. *Food Sci. Hum. Wellness*, *14*.

Watanabe, M., Chen, C. Y., & Levin, D. E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(24), 16829-16836.

White, C., & Zainasheff, J. (2022). *Levedura: guia prático para a fermentação de cerveja*. Editora Krater.

Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in virus research*, *86*, 1-36.

Willaert, R. G., Kayacan, Y., & Devreese, B. (2021). The Flo adhesin family. *Pathogens*, *10*(11), 1397.

Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, *51*(1), 115-126.

Yang, J. S., Xie, Y. J., & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate polymers*, *84*(1), 33-39.

Yerolla, R., KM, M. M., Roy, N., Harsha, N. S., Ganesh, M. P. P., & Besta, C. S. (2022). Beer fermentation modeling for optimum flavor and performance. *IFAC-PapersOnLine*, *55*(1), 381-386.

Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., & Tamai, Y. (1998). Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of fermentation and bioengineering*, *86*(1), 15-20.

Younis, M., Ahmed, I. A. M., Özcan, M. M., Uslu, N., & Albakry, Z. (2024). The role of malting and germination times on the distribution of bioactive compounds and antioxidant activities of barley grains. *International Journal of Food Science and Technology*, *59*(9), 6289-6297.

Yu, Z., Zhao, M., Li, H., Zhao, H., Zhang, Q., Wan, C., & Li, H. (2012). A comparative study on physiological activities of lager and ale brewing yeasts under different gravity conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *17*, 818-826.

Zapryanova, P., Gaytanska, Y., Shopska, V., & Kostov, G. (2025). Non-conventional yeasts in beer production-A review. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 170, p. 01015). EDP Sciences.

Zeyl, C. (2000). Budding yeast as a model organism for population genetics. *Yeast*, *16*(8), 773-784.

Zhang, J. W., Zhang, C. Y., Dai, L. H., Dong, J., Liu, Y. L., Guo, X. W., & Xiao, D. G. (2012). Effects of overexpression of the alcohol acetyltransferase-encoding gene *ATF1* and disruption of the esterase-encoding gene *IAH1* on the flavour profiles of Chinese yellow rice wine. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(12), 2590-2596.

Zhang, K., Jia, C., Yu, Q., Xiao, C., Dong, Y., Zhang, M., ... & Li, M. (2017). Contribution of *VMA5* to vacuolar function, stress response, ion homeostasis and autophagy in *Candida albicans*. *Future microbiology*, *12*(13), 1147-1166.

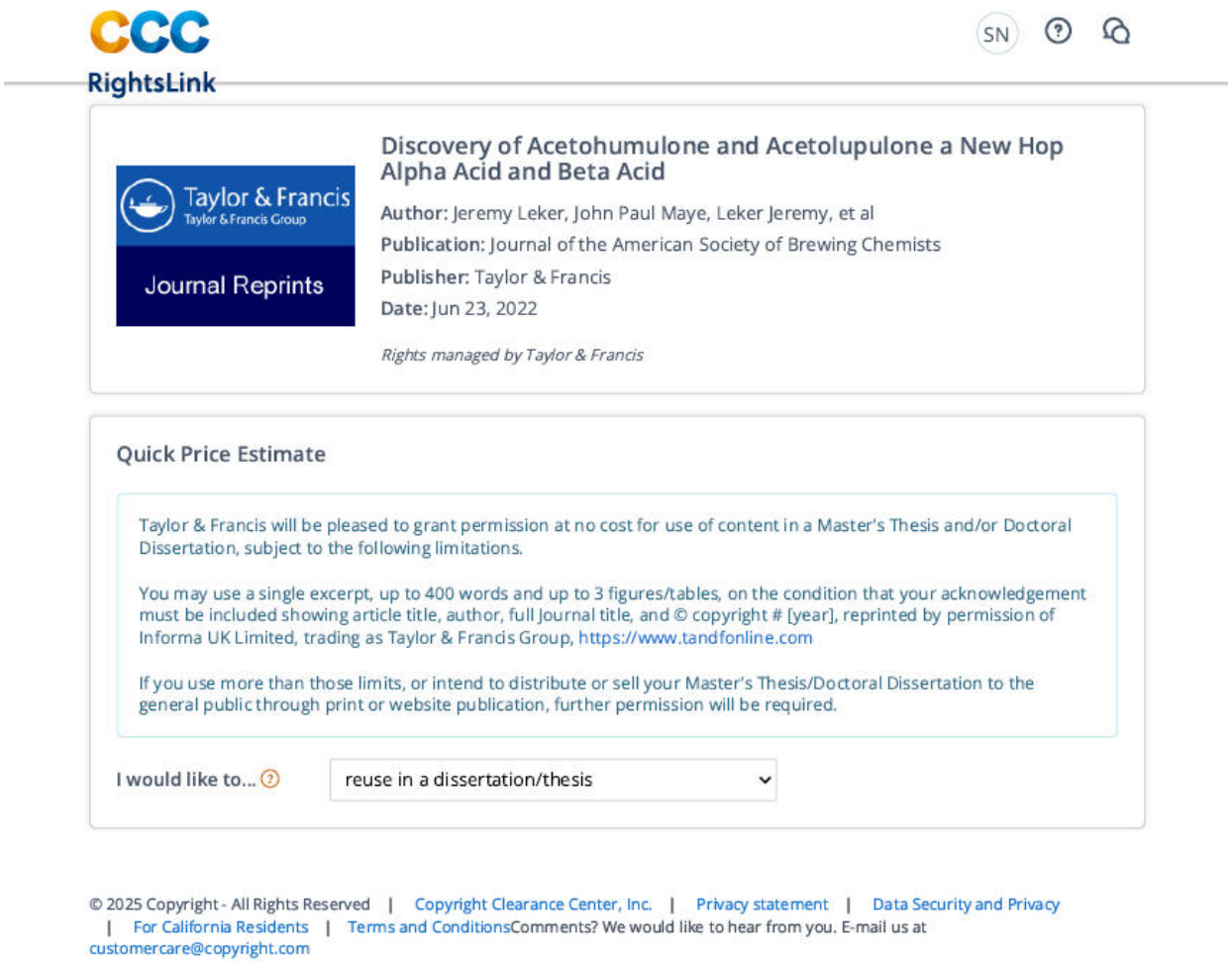
Zheng, C., Hou, S., Zhou, Y., Yu, C., & Li, H. (2024). Regulation of the *PFK1* gene on the interspecies microbial competition behavior of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*(1), 272.

Zhong, V., Ketchum, N., Mackenzie, J. K., Garcia, X., & Rowley, P. A. (2024). Inhibition of diastatic yeasts by *Saccharomyces killer* toxins to prevent hyperattenuation during brewing. *Applied and Environmental Microbiology*, *90*(10), e01072-24.

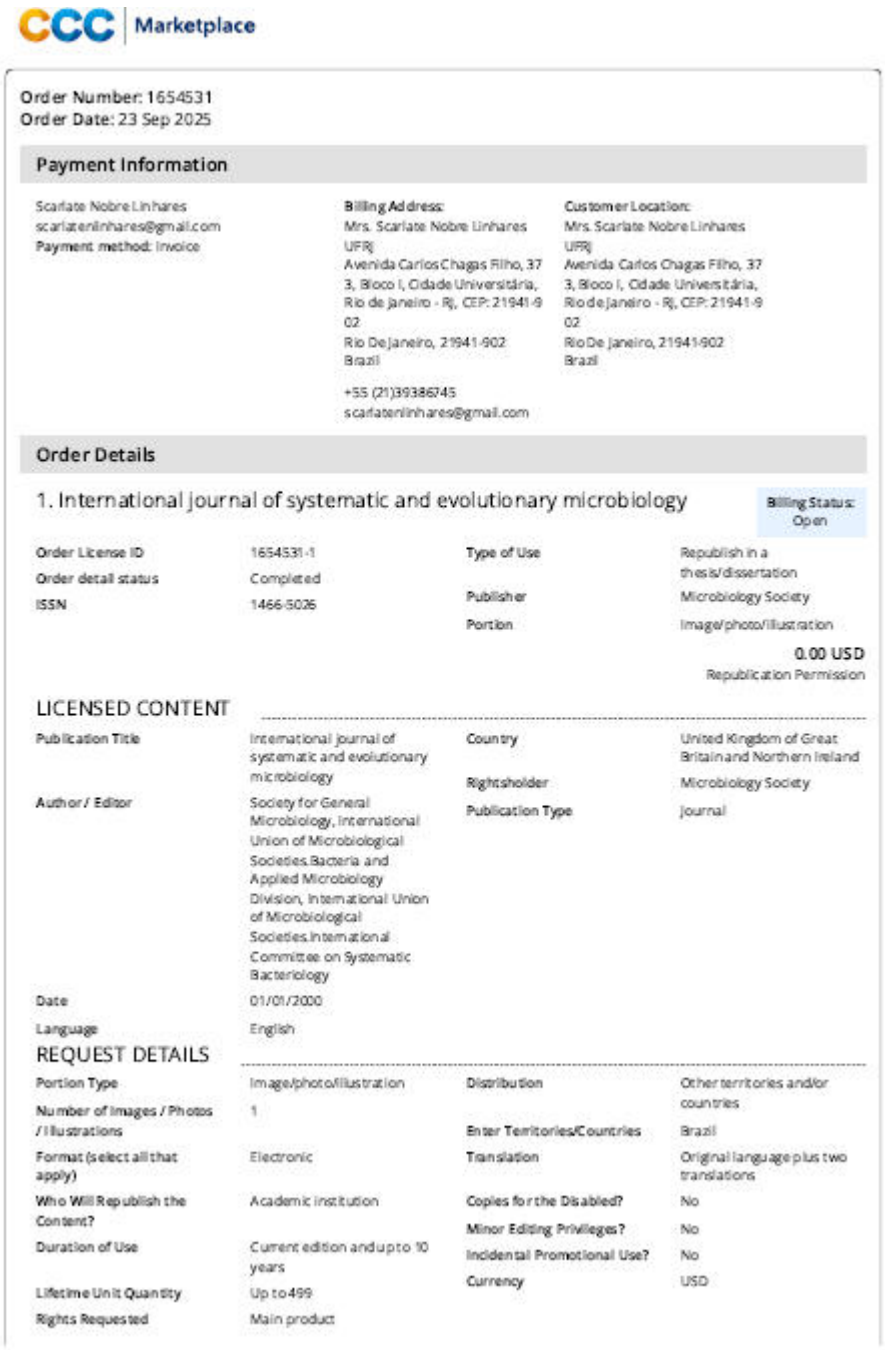
Zupan, J., & Raspor, P. (2008). Quantitative agar-invasion assay. *Journal of microbiological methods*, *73*(2), 100-104.

## 8. ANEXOS

Anexo 1 - Figura 1 - Congêneres químicos de moléculas de alfa e beta ácidos. Adaptado de Leker e Maye, 2023.



Anexo 2 - Figura 2 **-** *Saccharomyces cariocanus* UFRJ 50816$^{T}$. (A) Células de levedura em brotamento após 24 horas em meio YNBG (glicose 25 mM) a 25 ºC. (B) Ascos persistentes com ascósporos após 2 semanas em caldo YM a 20 ºC. Barras = 5 µm. Fonte: Naumov et al. 2000a.



CCC Marketplace

Order Number: 1654531
Order Date: 23 Sep 2025

**Payment Information**

Scarlate Nobre Linhares
scarlatenlinhares@gmail.com
Payment method: Invoice

Billing Address:
Mrs. Scarlate Nobre Linhares
UFRJ
Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I, Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21941-902
Rio De Janeiro, 21941-902
Brazil

+55 (21)39386745
scarlatenlinhares@gmail.com

Customer Location:
Mrs. Scarlate Nobre Linhares
UFRJ
Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I, Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21941-902
Rio De Janeiro, 21941-902
Brazil

**Order Details**

1. International journal of systematic and evolutionary microbiology — Billing Status: Open

| | | | |
|---|---|---|---|
| Order License ID | 1654531-1 | Type of Use | Republish in a thesis/dissertation |
| Order detail status | Completed | Publisher | Microbiology Society |
| ISSN | 1466-5026 | Portion | Image/photo/illustration |
| | | | 0.00 USD |
| | | | Republication Permission |

LICENSED CONTENT

| | | | |
|---|---|---|---|
| Publication Title | International journal of systematic and evolutionary microbiology | Country | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland |
| Author / Editor | Society for General Microbiology, International Union of Microbiological Societies.Bacteria and Applied Microbiology Division, International Union of Microbiological Societies.International Committee on Systematic Bacteriology | Rightsholder | Microbiology Society |
| | | Publication Type | Journal |
| Date | 01/01/2000 | | |
| Language | English | | |

REQUEST DETAILS

| | | | |
|---|---|---|---|
| Portion Type | Image/photo/illustration | Distribution | Other territories and/or countries |
| Number of Images / Photos / Illustrations | 1 | Enter Territories/Countries | Brazil |
| Format (select all that apply) | Electronic | Translation | Original language plus two translations |
| Who Will Republish the Content? | Academic institution | Copies for the Disabled? | No |
| | | Minor Editing Privileges? | No |
| Duration of Use | Current edition and up to 10 years | Incidental Promotional Use? | No |
| | | Currency | USD |
| Lifetime Unit Quantity | Up to 499 | | |
| Rights Requested | Main product | | |

## NEW WORK DETAILS

| | | | |
|---|---|---|---|
| Title | Caracterização da levedura Saccharomyces cariocanus G01 como um novo fermento cervejeiro | Institution Name | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| | | Expected Presentation Date | 2025-10-15 |
| Instructor Name | Marco Antônio Lemos Miguel | | |

## ADDITIONAL DETAILS

| | |
|---|---|
| The Requesting Person / Organization to Appear on the License | Scarlate Nobre Linhares |

## REQUESTED CONTENT DETAILS

| | | | |
|---|---|---|---|
| Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s) | Fig. 4. Saccharomyces cariocanus UFRJ 50816T. (a) Budding yeast cells, 1 d, YNBG medium (25 mM glucose), 25 °C; (b) asci with ascospores, 2 weeks, YM broth (unshaken), 20 °C. Bars, 10 lm. | Title of the Article / Chapter the Portion Is From | Latin diagnosis of Saccharomyces cariocanus sp. nov. |
| | | Author of Portion(s) | Society for General Microbiology; International Union of Microbiological Societies. Bacteria and Applied Microbiology Division; International Union of Microbiological Societies. International Committee on Systematic Bacteriology |
| Editor of Portion(s) | N/A | | |
| Volume / Edition | N/A | | |
| Page or Page Range of Portion | 1939 | | |
| | | Publication Date of Portion | 2000-01-01 |

### Microbiology Society Special Terms and Conditions

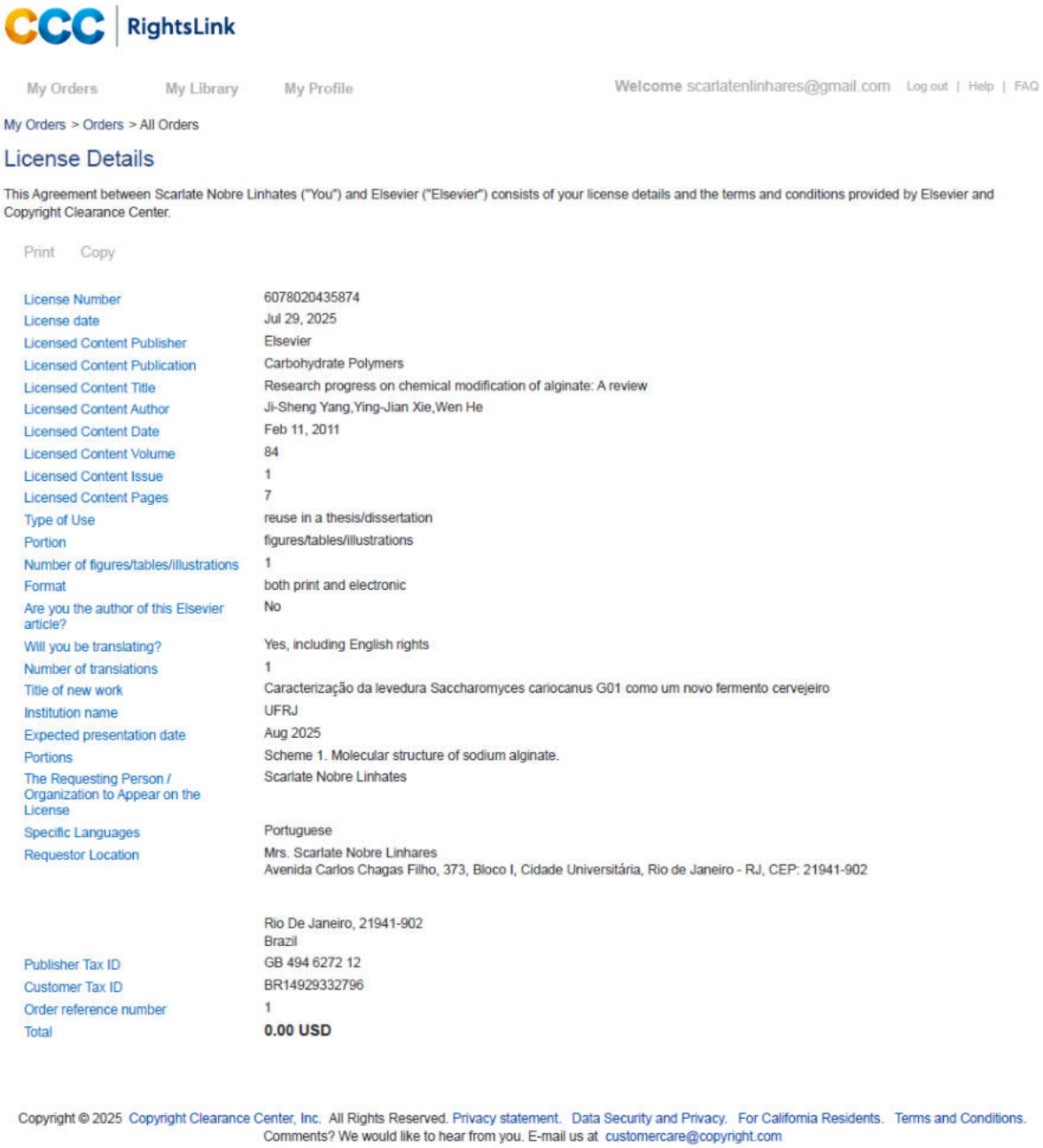
Microbiology Society does not charge students to use work in a thesis. We do ask that you please cite the original article alongside the republished item. Good luck!

**Total Items: 1**

Subtotal: 0.00 USD

**Order Total: 0.00 USD**

Anexo 3 - Figura 3 - Estrutura do alginato de sódio. Fonte: Yang, Xie e He (2011). Reprodução autorizada por *Copyright Clearance Center*®



CCC | RightsLink

My Orders  My Library  My Profile  Welcome scarlatenlinhares@gmail.com  Log out | Help | FAQ

My Orders > Orders > All Orders

## License Details

This Agreement between Scarlate Nobre Linhates ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Print  Copy

| | |
|---|---|
| License Number | 6078020435874 |
| License date | Jul 29, 2025 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Carbohydrate Polymers |
| Licensed Content Title | Research progress on chemical modification of alginate: A review |
| Licensed Content Author | Ji-Sheng Yang,Ying-Jian Xie,Wen He |
| Licensed Content Date | Feb 11, 2011 |
| Licensed Content Volume | 84 |
| Licensed Content Issue | 1 |
| Licensed Content Pages | 7 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, including English rights |
| Number of translations | 1 |
| Title of new work | Caracterização da levedura Saccharomyces cariocanus G01 como um novo fermento cervejeiro |
| Institution name | UFRJ |
| Expected presentation date | Aug 2025 |
| Portions | Scheme 1. Molecular structure of sodium alginate. |
| The Requesting Person / Organization to Appear on the License | Scarlate Nobre Linhates |
| Specific Languages | Portuguese |
| Requestor Location | Mrs. Scarlate Nobre Linhares<br>Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I, Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21941-902<br><br>Rio De Janeiro, 21941-902<br>Brazil |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Customer Tax ID | BR14929332796 |
| Order reference number | 1 |
| Total | **0.00 USD** |

Copyright © 2025 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. Privacy statement. Data Security and Privacy. For California Residents. Terms and Conditions.
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Anexo 4 – Tabela A1 - Genes identificados no genoma de *S. cariocanus* G01 com relevância tecnológica e fisiológica e potencial envolvimento em mecanismos de virulência

| Gene | Contig | Início | Parada | Fita | Produto |
|---|---|---|---|---|---|
| *ERG3* | NODE_002_G01 | 110497 | 111594 | - | Esterol-C-5-desaturase |
| *ERG5* | NODE_073_G01 | 49650 | 51266 | + | Desaturase C-22 esterase |
| *ERG6* | NODE_076_G01 | 6239 | 7390 | + | Delta(24)-esterol C-metiltransferase |
| *FLO11* | NODE_097_G01 | 151 | 751 | - | Glicoproteína de superfície celular ancorada em GPI |
| *FLO5* | NODE_086_G01 | 12588 | 15263 | - | Proteína de floculação *FLO5* |
| *FLO9* | NODE_014_G01 | 19 | 907 | - | Floculina *FLO9* |
| *FTR1* | NODE_148_G01 | 7478 | 8692 | + | Permease de ferro de alta afinidade |
| *HOG1* | NODE_192_G01 | 1469 | 2776 | - | Proteína *HOG1* MAPK |
| *KRE1* | NODE_050_G01 | 62407 | 63357 | + | Proteína resistente a toxinas *killer* |
| *KRE5* | NODE_001_G01 | 217651 | 221748 | + | Proteína resistente a toxinas *killer* |
| *PKC1* | NODE_146_G01 | 11546 | 15001 | + | Serina/treonina quinase |
| *POX1* | NODE_108_G01 | 2163 | 4412 | - | Coenzima A oxidase de acil graxo |
| *TPS1* | NODE_007_G01 | 9909 | 11396 | - | Subunidade sintase do complexo trealose-6-P sintase/fosfatase |
| *TPS2* | NODE_045_G01 | 23257 | 25947 | - | Trealose-6-fosfato fosfatase |
| *UPC2_2* | NODE_211_G01 | 879 | 3311 | - | Fator de transcrição |
| *VMA10* | NODE_042_G01 | 48181 | 48690 | + | Subunidade G da ATPase do setor V1 transportador de H(+) |
| *VMA13* | NODE_029_G01 | 55393 | 56829 | - | Subunidade H da ATPase do setor V1 de transporte de H(+) |
| *VMA5* | NODE_017_G01 | 16311 | 17489 | - | Subunidade C da ATP sintase vacuolar |
| *VMA6* | NODE_061_G01 | 45117 | 46154 | - | Subunidade d da ATPase do setor V0 de transporte de H(+) |
| *VMA8* | NODE_091_G01 | 2793 | 3566 | - | Subunidade D da ATPase do setor V1 de transporte de H(+) |

Anexo 5 - Termo de cessão de direitos autorais (*press release*)

**UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro**
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
**Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)**

## TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS (*press release*)

Pelo presente instrumento jurídico particular, Scarlate Nobre Linhares, portador(a) da Cédula de Identidade nº 210485462, CPF nº 14929332796, na condição legal de autor(a)/detentor(a) dos direitos autorais sobre o resumo de divulgação científica (*press release*) relacionado à dissertação/tese intitulada: "CARACTERIZAÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cariocanus* G01 COMO UM NOVO FERMENTO CERVEJEIRO", decide pelo presente Termo de Cessão de Direitos Autorais, em ceder total e gratuitamente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sediado na Av. Carlos chagas Filho 373, CCS – bloco I, CEP 21941-902, CNPJ nº 33.663.683/0001-16, os direitos patrimoniais e de autor referentes à obra criação supramencionada, em caráter permanente, irrevogável e **NÃO EXCLUSIVO**, todos os direitos patrimoniais **NÃO COMERCIAIS** de utilização da obra artística e/ou científica, inclusive os direitos de voz, imagem e conexos vinculados à OBRA, em qualquer idioma e em todos os países, de acordo com os Termos e Condições desta Cessão, restando claro que são devidos os respectivos créditos autorais em todas as utilizações da obra. A divulgação será realizada em diferentes plataformas (website, facebook, instagram) associadas ao IMPG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia) do IMPG-UFRJ.

Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2025.

Scarlate Nobre Linhares

Scarlate Nobre Linhares

Anexo 6 – Declaração de conhecimento de direitos autorais

PPG MICRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)

**DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DE DIREITOS AUTORAIS**

Eu, Scarlate Nobre Linhares, declaro que não reproduzi em minha dissertação imagens, ilustrações, figuras, fotos, tabelas, gráficos, quadros e PDFs, sem prévia autorização dos órgãos/pessoas que são de direito. Nesse sentido, encontram-se anexados no final de minha dissertação todas as documentações de permissão de reprodução de imagens, cedidas pelos autores, journals e/ou editoras científicas.

Scarlate Nobre Linhares

*Scarlate Nobre Linhares*

*Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Secretaria de Pós-Graduação*
*Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ, Brazil. CEP: 21941-902*
*Tel: 5521-39386737 Fax: 5521-25608344*
*www.microbiologia.ufrj.br/pos-graduacao E-mail:posgrad@micro.ufrj.br*