



Leveduras não-*Saccharomyces* com potencial cervejeiro isoladas de frutos do Cerrado

Non-Saccharomyces yeasts with brewing potential isolated from Cerrado fruits

Henrique Maia Valério¹

Lauany Matos de Novais Capuchinho²

Bianca de Sousa Lima³

Mariana Santana Versiani⁴

Magno Augusto Zazá Borges⁵

Janete Maria da Silva Alves⁶

RESUMO

Objetivo: Isolar leveduras selvagens de frutos do Cerrado das plantas Panã, Araçá e Mangaba para produção de cerveja, comparando com a comercial S-33. **Método:** Leveduras isoladas em meio BDA e transferidas para meio YPD, submetidas a teste de estresse em 5, 7.5, 10, 12 e 15% de etanol. Realizou-se espectrofotometria e plaqueamento para verificação de biomassa celular e quantidade de colônias. Posteriormente, submetidas a fermentação em meio contendo glicose a 2, 4, 8 e 12° Brix. As amostras foram replicadas em meio Sabouraud para inocular no mosto cervejeiro. Com $1,0 \times 10^8$ cél. mL⁻¹, foram transferidas para o mosto a 12° Brix e a fermentação por 22 dias a 18° C. Mediu-se pH, densidade, acidez volátil, ésteres e turbidez, além é claro da análise sensorial. **Resultados:** Houve redução de Brix até o final da fermentação; etanol variando entre 1,91 e 3,9%, destaque para as leveduras comercial e selvagem *Pichia kudriavzevii*; pH 4,6, no estilo Ale. Acidez volátil, ésteres e turbidez fora do estilo Kölsch, mas com aroma frutado, característico nessas cervejas. **Considerações finais:** Os métodos de isolamento de leveduras dos frutos foram

¹ Docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso dos Recursos Naturais/PPGBURN da Universidade Estadual de Montes Claros. Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental (LEMMA). Montes Claros - MG - Brasil. henrique.valerio@unimontes.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9279-8344>

² Professora no Colégio Presbiteriano de Taiobeiras: Taiobeiras, Minas Gerais - BR. lauanymatos.novais@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9154-4614>

³ Acadêmica de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). Departamento de Biologia Geral. Montes Claros - MG - Brasil. bsousalima4@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3630-8317>

⁴ Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso dos Recursos Naturais/PPGBURN da Universidade Estadual de Montes Claros. Departamento de Biologia Geral. Montes Claros MG - Brasil. marianaversiani97@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4913-1824>

⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso dos Recursos Naturais/PPGBURN da Universidade Estadual de Montes Claros. Laboratório de Ecologia e Controle Biológico de Insetos (LECB). diptera@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5126-1794>

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/PPGB da Universidade Estadual de Montes Claros. Laboratório de Bioprocessos. janete.alves@unimontes.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8220-4629>

Recebido em

30-06-2024

Aceito em

12-08-2024

Publicado em

16-09-2024

efetivos, com espécies e os resultados das cervejas promissoras, com vistas ao aprimoramento em etapas subsequentes.

Palavras-Chave: Leveduras selvagens; não-*Saccharomyces*, *Pichia kudriavzevii*, Panã, Mangaba, Araçá, Cerveja Artesanal.

ABSTRACT

Objective: To isolate wild yeasts from Cerrado fruits of the Panã, Araçá and Mangaba plants for beer production, comparing them with the commercial S-33. **Method:** Yeasts were isolated in PDA medium and transferred to YPD medium, subjected to a stress test at 5, 7.5, 10, 12 and 15% ethanol. Spectrophotometry and plating were performed to verify cell biomass and number of colonies. Subsequently, they were subjected to fermentation in a medium containing glucose at 2, 4, 8 and 12° Brix. The samples were replicated in Sabouraud medium to inoculate in the beer wort. With 1.0×10^8 cells. mL⁻¹, they were transferred to the wort at 12° Brix and fermented for 22 days at 18° C. pH, density, volatile acidity, esters and turbidity were measured, in addition to sensory analysis. **Results:** There was a reduction in Brix until the end of fermentation; ethanol ranging from 1.91 to 3.9%, with emphasis on commercial and wild yeasts *Pichia kudriavzevii*; pH 4.6, in the Ale style. Volatile acidity, esters and turbidity were not in the Kölsch style, but with a fruity aroma, characteristic of these beers. **Final considerations:** The methods for isolating yeasts from fruits were effective, with promising species and beer results, with a view to improvement in subsequent stages.

Keywords: Physicochemical analysis; Beer; Fermentation; Wild yeasts; non-*Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira no Brasil mostra um desempenho bastante significativo nos últimos anos, com um forte crescimento do número de novas cervejarias, passando de 157 em 2012, chegando em 2022 a 1729 produtores, conforme dados registrados no anuário da cerveja no Brasil do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA¹. Quanto à distribuição espacial do número de cervejarias no Brasil, Minas Gerais ocupa o terceiro lugar em número de cervejarias (222), só perdendo para São Paulo (387) e o Rio Grande do Sul (310).

Esse aumento no número de cervejarias é representado principalmente por cervejarias artesanais de pequeno e médio porte, o que demonstra que o Brasil também faz parte da

“revolução da cerveja artesanal” que vem acontecendo mundialmente principalmente desde o final da década de 90².

A maioria das cervejarias artesanais possuem raio de distribuição local e a preferência dos consumidores se dá pela qualidade e diversificação dos produtos, cuja demanda também é influenciada por questões subjetivas, criando uma subcultura cervejeira própria³.

Uma das formas de diferenciação do produto é o uso de ingredientes brasileiros na produção, o que confere o chamado “terroir” nacional à cerveja. Ervas nativas amargas como o pau tenente e a carqueja e foram testadas com sucesso como substitutos para o lúpulo^{4,5} e madeiras como amburana e cabreúva também apresentaram características sensoriais desejadas e distintas do carvalho, mais comumente usados para maturação de cervejas⁶. A busca de leveduras brasileiras para a produção de cerveja atende a necessidade de diferenciação das características sensoriais da cerveja, por isso já existem estudos de bioprospecção nas dornas de fermentação de cachaça, uma vez que essa se processa em um ambiente de fermentação espontânea, com uma sucessão de microrganismos, mas com a predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*^{7,8}.

. As leveduras tipo Lager, que dominam o mercado mundial de cerveja, se originam da hibridização de uma levedura selvagem encontrada na filosfera, no caso a casca de árvores na Patagônia, com leveduras tipo Ale europeias¹⁰. A Bélgica é conhecida por suas cervejas como frutas, as *Fruit Lambics*, algumas sendo feitas com a co-fermentação com microrganismos oriundos das frutas frescas como a *Oude Kriek* beer, feita com a adição de cerejas ácidas (*Prunus cerasus*)¹¹. Em estilos modernos, temos o exemplo da Italian Grape Ale (IGA), reconhecida como estilo pelo BJCP (Beer Judge Certification Program) em 2015, que possui o diferencial de adicionar uvas ou mosto de vinho e podendo passar por fermentação espontânea usando leveduras nativas das uvas¹².

Dados revisados do livro “Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas” organizado por Manoel Pio Corrêa (1874-1934), registram 504 espécies de frutas comestíveis e com características sensoriais que estimulariam o seu consumo, sendo que destas, somente 25% possuem estudos sobre a sua bioatividade¹³. A filosfera, como se denomina o conjunto das partes aéreas das plantas, são um habitat chave para os microrganismos, por oferecer uma área relativamente espaçosa e prover um fornecimento contínuo de nutrientes⁹. O interesse pela bioprospecção de leveduras na filosfera de frutas

brasileiras cresceu nas últimas duas décadas, com foco principalmente em suas propriedades enzimáticas¹⁴. Na indústria cervejeira brasileira, a maioria dos trabalhos com frutas se concentra no seu uso como adjunto, especialmente no estilo brasileiro Catharina Sour¹⁵⁻¹⁷.

Embora o estado de Minas Gerais seja o terceiro em número de cervejarias artesanais no Brasil, a região norte do estado possui somente duas cervejarias registradas até outubro de 2023, de acordo com o mapa das cervejarias de Minas Gerais, o que demonstra o potencial de expansão para este mercado na região¹⁸.

Diante do exposto, o trabalho objetivou: i) isolar a partir de frutos do cerrado leveduras não-*Saccharomyces*, dos frutos do cerrado selecionados: Mangaba, Araçá e Panã; ii) selecionar aquelas com tolerância ao estresse etanólico; iii) avaliar a capacidade de atenuação em açúcares do tipo glicose e maltose; iv) testar em condições de fermentação em malte puro qual (is) a (s) que tem (têm) potencial para a produção de cerveja, analisando diversos parâmetros físico-químicos e sensoriais padrão para a qualidade de uma cerveja comparada à uma levedura comercial no estilo Ale utilizada como controle na produção de uma cerveja de referência.

MÉTODOS

Área de estudo e obtenção das amostras

A coleta foi realizada na região de Jequitaiá/MG, situada nas coordenadas 17° 14' 08" S e 44° 26' 44" W, localizada na mesorregião do Norte de Minas Gerais e microrregião de Pirapora¹⁹, onde está inserida na ecorregião de Paracatu do Cerrado²⁰.

As três frutas estudadas foram escolhidas por estarem em época de frutificação e por sua abundância na área de estudo em dezembro de 2015. Coletou-se 45 frutos, 15 de cada espécie de planta – Araçá (*Psidium* sp.), Panã (*Annona crassiflora*) e Mangaba (*Hancornia speciosa*) - em 3 árvores distintas, a fim de se comparar a diversidade bioquímica e fenotípica de leveduras isoladas de cada amostra de planta.

Os frutos selecionados foram aqueles que apresentaram maior grau de maturação e que, visualmente e ao toque, apresentaram uma derme delgada e polpa com alta suculência, que não havia sintoma biótico ou abiótico de doença. Os frutos foram embalados em sacos estéreis e levados em recipientes térmicos ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos e

Microbiologia Ambiental/LEMMA da UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros.

A etapa de produção da Cerveja foi realizada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, IFNMG, Campus Salinas, nos laboratórios de Microbiologia, Alimentos e Análises Físico-Químicas de cachaça.

Isolamento e identificação das leveduras

Meio mínimo de Pontecorvo e YEPD

Nesta etapa, foram utilizados para o isolamento de leveduras os meios de cultura modificados, o Meio Mínimo de *Pontecorvo*²¹, com adição de maltose ao invés de glicose com o intuito de selecionar apenas leveduras *Saccharomyces* que é específica para este meio de cultura e utilizou-se também o meio YEPD, a fim de se verificar outras espécies presentes.

Antes da inoculação, esterilizou-se os meios em autoclave a 121°C e 1 Kgf cm⁻², por 15 minutos, adicionou-se 1 ml de ampicilina (5mg/ml) em 300 mL deste (com intuito de evitar crescimento bacteriano), foram vertidos posteriormente em placas de Petri dentro de uma capela de fluxo laminar e aguardou-se a secagem da superfície do meio em luz UV, evitando o crescimento de propágulos de fungos contaminantes após a inoculação.

Os frutos foram submetidos a dois tipos de procedimentos. O primeiro foi o esfregaço da carposfera de cada fruto com o auxílio de um *swab* e posterior estriamento deste nas placas de Petri e em triplicata, contendo os meios de cultura YEPD. O segundo foi o corte transversal de 1 grama da casca do fruto, onde colocou-se em 40 ml de solução salina estéril (0,9%) e com o auxílio do vórtex homogeneizou-se o inóculo por 1 minuto. As amostras foram diluídas (até 10⁻³) com solução salina estéril e, então, 100 µL desta diluição foram transferidos para placas de Petri com Meio Mínimo de Potencorvo adaptado para selecionar *Saccharomyces* sp. e o YEPD outras espécies de leveduras viáveis, espalhando o inóculo com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, aguardou-se 48 horas em BOD a 28°C. Obtidas as colônias jovens primárias e isoladas, somente as que apresentaram características leveduriformes foram subcultivadas, com o auxílio da uma alça de platina retirou-se partes dessas colônias isoladas para o centro de cada placa de Petri contendo meio YEPD. As placas foram mantidas em BOD a 28°C por 48 dias, na ausência de iluminação artificial.

Resistência aos fatores estressantes

Para todas as amostras seguiu-se este procedimento, dando continuidade aos passos sugeridos nos itens subsequentes: 4.3.1; 4.3.2; e 4.3.3 e cada concentração em cada item foi realizada em triplicatas.

Retirou-se uma alçada de inóculo das colônias de cada uma das placas e cada levedura foi transferida para tubos de polipropileno contendo 9 ml de solução salina estéril (0,9%). Esta suspensão foi homogeneizada e contada na câmara de Neubauer para determinação do número de células/ml. As suspensões celulares foram ajustadas para uma densidade celular de 1×10^8 UFC/ml através das seguintes fórmulas, respectivamente.

$$N^{\circ} \text{ cel} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = X$$

$$C_1 V_1 = 1 \times 10^8 V_f$$

Em que: V_f - fator de diluição
 C_1 - concentração inicial de amostra
 V_1 - volume inicial da amostra
 X - total de células por mL

Resistência alcoólica

Após as suspensões serem ajustadas para 1×10^8 células/ml, realizou-se o teste de resistência ao etanol em 5 concentrações: 5%, 7,5%, 10%, 12% e 15%. Utilizou-se o meio de cultura YPD em caldo (20 g de peptona, 10 g de Yeast Extract, 20 g de dextrose em 1.000 ml de água destilada), autoclavado. Após a autoclavagem, todo material foi levado para a capela de fluxo laminar. Cuidadosamente foram depositados na superfície do caldo YPD, 1 ml do inóculo ajustado adicionando, logo em seguida, o etanol de acordo com os teores alcoólicos supracitados, respectivamente. Realizou-se o procedimento em duplicata mais os controles. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

Avaliação de colônias viáveis e Contagem de Unidade Formadora de Colônia – UFC

Após as 48 horas de cultivo, avaliou-se o crescimento observando se o meio turvou ou não, em cada tubo, inclusive o controle. Aliquotou-se 100 μ L de cada uma das amostras e inoculou-se sobre placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar) com ampicilina

(5 mg/ml), com auxílio de uma alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo por toda a superfície da placa e incubou-se em BOD a 28° C por 48 horas. Avaliou-se o número de UFCs.

Avaliação de espectrofotometria

Realizou-se espectrofotometria de todas as amostras no comprimento de onda de 600nm em meio líquido YPD como leitura do branco, comparando-se com as leituras das demais suspensões celulares inoculadas em YPD para se medir absorbância em Densidade Óptica ($D.O_{600nm}$) nos diferentes intervalos de tempo de incubação por temperatura.

Avaliação do metabolismo de glicose e maltose

As leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo BDA, posteriormente foram inoculadas em tubos Eppendorf contendo 1,350 ml de: YPD com 12,4 ° Brix, meio mínimo com glicose 12,4 ° Brix e um meio com solução de glicose pura 12,4 ° Brix, separadamente, acrescentando 0,150 ml de inóculo, foram incubadas a 29°C por 5 dias sob agitação a 180 rpm (incubadora *shaker* Novatécnica modelo: NT 715), para a maltose apenas substituiu-se a glicose. Após esse período, realizou-se a medição de glicose através de um refratômetro óptico com escala Brix (Athyao B093DXHSXK) para calcular o quanto de glicose foi convertido em álcool.

Ao observar que as leveduras não estavam convertendo, optou-se pela adaptação destas em concentrações diferentes de glicose, 2%, 4%, 8% e 12%, entre 48 horas e medindo o °Brix a cada 24 horas. Após essa adaptação, passou-se para o processo de produção da cerveja utilizando-se aqueles isolados mais promissores.

Produção de cerveja

Preparação do inóculo

Para obtenção das amostras de leveduras, foi realizado o repique em placas de Petri contendo meio BDA, incubou-se em estufa a 30° C por 48 horas. Preparou-se uma solução com Sabouraud líquido, acrescentando-se glicose, o meio líquido foi distribuído em Erlenmeyers e adicionou-se a levedura. Incubou-se a 30°C por 7 dias, a fim de se obter biomassa suficiente para inocular na cerveja. Todas as amostras (ensaios) foram realizadas em réplicas (duplicata).

Preparo da cerveja

O mosto cervejeiro utilizado foi feito com base de uma receita de Kolsch, que é um estilo de cerveja bem neutro, que utiliza somente malte Pilsen para sua produção. A cerveja foi produzida segundo a receita do livro "How to Brew" de John Palmer, onde foi utilizado lúpulo tipo Hallertau Magnum, malte Pilsen e água mineral²². Para a produção desse estilo de cerveja, foram utilizadas as leveduras experimentais designadas Pk I, Pk II, Pk III, Pk IV, Pk V, Pk VI, Pk VII e Pk VIII (todos os oito isolados pertencentes à espécie *Pichia kudriavzevii*) e, como controle, um fermento cervejeiro comercial Ale S-33 da Fermentis.

Análises físico-químicas

Com vista à caracterização físico-química das bebidas fermentadas e à avaliação da estabilidade físico-química destas bebidas durante um período de armazenamento, procedeu-se à determinação de vários parâmetros tais como: acidez total, pH, turbidez, grau Brix e etanol, segundo a metodologia adotada pelo curso de cachaça do IFNMG - Campus Salinas, adaptada de MAPA (2005)²³ para produção de bebidas alcoólicas fermentadas.

Acidez total

A acidez total é uma medida da quantidade de ácido da bebida que reage com uma base de concentração conhecida (NaOH). Os ácidos influenciam diretamente nas características organolépticas das bebidas, como: o sabor, odor, cor e, também, na estabilidade e manutenção de qualidade.

Para tanto, essa análise foi feita através do Método Titulométrico, seu princípio baseia-se na titulação dos ácidos voláteis, separados da amostra através de arraste do vapor d'água (*Oenochemical Distilling unit mod. DEE*) e retificação dos vapores (a acidez do dióxido de enxofre livre e combinado no destilado conjuntamente não está compreendida na acidez volátil e deve ser separada da acidez do destilado, assim como a acidez do ácido sórbico, caso presente na amostra). Na titulação do destilado utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio 0,1M²³.

Titularam-se 20 mL de amostra da bebida aos quais se havia adicionado previamente 2 ou 3 gotas de solução fenolftaleína 1% (p/v) utilizando como solução titulante uma solução

padrão de 0,1M de NaOH. Determinou-se o volume de titulante necessário à viragem do indicador para rosa claro e efetuaram-se os cálculos de acordo com a expressão:

$$AV(g/L) = \frac{60}{a} \times v \times M_{NaOH} \quad AV(g/L) = \frac{60}{a} \times v \times M_{NaOH}$$

Em que: AV - acidez volátil g/L (ácido acético)
a - alíquota de amostra
v - volume de titulante gasto
M - molaridade do titulante

Ésteres

A concentração de ésteres é expressa em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro e foi medida pela seguinte fórmula:

$$E_{aa} = \frac{n \times N \times 8,8 \times 100}{V \times GR} \times 1000 \quad E_{aa} = \frac{n \times N \times 8,8 \times 100}{V \times GR} \times 1000$$

Em que: E_{aa} = Concentração de ésteres em mg/100 ml de álcool anidro.
GR = Grau alcoólico real.
n = Volume em mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação.
N = Normalidade da solução de hidróxido de sódio.
V = Volume em mL da amostra titulada.

Pipetou-se 100 mL do destilado da amostra (usado para determinação do grau alcoólico real) para um Erlenmeyer de 500 mL, em seguida neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio, usando como indicador a fenolftaleína. Adicionou-se exatamente 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e deixou-se em repouso em frasco de vedação por 24 horas. No caso da cor rosa desaparecer, adicionou-se mais 10 mL da solução de hidróxido de sódio e deixou-se em repouso por mais meia hora. Adicionou-se solução de ácido sulfúrico 0,1 N (10 ou 20 mL conforme se tenha adicionado 10 ou 20 mL de solução de hidróxido de sódio). Titulou-se o excesso de ácido sulfúrico com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até coloração rósea²³.

Densidade, Grau Brix e Teor alcoólico

O densímetro é utilizado para medir a densidade de um determinado líquido, o mesmo é composto por vidro e com chumbo em sua base, o densímetro possui uma escala em sua parte superior usada para indicar a densidade do líquido.

A fim de obter os valores em grau °Brix utilizou-se a calculadora cervejeira online. O Brix fornece uma medida da quantidade de açúcares solúveis contidos numa amostra e através

deste o grau alcoólico potencial que a bebida poderá atingir, medido através do densímetro/alcoômetro (marca ALLA Brasil).

O teor alcoólico das amostras foi determinado pela medida de Brix no início e ao final da fermentação das cervejas e posterior utilização do cálculo abaixo, com a atenuação dos açúcares expresso em percentagem (%). O cálculo do álcool produzido foi feito pela fórmula:

$$ABV = (OG - FG) \times 131$$

Em que: ABV = álcool por volume
 OG = a gravidade inicial.
 FG = a gravidade final.

Determinação do pH

A medida do pH (Phmetro de bancada PHS-3E-BI Ion) é determinada pela atividade dos íons hidrogênio através do potenciômetro usando um eletrodo de vidro e um de referência ou um eletrodo de vidro combinado. Assim, obteve-se os valores de pH de cada amostra para verificar se estão dentro dos padrões regulares da cerveja deste estilo.

Turbidez

A determinação de turbidez foi realizada em Turbidímetro digital microprocessado de bancada (Ap2000 Policontrol), e o resultado expresso no próprio equipamento em unidades NTU (Adaptado)²⁴.

Análise estatística

Na análise estatística foram construídos modelos lineares generalizados no programa R utilizando distribuição de erros adequada para testar o efeito das variáveis explicativas sobre as variáveis respostas. Para o teste de etanol realizou-se o teste de Gaussian e da fermentação binominal com quasibinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos procedimentos de isolamento das leveduras isoladas do meio mínimo de *Pontecorvo* a partir das amostras dos 45 frutos de Araçá, Mangaba e Panã, obtiveram-se um total de 125 isolados de leveduras apresentando diversos morfotipos nas

seguintes proporções por espécie de planta amostrada: 58 leveduras isoladas de Araçá, 46 leveduras isoladas de Mangaba e por fim 21 leveduras isoladas de Panã. Alguns desses morfotipos co-ocorreram nos frutos das 3 espécies de plantas, outros em frutos de duas espécies e os mais raros, apenas em cada uma das 3 espécies amostradas, ou seja, foram exclusivos de determinada espécie (dados não mostrados). Destas, após os testes de *screening* para fermentação e de tolerância às diferentes concentrações de etanol testadas, 110 leveduras do total das isoladas a partir dos 45 frutos das três espécies passaram para os ensaios de fermentação e estresse etanólico.

Partindo-se desta coleção formada de leveduras isoladas dos frutos das três espécies de plantas do Cerrado que foram amostradas e testadas nos bioensaios prévios neste estudo, deu-se prosseguimento ao teste etanólico apenas utilizando as leveduras isoladas do meio mínimo de *Pontecorvo* (seletivo para maltose) como demonstrado na Figura 1.



Figura 1. Morfotipos encontrados no isolamento das leveduras a partir de amostras coletadas de todos os 3 diferentes frutos, cultivadas em meio mínimo de *Pontecorvo*.

Importante ressaltar que foram isoladas dos frutos das três espécies de plantas do Cerrado, o Araçá, a Mangaba e do Panã um número considerável de leveduras selvagens, que totalizaram 125 leveduras, com destaque para a abundância total de leveduras associadas aos frutos do Araçá, e no caso da Mangaba, embora não tenham superado em termos absolutos o número de leveduras isoladas tanto do Araçá quanto do Panã, que teve o menor número total de leveduras associadas, as leveduras da Mangaba foram as que apresentaram o perfil de maior resistência nos testes de estresse etanólico e térmico (dados não mostrados), bem como foram as únicas finalmente utilizadas na produção das cervejas experimentais analisadas neste estudo.

Aliado à esse perfil de maior resistência nos testes físico-químicos, e para reforçar as escolhas dessas leveduras identificadas posteriormente como pertencentes à espécie *Pichia kudriavezvii*, as leveduras do grupo da Mangaba foram as que apresentaram o melhor rendimento de biomassa total de células (em termos de UFC/mL) nos ensaios com glicose e com maltose, e que também apresentaram o melhor desempenho fermentativo nos testes de elevação da concentração dos dois açúcares testados em série, no sentido de formação de massa celular, bem como no processo de atenuação dos açúcares (redução do °Brix) e maior rendimento na produção de etanol, conforme a análise dos resultados demonstraram de maneira inequívoca.

Teste de tolerância das linhagens selvagens ao estresse etanólico

Foram utilizadas 110 linhagens para os testes de estresse etanólico (concentrações crescentes de etanol em meio líquido) e em condições de controle, a partir das quais foram avaliadas a capacidade de formação e crescimento de colônias em meio YPD (calculadas em UFC/mL).

Após o teste etanólico, coletou-se as leituras de densidade óptica em OD_{600nm} para que fossem comparados o crescimento microbiano em cada concentração de etanol testada. Para tanto, testou-se a capacidade de crescimento das linhagens em todas as concentrações supracitadas, avaliando-se o aumento ou a diminuição da biomassa celular em função do tempo de cultivo. Os dados das amostras foram expressos em análises das densidades médias de biomassa celular em função do tempo de fermentação transcorrido (Figuras 2A e 2B).

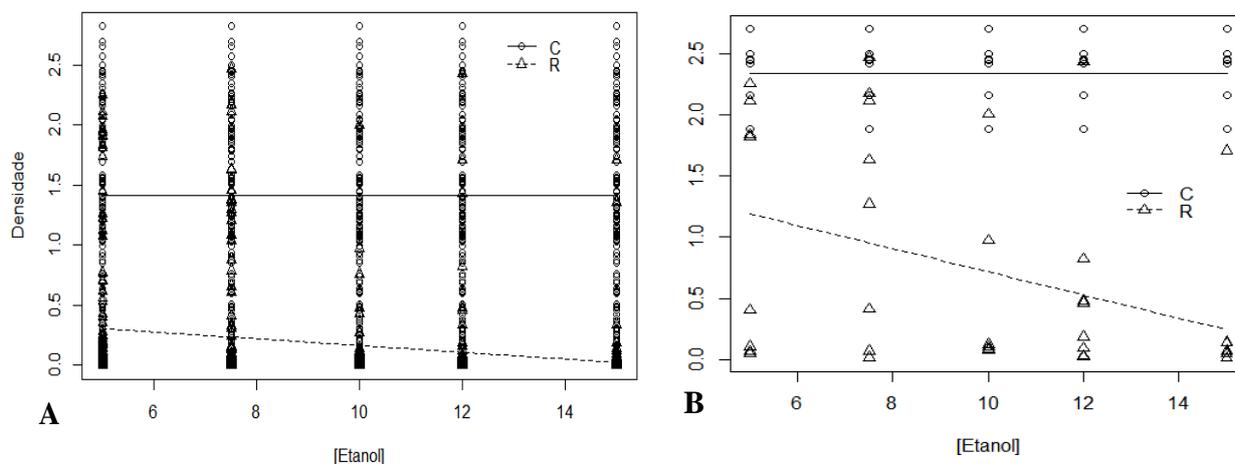


Figura 2. (A) Densidade celular das 110 amostras de leveduras testadas em relação à presença de etanol em concentrações crescentes (C, leveduras controle e R leveduras testadas de 6 a 15 °Brix), para caracterizar as respostas ao estresse etanólico. (B) Densidades celulares das leveduras controle (medidas em absorvância a 600 nm), em relação às densidades ópticas na presença de etanol em concentrações crescentes para as melhores linhagens de leveduras testadas (Pk I a Pk VIII) (C, controles e R leveduras testadas no gradiente crescente de etanol de 6 a 15%).

Os resultados variaram entre as amostras, onde as leveduras *P. kudriavzevii* (Pk) se sobressaíram quanto à resistência à presença de etanol, demonstrando desempenho satisfatório na formação de biomassa celular. Após essa avaliação, plaqueou-se cada amostra testada, controles e réplicas de cada uma dessas leveduras em destaque, em meio BDA, para cálculo da porcentagem de células viáveis representados como contagem de UFC/mL (Figura 3).

Os resultados demonstram que após as 48 horas na estufa a 29°C, com a inoculação dos controles de cada amostra de levedura feita em 1×10^8 cél/ml a 0% de etanol, que todas as amostras testadas apresentaram crescimento incontável (e.g.: células que ultrapassam 300 UFC/mL em cada placa) na maioria das inoculações. Observou-se ainda, que na presença de etanol, as células mostraram-se mais sensíveis que as células crescidas em condições controle (sem etanol), no mesmo período de tempo. No entanto, cabe ressaltar que em muitas amostras, principalmente nas concentrações de 5% e 7,5% de etanol, as UFC's cresceram tão significativamente que não puderam ser contadas nas menores diluições (10^{-1} e 10^{-2}), bem

como nas amostras a 10% de etanol, as quais cresceram em 20 dos 110 isolados e a 12% de etanol, em 10 dos 110 isolados testados. Por fim, nas leveduras expostas a 15% de etanol, sete (7) das 110 amostras cresceram como incontáveis também nas menores diluições. Posteriormente, averiguou-se que, em algumas linhagens, quando submetidas ao estresse etanólico, houve aumento de biomassa celular seguido de morte, no entanto, na maioria das leveduras, principalmente entre 5 a 10% de etanol no meio YPD, ainda apresentavam viabilidade celular após o estresse.

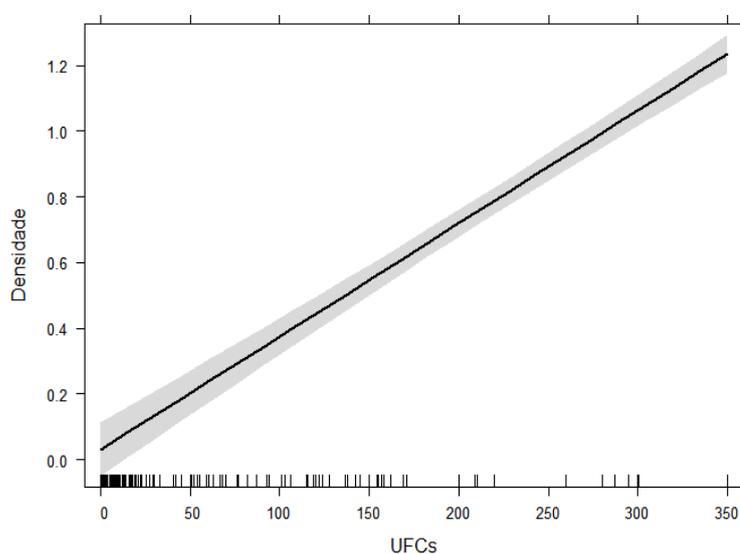


Figura 3. Médias da densidade celular (D.O. medida em absorvância a 600_{nm}) comparadas às médias de crescimento de colônias viáveis (UFC/mL) pós-teste de resistência ao etanol para as melhores leveduras testadas (Pk I a Pk VIII).

Segundo Oliveira et al. (2007)²⁵, a exposição das leveduras a níveis etanólicos altos, causa a desnaturação das proteínas que compõem a sua membrana causando assim uma redução da viabilidade celular ou diminuição do desempenho de fermentação. Isso explica o ocorrido, principalmente nas concentrações de 12 e 15%, ou até eventualmente um efeito de repressão catabólica sobre as leveduras na presença de altas concentrações de etanol. Ainda nesse sentido, Ramos et al. (2013)²⁶, relatam que condições estressantes interferem no metabolismo celular desses microrganismos os fazendo decrescer, afetando assim o sucesso na capacidade de fermentação.

Os dados apresentados evidenciam que algumas linhagens selvagens são capazes de resistir até 15% (v/v) de etanol no meio, embora não se aplique para todas as amostras avaliadas nessas mesmas condições, corroborando com os dados de Kim (2011)²⁷, onde se observou uma tolerância de até 15% de etanol nos cultivos de leveduras em condições similares às testadas neste experimento de estresse. De todos os testes e em todas as concentrações de etanol nesse estudo, houve 10 amostras que foram excluídas do trabalho, uma vez que não resistiram a qualquer um dos níveis de etanol testados.

Mangaba foi o fruto que apresentou a maior diversidade de leveduras e as que mais resistiram às concentrações de etanol em todos os níveis testados. A partir do Araçá variou muito pouco no crescimento de microrganismos isolados, uma vez que apresentavam sempre a mesma característica e coloração. Quanto ao crescimento celular em etanol, muitas vezes, a biomassa celular não era tão visível acima de 10%; nesse sentido, as amostras de leveduras isoladas do Panã foram as que menos apresentaram crescimento nas condições testadas. Isso se deve, provavelmente, a alta taxa de contaminantes (bolores e bactérias) a partir do isolamento primário nos frutos, e aos níveis de resistência ao estresse etanólico avaliados, considerados baixos. Esse teste de estresse permitiu a seleção de leveduras com resistência e maior viabilidade para a etapa de fermentação em maltose e glicose.

Teste de fermentação com maltose e glicose em Eppendorf

Nesta etapa, os 110 isolados foram submetidos à uma fermentação em maltose, no entanto, nenhuma das amostras apresentou crescimento expressivo, portanto, esse fato pode ter ocorrido porque, mesmo que essas leveduras tenham sido isoladas em meio Pontecorvo sólido, contendo apenas maltose como fonte de açúcares, elas o fizeram pela via oxidativa, e não por via fermentativa, como no teste de atenuação em meio líquido.

Submeteram-se então as amostras a uma fermentação em glicose a 12,1° Brix (Compatível com a concentração para produção de cerveja), porém, o crescimento era lento e ineficiente. As amostras passaram por um processo de adaptação às concentrações crescentes de glicose partindo de 2%, 4%, 8% e 12%. A capacidade fermentativa das melhores amostras testadas foi avaliada, dentre as quais, foram selecionadas apenas aquelas utilizadas para a produção da cerveja (Figura 4).

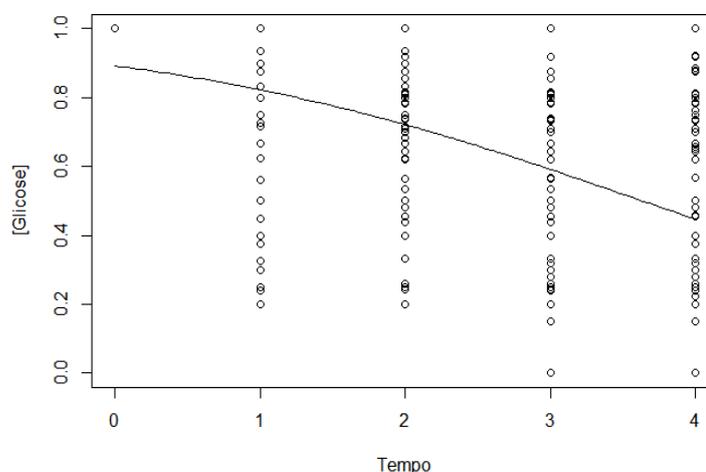


Figura 4. Capacidade de atenuação em diferentes concentrações de glicose partindo das melhores linhagens das leveduras no teste de resistência ao etanol, em termos de formação de biomassa celular (UFC/mL). **Legenda:** Eixo x, sobre o tempo de fermentação: 1 equivale a 24 horas após a inoculação, 2 – 48h, 3 – 72h, 4 – 96h sucessivamente.

Nesse processo, a formação de biomassa celular bem como a produção de etanol foi lenta, quando comparadas aos valores obtidos em fermentação convencional para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* testada, pois a concentração celular inicial foi baixa, sendo 1,350 ml do meio para 0,150 ml de inóculo, conforme a metodologia adotada para todas as leveduras testadas nas mesmas condições desses testes de tolerância. Esse ensaio foi realizado a fim de estimular uma fermentação em pequena escala e assim selecionar quais as leveduras que seriam utilizadas para participar do processo de produção de cerveja em uma escala maior e em reais condições de fermentação em malte puro.

A viabilidade celular manteve-se mediana durante todas as transferências de concentrações de glicose, observadas visualmente, e os valores de Brix oscilando na maioria das transferências entre 40 e 70% na medição final. No total foram 4 transferências. De todas as amostras, foram escolhidas 5 as quais apresentaram valores expressivos no que se refere a produção de biomassa celular (densidade), a amostra comercial (S 33) e quatro 4 amostras (em duplicatas) das leveduras que foram isoladas exclusivamente a partir da Mangaba, que

receberem então uma nova designação, baseada naturalmente pelo fato de todas as quatro (4) pertencerem igualmente à espécie *Pichia kudriavzevii*: Pk - I, Pk - II e Pk - III e Pk - IV, reduziram o açúcar a 0 nas concentrações de 2%, 4% e 8%, em 12% de glicose reduziram 60% e as amostras Pk - V e Pk - VI e Pk - VII e Pk - VIII ficaram em 70% de consumo de glicose nas concentrações de 2%, 4% e 8%, em 12% reduziram cerca de 30%.

Produção da cerveja e análises físico-químicas

Após a cerveja pronta e resfriada, transferiu-se para os galões de fermentação de cinco litros cada (5) e foram inoculadas as linhagens de leveduras selvagens (Pk I a Pk VIII) bem como a comercial S33. Esses galões permaneceram incubados a uma temperatura constante entre 18 e 19°C por 22 dias em Incubadoras BOD, neste período avaliou-se a densidade em graus Brix, conversão em etanol, pH, turbidez (NTU), ésteres e acidez a cada 24 horas de incubação.

Em relação à densidade e o Brix, foi observado que o decaimento foi considerado extremamente lento nos primeiros dias para todas as linhagens de leveduras selvagens testadas, exceção à S33, para a qual após 15 dias de fermentação o consumo decaiu mais rápido. No entanto, as selvagens não atingiram os valores de FG 1009 e 2,4° Brix que era esperado, baseado no comportamento da levedura comercial utilizada como referência (Figura 5).

A atenuação é o processo em que ocorre uma redução no extrato inicial do mosto cervejeiro uma vez que as leveduras metabolizam os açúcares e os transformam em álcool, no caso da fermentação etanólica, ou em gás carbônico, na maturação mais tardia (no processo de carbonatação). Percebe-se que nos resultados de FG (gravidade final) desta cerveja, os valores finais não foram atingidos e isso não caracteriza que o processo foi inconclusivo, mas sim que “cada linhagem de levedura selecionada está vinculada a uma característica e comportamento específico” (Figura 6). As condições em que o processo de mosturação são conduzidas e o controle dos parâmetros físico-químicos e a disponibilidade total inicial de açúcares no mosto pré-fermentação interferem na eficiência de atenuação executada pelas leveduras de forma geral²⁸.

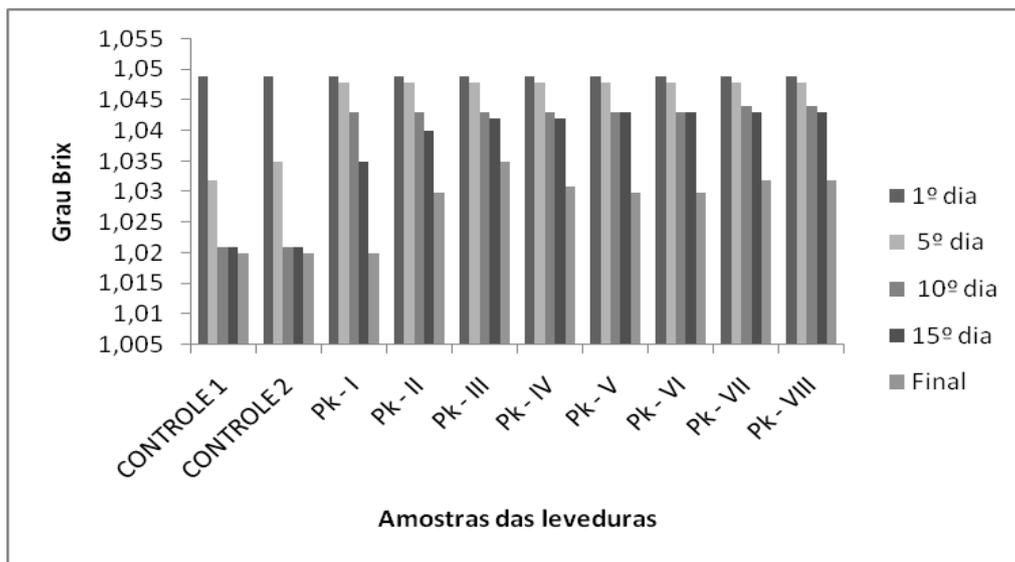


Figura 5. Redução de Brix ao longo do período de fermentação para as 4 linhagens de leveduras selvagens testadas em duplicata (Pk I e Pk II, Pk III e Pk IV, Pk V e Pk VI, Pk VII e Pk VIII) comparadas ao desempenho da levedura comercial S33 (controles 1 e 2).

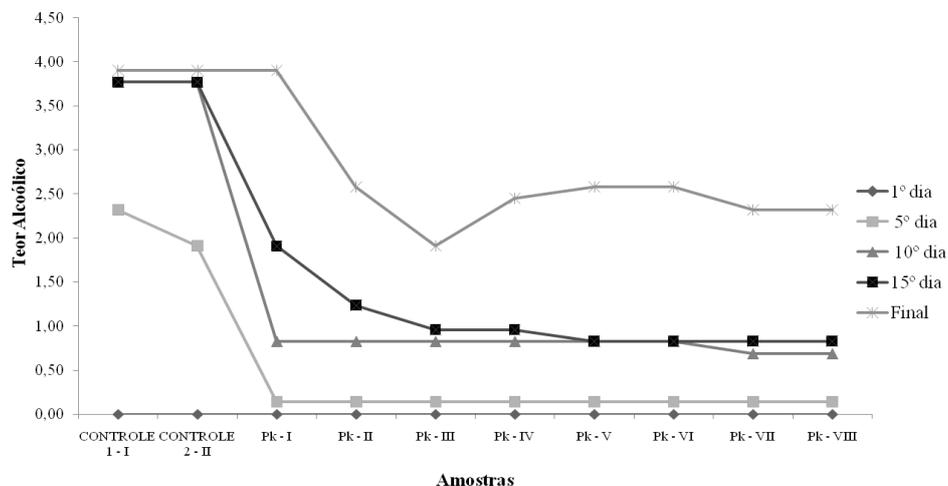


Figura 6. Atenuação das cervejas experimentais (Pk I a Pk VIII) em comparação à das comerciais (S33, controles 1 e 2) ao longo da fermentação (22 dias).

A etapa de fermentação em maltose e glicose, foi feita para selecionar as leveduras mais eficientes, esse processo permitiu a seleção de 2 leveduras que obtiveram 100% de consumo da glicose e outras com um consumo variando entre 50 e 70% de maltose; escolheu-

se no total 4 leveduras (duas réplicas de cada) com potencial para a fermentação em mosto cervejeiro com malte puro e para análises físico-químicas realizadas nas cervejas produzidas.

A fermentação completa foi realizada, como resultado obteve-se uma fermentação primária lenta com baixa diminuição de Brix; houve formação de espuma na superfície do mosto (fato que pode levar ao aumento da turbidez e sabor amargo acentuado, devido a partículas que porventura possam estar suspensas no mosto), e produção de etanol variando entre 1,91 a 3,9 de TA.

As cervejas produzidas com as leveduras isoladas das frutas variaram em teor alcoólico entre 1,91 a 3,9%, com a Pk - I apresentando o maior valor. O BJCP sugere para esse estilo valores de etanol entre 4,4 e 5,2%²⁹. O menor teor alcoólico nos mostos cervejeiros fermentados com as leveduras selvagens era esperado, uma vez que as leveduras comerciais foram selecionadas durante décadas ou até mesmo séculos para utilizar o mosto de cevada³⁰. Esta performance pode ser melhorada através de seleção, mas existe um grande interesse atualmente em cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool, e as leveduras não-*Saccharomyces* como as *Pichia* estão sendo testadas para este tipo de aplicação³¹.

Adicionalmente foram observados os valores de pH obtidos das cinco amostras analisadas e suas réplicas ao longo do tempo total de fermentação (Tabela 1).

Tabela 1. (A) Variação do pH das cervejas experimentais (Pk I a Pk VIII) em comparação ao das comerciais ao longo do tempo total da fermentação (22 dias);

Amostras (A)	pH			
	1º dia	5º dia	15º dia	Final
Controle 1 - I	5,69	4,16	4,24	4,48
Controle 2 - II	5,69	4,18	4,28	4,53
Pk - I	5,69	5,43	5,36	4,39
Pk - II	5,69	5,31	5,32	4,53
Pk - III	5,69	5,28	5,18	4,65
Pk - IV	5,69	5,24	5,17	4,79
Pk - V	5,69	5,29	5,27	4,81
Pk - VI	5,69	5,31	5,25	4,78
Pk - VII	5,69	5,31	5,28	4,45
Pk - VIII	5,69	5,24	5,21	4,39

A acidez volátil é usada rotineiramente no controle de qualidade de vinhos, como indicador de deterioração, porque estes ácidos voláteis são responsáveis pelo aroma de vinagre e o gosto acre na bebida, sendo o cheiro de vinagre reconhecível em concentrações de ácido acético de 800–900mg/L³². Comparando-se com os valores citados, a acidez volátil das cervejas com as leveduras *P. kudriavzevii* ficaram abaixo do limite reconhecível para odores vinagrados. Em contrapartida, os valores de pH variaram entre 4,4 a 4,8 dentro da maioria dos padrões do BJCP para cerveja, que variam aproximadamente de 3,0 a 6,0 para as Ale e de 4,00 a 5,00 para as Lagers. Em nosso experimento, a receita base foi do estilo Kölsch, que tem pH ideal entre 5,4 e 5,6, portanto obtivemos um pH menor do que o esperado para o estilo, inclusive nas cervejas controle, que utilizaram as leveduras convencionais. Diferenças de pH e conseqüentemente da acidez da cerveja, não precisam necessariamente ser consideradas um defeito, especialmente no âmbito da cerveja artesanal, que por definição pode variar de lote para lote.

Os valores de ésteres nas cervejas experimentais bem como nas cervejas comerciais com as linhagens testadas foram devidamente comparados e analisados (Tabela 2).

Tabela 2. (B) Valores das características físico-químicas (acidez volátil, ésteres e pH) das cervejas experimentais (Pk I a Pk VIII) em comparação às apresentadas pela cerveja comercial (S33, controles 1 e 2) nas mesmas condições de ensaio ao final da fermentação primária.

Amostras (B)	ÉSTER (mg/L)	ACIDEZ VOLÁTIL (mg/L)	pH
Controle 1 - I	52,1	516,0	4,5
Controle 2 - II	53,9	489,0	4,5
Pk - I	168,2	438,0	4,4
Pk - II	223,5	258,0	4,5
Pk - III	229,2	360,0	4,7
Pk - IV	279,6	282,0	4,8
Pk - V	253,4	330,0	4,8
Pk - VI	256,6	366,0	4,8
Pk - VII	381,7	360,0	4,5
Pk - VIII	481,3	435,0	4,4

Fermentações com *Pichia kluyveri* feitas em mosto cervejeiro já registraram 41 tipos de ésteres diferentes, alguns como acetato de etila (frutado), acetato de isoamila (banana) ou acetato de fenetila (floral, doce) foram encontrados em níveis muitas vezes maiores que o encontrado em fermentações com leveduras Lager no mesmo mosto³³. Em quantidades muito grandes, estes ésteres podem produzir um aroma semelhante a solventes, que é considerado um defeito na cerveja, um *off-flavor*, mas no presente trabalho só foram medidos os ésteres totais. Em testes futuros, com as leveduras isoladas, é importante medir os ésteres separadamente, para verificação da possível origem de off-flavors³⁴, e estabelecer condições de fermentação que visam atenuar a produção daqueles considerados indesejáveis para cerveja.

Em relação aos compostos voláteis mais importantes formados ao longo do processo de fermentação de qualquer cerveja baseada em maltes de cevada, os ésteres são os componentes que contribuem com notas frutais no perfil de sabor da cerveja³⁵. Como as cervejas Ales são fermentadas em temperaturas entre 18 a 22°C, estas possuem um nível mais perceptível desses ésteres, devido à uma fermentação em temperatura mais alta. Nas cervejas produzidas com as leveduras selvagens *Pichia kudriavzevii* observou-se que, inicialmente, as cervejas apresentaram um intenso aroma de ésteres, em um nível que pode ser considerado como *off-flavor* (aromas ou sabores não desejados), se comparadas ao observado para as cervejas com a levedura comercial S33. A intensidade do aroma diminuiu com o passar do tempo, ao finalizar a fermentação primária e no momento de envasamento nas garrafas foi perceptível as notas frutadas como manga e banana nas amostras (maioria delas), apenas nas cervejas Pk VII e Pk VIII e na comercial S33 o aroma estava bem menos frutado, reflexo da menor quantidade de ésteres produzido por esta levedura em relação às selvagens.

Quanto à cor e turbidez, que são parâmetros muito importantes para determinar a adequação de uma cerveja a um determinado estilo, podendo variar entre amarela palha a quase preta nas Stouts e Porters por exemplo. A turbidez foi medida utilizando a unidade de medida NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez) e posteriormente convertidas a SRM e EBC (para determinar a cor) que são medidas utilizadas na Europa e nos Estados Unidos, a fim de se encontrar o valor padrão. Leveduras comerciais são selecionadas para uma floculação eficiente após o término da fermentação, uma vez que na maioria dos estilos é desejada uma aparência translúcida, apesar que leveduras de estilos naturalmente turvos,

como as Wit Beers belgas ou as Weissbeer alemãs, não floccular menos eficientemente. Em leveduras selvagens, não se espera uma grande eficiência na flocculação. Problemas na moagem do malte também podem contribuir para a maior turbidez, maltes muito triturados produzem mais partículas em suspensão, aumentando o efeito da turbidez^{22,36}.

Das 125 leveduras isoladas a partir da carposfera dos frutos Mangaba, Araçá e Panã, 110 foram selecionadas para as etapas de resistência ao etanol e processo fermentativo inicial em açúcares mais simples, onde foram obtidas leveduras com perfil compatível com as demais leveduras não-*Saccharomyces* testadas na produção de cervejas e outras bebidas fermentadas. A partir desses resultados foi possível observar para esse grupo de leveduras boa tolerância a altos níveis de etanol durante a fermentação dos açúcares, bem como outras características apropriadas e desejáveis às condições estabelecidas em um processo de produção de cerveja. As linhagens selecionadas foram capazes de resistir até 15% de etanol, sendo que as concentrações de 5% e 7,5% foram as mais tolerantes, 10, 12 e 15% de etanol reduziram a quantidade em biomassa de leveduras e ufc/mL de viáveis resistentes.

Com relação às análises físico-químicas, os resultados para acidez e turbidez apresentados neste trabalho, é sabido que a acidez em excesso gera sabores devido aos valores excessivos de ácido acético (ou acetoínas) características estas associadas geralmente à contaminação bacteriana ou que o produto final esteja estragado, gerando defeito na maioria das cervejas ou ainda contaminação. Entretanto, características mais voltadas para acidez também podem ser desejáveis para algumas cervejas artesanais especializadas³⁷⁻⁴¹, sendo que neste trabalho, nenhuma contaminação bacteriana foi encontrada em nenhuma etapa do experimento.

De maneira geral, as análises físico-químicas mostraram que todas as amostras apresentaram elevadas concentrações de acidez volátil, ésteres, turbidez e coloração, ou seja, fora do padrão determinado pela literatura. O IBU ficou parcialmente fora do padrão, porém aceitável para cervejas do tipo Ale. O pH manteve-se normal para cervejas dentro do estilo produzido.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se da importância do isolamento e caracterização de leveduras selvagens, denominada bioprospecção microbiana, que se constitui em uma nova área de extrema relevância no campo do Uso de Recursos Naturais voltados para a Biotecnologia, e sobretudo porque com a aplicação dessas técnicas é possível prospectar microrganismos para a aplicação em diversos processos como a produção de bebidas fermentadas, notadamente na seleção de leveduras nativas do Brasil com potencial na produção de cervejas artesanais com aromas e sabores diferenciados das características das cervejas produzidas apenas com leveduras comerciais.

Será dada continuidade a esta linha de pesquisa, com a identificação das linhagens que não foram sequenciadas e análise físico-química e sensorial após produção de novas cervejas experimentais, explorando de forma mais ampla a coleção de leveduras não-*Saccharomyces* tais como as *P. kudriavzevii* aqui testadas, visando a adequação dessas características mais diferenciadas, na produção de outros estilos de cervejas.

Como perspectivas para futuros estudos, poderá ser feita uma nova fermentação com outros isolados de leveduras que não puderam ser utilizados nessa produção das cervejas, além das possibilidades para que sejam testadas em outros estilos e condições de produção melhor controladas e com insumos diversificados para produção de novos estilos e incorporação de matérias primas locais buscando valorização dessa biodiversidade regional do Cerrado em MG.

REFERÊNCIAS

1. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da Cerveja 2022. Brasília, DF: 2023.
2. GARAVAGLIA, Christian e SWINNEN, Johan. Economics of the Craft Beer Revolution: A Comparative International Perspective. GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. (Org.). *Economic Perspectives on Craft Beer*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 3–51. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-58235-1_1>. Acesso em: 27 abr 2024. DOI:10.1007/978-3-319-58235-1_1.
3. KOCH, Eduardo Salgueiro.; SAUERBRONN, João Felipe Rammelt. “To love beer above all things”: An analysis of Brazilian craft beer subculture of consumption. *Journal of Food Products Marketing*, v. 25, n. 1, p. 1–25, 2 Jan 2019. DOI:10.1080/10454446.2018.1431577.

4. SCHUINA, Guilherme Lorencini et al. Use of carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae) as a total substitute for hops in the production of lager beer. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 44, n. 10, Out 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.14730>>. Acesso em: 27 abr 2024. DOI:10.1111/jfpp.14730.
5. SCHUINA, Guilherme et al. Application of Pau-tenente (*Quassia Amara* L.) as Hop Replacement in Brazilian Low-bitter Beer. *Chemical Engineering Transactions*, v. 79, p. 331–336, Abr 2020. DOI:10.3303/CET2079056.
6. SILVELLO, Giovanni C.; BORTOLETTO, Aline M.; ALCARDE, André Ricardo. The barrel aged beer wheel: a tool for sensory assessment. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 126, n. 4, p. 382–393, 2020. DOI: /10.1002/jib.626.
7. ARAÚJO, Thalita Macedo et al. Cachaça yeasts trains: alternative starters to produce beer and bioethanol. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 10, p. 1749–1766, Out 2018. DOI:10.1007/s10482-018-1063-3.
8. PATARO, Carla. Comunidades de leveduras associadas com a fermentação espontânea durante a produção artesanal da cachaça de Alambique em Minas Gerais. 2000. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUOS-9BHKK3>>.
9. KOSKELLA, Britt. The phyllosphere. *Current Biology*, v. 30, n. 19, p. R1143–R1146, Out 2020. DOI:10.1016/j.cub.2020.07.037.
10. LIBKIND, Diego et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 35, p. 14539–14544, 30 Ago 2011. DOI:10.1073/pnas.1105430108.
11. CROONENBERGHS, Alejandro P et al. Fruitbeers, beers with or without a co-fermentation step with fruits. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 86, p. 103081, Abr 2024. DOI:10.1016/j.copbio.2024.103081.
12. GARAVAGLIA, Christian. The Emergence of Italian Craft Breweries and the Development of Their Local Identity. HOALST-PULLEN, N.; PATTERSON, M. W. (Org.). *The Geography of Beer*. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 135–147. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-41654-6_11>. Acesso em: 27 abr 2024. DOI:10.1007/978-3-030-41654-6_11.
13. TEIXEIRA, Nayane et al. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. *Food Research International*, v. 119, p. 325–348, Maio 2019. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.058.
14. VALE, Helson Mario Martins Do et al. Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential. *Biota Neotropica*, v. 21, n. 4, p. e20201184, 2021 DOI:10.1590/1676-0611-bn-2020-1184.
15. BRITO JÚNIOR, Marcello Rocha De et al. Physicochemical Characteristics and Antioxidant Potential of a FruitBeer Produced with Juçara (*Euterpe edulis* Martius) Fruit Pulp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 66, p. e23220324, 2023. DOI:10.1590/1678-4324-2023220324.
16. DA-SILVA, José Renato et al. Mandacaru fruit pulp (*Cereus jamacaru* D.C.) as an adjunct and its influence on Beer properties. *Food Chemistry*, v. 406, p. 135066, Abr 2023 DOI:10.1016/j.foodchem.2022.135066.

17. PRAIA, Ana Beatriz et al. Sour Beer with *Lacticaseibacillus paracasei* sub sp. *paracasei* F19: Feasibility and Influence of Supplementation with Spondias mombin L. *Juice and/or By-Product. Foods*, v. 11, n. 24, p. 4068, 16 Dez 2022. DOI:10.3390/foods11244068.
18. HORNINK, Gabriel Gerber et al. Mapa das cervejarias de Minas Gerais. 2023. Disponível em: <<https://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.15635.86561>>. Acesso em: 27 abr 2024 DOI:10.13140/RG.2.2.15635.86561.
19. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Jequitai/Minas Gerais. 2021. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/jequitai/panorama>.
20. SANO, Edson E. et al. Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. *Journal of Environmental Management*, v. 232, p. 818–828, Fev 2019. DOI:10.1016/j.jenvman.2018.11.108.
21. PONTECORVO, Guido et al. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*. Elsevier, 1953. v. 5. p. 141–238. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266008604083>>. Acesso em: 28 abr 2024. DOI:10.1016/S0065-2660(08)60408-3.
22. PALMER, John John. *How to brew: everything you need to know to brew great beer every time*. Fourth edition ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, a division of the Brewers Association, 2017.
23. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). 24 de 08 de setembro de 2005. Instrução Normativa. Manual Operacional de Bebidas e Vinagres, 2005, Sec. 1: 11.
24. ZUPPARDO, Bianca. Uso da goma Oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja. 2010. (Dissertação de mestrado) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
25. OLIVEIRA, Rodrigo de Queiroz. Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano. 2007. (Dissertação de mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2007.
26. RAMOS, Cíntia Lacerda et al. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 935–944, Set 2013. DOI:10.1590/S1517-83822013005000051.
27. KIM, Hyun-Soo et al. Identification of novel genes responsible for ethanol and/or thermotolerance by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 4, p. 1159–1172, Ago 2011. DOI:10.1007/s00253-011-3298-z.
28. STEINER, Elisabeth et al. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, n. 4, p. 803–813, 15 Mar 2012. DOI:10.1002/jsfa.4651.
29. BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM (BJCP). Style Guidelines for Beer, Mead and Cider. 2015.
30. GALLONE, Brigida et al. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, v. 166, n. 6, p. 1397–1410.e16, Set 2016. DOI:10.1016/j.cell.2016.08.020.

31. PIORNOS, José Antonio et al. Alcohol free and low alcohol beers: Aroma chemistry and sensory characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 22, n. 1, p. 233–259, Jan 2023. DOI:10.1111/1541-4337.13068.
32. VILELA, Alice. Lachancea thermotolerans, the Non-Saccharomyces Yeast that Reduces the Volatile Acidity of Wines. *Fermentation*, v. 4, n. 3, p. 56, 19 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2311-5637/4/3/56>>.
33. RAVASIO, Davide et al. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. *Fermentation*, v. 4, n. 1, p. 15, 26 Fev 2018. DOI:10.3390/fermentation4010015.
34. WU, Jihong et al. Recent advances in the understanding of off-flavors in alcoholic beverages: Generation, regulation, and challenges. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 103, p. 104117, Out 2021. DOI:10.1016/j.jfca.2021.104117.
35. SIQUEIRA, Priscila Becker.; BOLINI, Helena Maria André.; MACEDO, Gabriela Alves. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. v. 19, n. 4, p. 491–498, 2008.
36. DA-SILVA, Campos Lucas.; MARCONDES, Lígia Rodrigues dos Santos.; PINHEIRO, Leonardo Furtado. ESTABILIDADE COLOIDAL E CLARIFICANTES USADOS EM CERVEJA: UMA REVISÃO. RECIMA21 - *Revista Científica Multidisciplinar* - ISSN 2675-6218, v. 3, n. 5, p. e351474, 26 Maio 2022. DOI:10.47820/recima21.v3i5.1474.
37. ARAÚJO, Flávia Bernardes.; DA SILVA, Paulo Henrique Almeida.; MINIM, Valéria Peres Ribeiro. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003;23(2):121–128. DOI:10.1590/S0101-20612003000200004.
38. BONGAERTS, Dries.; DE ROOS, Jonas.; DE VUYST, Luc. Technological and Environmental Features Determine the Uniqueness of the Lambic Beer Microbiota and Production Process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, n. 18, p. e00612-21, 26 Ago 2021. DOI:10.1128/AEM.00612-21.
39. ESSLINGER, Hans Michael. *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
40. NUNES, Joyce da Silva. Avaliação dos parâmetros de qualidade na produção de cerveja. 2021. Trabalho de conclusão de curso – FAENG – Faculdade de Engenharia, Cuiabá, 2021.
41. ROSA, Natasha Aguiar.; AFONSO, Júlio Carlos. A Química da Cerveja. *Química Nova na Escola*, v. 37, n. 2, 2015. Disponível em: <http://qnesc.sbgq.org.br/online/qnesc37_2/05-QS-155-12.pdf>. Acesso em: 28 abr 2024 DOI:10.5935/0104-8899.20150030.