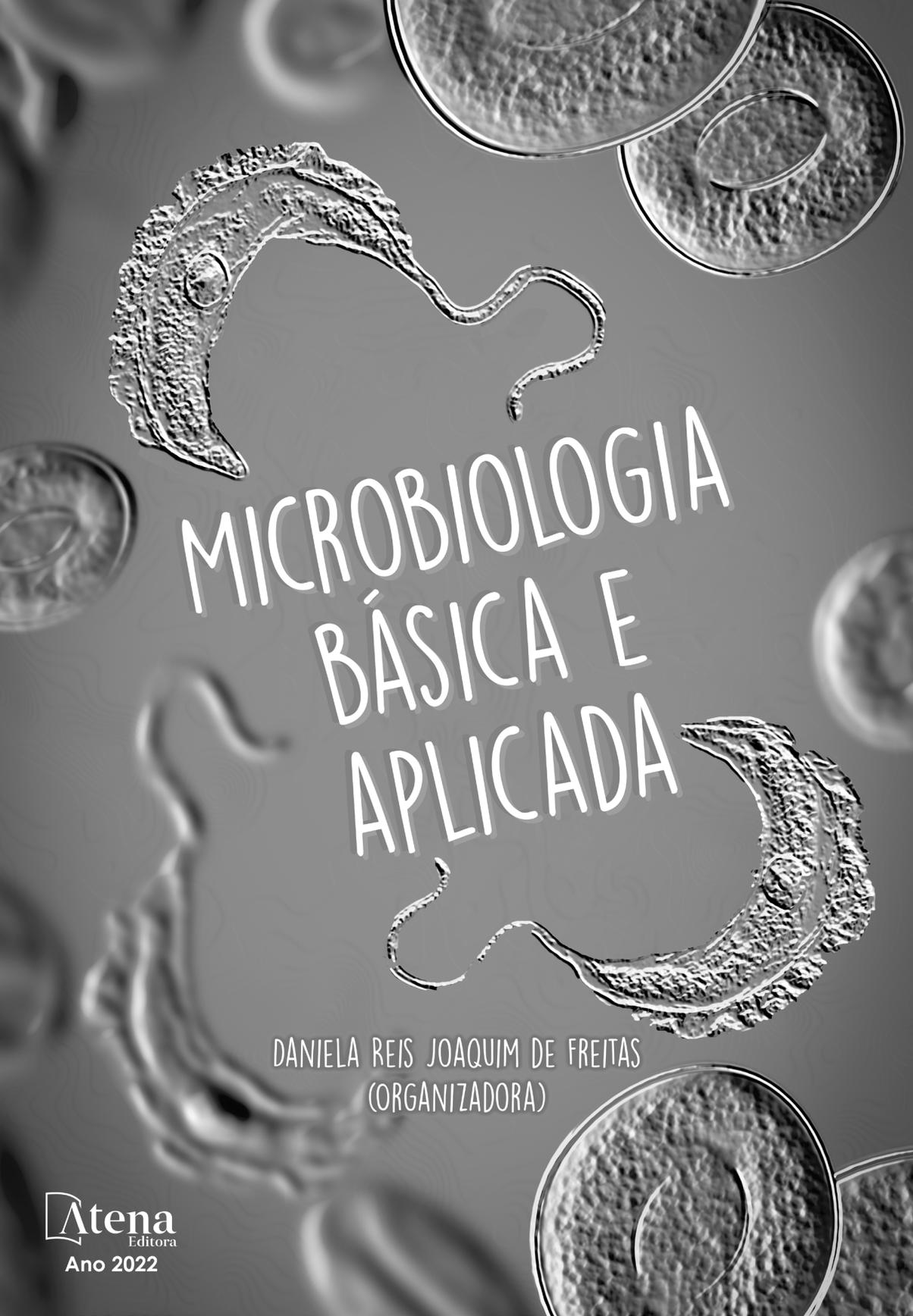
The background of the cover is a vibrant blue with a pattern of various microscopic organisms. There are several circular, textured structures resembling spores or cells, some with distinct internal patterns. There are also elongated, wavy, and somewhat irregular shapes that look like bacteria or protozoa. The overall effect is a dense, colorful field of microscopic life.

MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)

The background of the cover is a grayscale collage of microscopic images. It features several circular petri dishes containing bacterial cultures, some showing distinct patterns of growth. Interspersed among these are larger, more detailed images of microorganisms, including what appear to be elongated, curved structures with flagella or cilia, possibly protozoa or certain bacteria, and other complex cellular forms. The overall aesthetic is scientific and detailed.

MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^o Dr^a Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Prof^o Dr^a Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof^o Dr^a Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Prof^o Dr^a Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Prof^o Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof^o Dr^a Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Prof^o Dr^a Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Prof^o Dr^a Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^o Dr^a Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Prof^o Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Prof^o Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Prof^o Dr^a Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Prof^o Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^o Dr^a Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Prof^o Dr^a Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^o Dr^a Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Prof^o Dr^a Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Prof^o Dr^a Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Prof^o Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^o Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^o Dr^a Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Microbiologia básica e aplicada

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia básica e aplicada / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-953-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.537221802>

1. Microbiologia. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APRESENTAÇÃO

A pesquisa na área de Microbiologia tem se expandido de forma impressionante nos últimos anos. Seja na área de pesquisa médica, no manejo e controle de infecções, ou nas áreas de biotecnologia, nutrição, produção de alimentos, produção de medicamentos ou indústria, sempre o conhecimento a respeito de microbiologia mostra-se necessário. E é fundamental poder acompanhar este desenvolvimento, através do estudo acerca do tema. O livro “Microbiologia Básica e Aplicada” nos dá uma mostra do tipo de pesquisa que se vem fazendo atualmente na área de Microbiologia geral.

Esta obra é composta por trabalhos científicos produzidos em diversas regiões do país na forma de artigos originais e de revisão, por pesquisadores capacitados, e abordam desde viroses transmitidas por dípteros ceratopogonídeos, como maruins, à entomologia forense, produção de cerveja utilizando leveduras não-convencionais e infecções odontogênicas causadas por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, ou pneumonias causadas por *Klebsiella pneumoniae*; ainda temos a produção de biosurfactante por *Cunninghamella elegans* em condições extremas; a utilização de rizobactérias para a conservação de espécies vegetais florestais como *Apuleia leiocarpa*; e a produção de antimicrobianos através do uso de produtos naturais.

Ao longo dos oito capítulos que compõem esta obra, serão discutidos diferentes temas, com metodologia científica embasada em conceitos teórico-científicos aprovados por pares dentro da área de Microbiologia. Além disso, o livro traz conceitos importantes, todos atualizados e revistos. Isto faz com que “Microbiologia Básica e Aplicada” seja um livro voltado principalmente para estudantes e profissionais que desejam aprofundar mais seus conhecimentos nesta maravilhosa área, através de uma leitura rápida e dinâmica.

Todas as publicações da Atena Editora passam pela revisão de um Comitê de pesquisadores com mestrado e doutorado em programas de pós-graduação renomados no Brasil. Assim, este livro aqui apresentado é a soma de esforços para realizar um trabalho de qualidade, atualizado e devidamente revisado por pares.

Esperamos que você, caro leitor, aproveite bem nossa obra. Boa leitura.

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

MARUINS (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) VETOR DE DOENÇAS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS-MA

Cleilton Lima Franco
Tatiane Gomes da Silva Araújo
Ivirlane Naira Conceição de Oliveira
Francisca Barbara e Silva Barros
Carlos Augusto Silva de Azevêdo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218021>

CAPÍTULO 2..... 8

PREVALÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS E OS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO

Lizandra Maria Ferreira Almeida
Maria Eduarda Lima Martins
José Manuel Noguera Bazán
Erika Alves da Fonseca Amorim
Tatiany Gomes Ferreira Fernandes
Cícero Newton Lemos Felício Agostinho
Lívia Câmara de Carvalho Galvão
Adrielle Zigmignan
Luís Cláudio Nascimento da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218022>

CAPÍTULO 3..... 20

***Klebsiella pneumoniae*: UMA VISÃO GERAL SOBRE ESSA ESPÉCIE BACTERIANA QUE DESPERTA PREOCUPAÇÃO CRESCENTE NA SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL**

André Pitondo da Silva
Rafael da Silva Goulart
Carolina Bressan dos Reis
Miguel Augusto de Moraes
Mariana de Oliveira-Silva
Rafael Nakamura da Silva
Amanda Kamyla Ferreira da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218023>

CAPÍTULO 4..... 38

ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E PUPAS DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA) PÓS-ENTERRAMENTO: UMA REVISÃO DA LITERATURA E ESTUDO EXPERIMENTAL SOB A LUZ DA ENTOMOLOGIA FORENSE

Jéssica da Silva Costa
Adriana Leal de Figueiredo
Wellington Thadeu de Alcantara Azevedo
Cláudia Soares Santos Lessa
Valéria Magalhães Aguiar

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218024>

CAPÍTULO 5..... 50

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

João Vitor Rodrigues Pereira
Marcela Moreira Albuquerque
Willyan Alex Prochera Clausen
Paula Regina Cogo Pereira
Karla Emanuele Costa Rosa
Lígia Alves da Costa Cardoso
Thabata Maria Alvarez
Maura Harumi Sugai-Guerios

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218025>

CAPÍTULO 6..... 66

PRODUÇÃO DE BIODERIVADO DE BIOMASSA DE *Cunninghamella elegans* UCP 542 E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE APÓS EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES EXTREMAS

Camilla Pereira de Arruda
Evelyn Tamires Nascimento Andrade
Luanna Julia Silva de Melo
Emerson Ryan Neves de Souza
Eduardo Henrique Cabral Braga
Vitória Régia da Silva
Carlos Henrique Corrêa Xavier
Galba Maria de Campos Takaki
Luiz Oliveira da Costa Filho
Rosileide Fontenele da Silva Andrade

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218026>

CAPÍTULO 7..... 74

PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE DROGAS CONTRA TUBERCULOSE: UMA REVISÃO DE ESTUDOS UTILIZANDO MODELOS ANIMAIS

João Victor de Souza Lima
João Gabriel Matos da Silva
Daniel Lima Pereira
Amanda Caroline de Souza Sales
Lucas dos Santos Silva
Bruna Sthefanny da Cunha Ferreira
Maria Caroliny dos Santos Vale
Larissa Araújo Lopes
José Manuel Noguera Bazán
Diana Messala Pinheiro da Silva Monteiro
Erika Alves da Fonseca Amorim
Adrielle Zagmignan
Luís Cláudio Nascimento da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218027>

CAPÍTULO 8..... 92

RIZOBACTÉRIAS PARA A CONSERVAÇÃO DA *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

Beatriz Silva Santiago

Monyck Jeane dos Santos Lopes

Ila Nayara Bezerra da Silva

Ely Simone Cajueiro Gurgel

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5372218028>

SOBRE A ORGANIZADORA..... 102

ÍNDICE REMISSIVO..... 103

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

Data de aceite: 01/02/2022

Data de submissão: 15/12/2021

Maura Harumi Sugai-Guerios

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/6850585122363619>

João Vitor Rodrigues Pereira

Universidade Positivo

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/0854928948949973>

Marcela Moreira Albuquerque

Universidade Positivo

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/8225878481911350>

Willyan Alex Prochera Clausen

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/7222136086516988>

Paula Regina Cogo Pereira

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/8819104997028750>

Karla Emanuele Costa Rosa

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/5002413289658429>

Lúgia Alves da Costa Cardoso

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/5655205350391160>

Thabata Maria Alvarez

Universidade Positivo (UP)

Curitiba – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/5098256501937905>

RESUMO: As leveduras utilizadas para a produção de cerveja devem ser capazes de metabolizar alguns dos carboidratos presentes no mosto cervejeiro e produzir bons aromas e sabores durante a fermentação, podendo ou não resultar na produção de etanol. O uso de leveduras não-*Saccharomyces* para a produção de cerveja pode resultar em produtos com características diferenciadas, uma vez que as leveduras são os principais determinantes para o perfil de compostos voláteis da cerveja, agregando à diversidade de sabores e aromas em cervejas comercializadas. Existem diversas fontes das quais é possível isolar leveduras, como frutas, amostras de solo, cascas de árvore e outras bebidas fermentadas. Com o intuito de obter leveduras com características desejáveis para a produção de cerveja, são empregados métodos de seleção durante ou após o isolamento, seguidos de metodologias de caracterização para avaliar seus atributos e, conseqüentemente, a viabilidade das cepas obtidas para a produção de cerveja. O objetivo do presente trabalho consistiu em compilar e comparar metodologias de seleção e caracterização usadas durante o processo de obtenção e escolha de leveduras para a produção de cerveja. Conclui-se que as metodologias empregadas devem ser compatíveis com o número de cepas a serem testadas, orçamento e equipamentos disponíveis

e, principalmente, com o processo cervejeiro e tipo de cerveja a ser produzida, por exemplo, com base no seu amargor e teor alcóolico.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção. Etanol. Leveduras não-convencionais. Lúpulo. Maltose.

EVALUATION OF METHODS FOR THE SELECTION AND CHARACTERIZATION OF ISOLATED BREWING YEASTS

ABSTRACT: Yeasts used for brewing must be able to metabolize some of the carbohydrates present in the brewer's wort and produce good aromas and flavors during the fermentation, with or without the production of ethanol. The use of non-*Saccharomyces* yeasts for brewing may result in products with differentiated characteristics, since yeasts are the main contributor to the resulting volatile profile of the beer, adding to the diversity of flavors and aromas. There are several sources from which yeasts can be isolated, such as fruits, soil samples, tree bark and other fermented beverages. In order to obtain yeasts with desirable characteristics for beer production, selection methods are used during or after isolation, followed by characterization methodologies to assess their attributes and, consequently, the viability of the strains obtained for beer production. The aim of this study consisted in compiling and comparing selection and characterization methodologies used during the process of obtaining and choosing yeast species for beer production. In conclusion, the methodologies used should be compatible with the number of strains to be tested, with the budget and equipment available and, specially, with the brewing process and the type of beer to be produced, for example, its bitterness and alcohol concentration.

KEYWORDS: Bioprospecting. Ethanol. Hop. Non-conventional yeasts. Maltose.

1 | INTRODUÇÃO

A cerveja é produzida pela fermentação por leveduras do mosto cervejeiro, que é obtido a partir de malte de cereais e lúpulo. As características da cerveja, incluindo o sabor, variam de acordo com os cereais utilizados na maltagem, o tipo de extrato de lúpulo e as leveduras utilizadas, e as condições de processo de cada uma destas etapas, como temperatura e duração (DURELLO *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, foram selecionadas leveduras que demonstraram características desejáveis para a fabricação de cerveja, como: a produção de sabores e aromas agradáveis; a capacidade de utilizar maltose e maltotriose, a não produção de toxinas; a capacidade de produzir e tolerar etanol; e a tolerância às condições do processo fermentativo (CAPECE *et al.*, 2018). Estas leveduras foram intituladas convencionais para a produção de cerveja e geralmente englobam todas as espécies de *Saccharomyces* e algumas espécies frequentemente utilizadas na indústria de alimentos, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis* (SANNINO *et al.*, 2019; SIBIRNY, SCHEFFERS, 2002).

A demanda crescente por cervejas com baixo teor alcoólico ou com sabores e aromas diferenciados incentiva a busca por leveduras não convencionalmente utilizadas na produção de cerveja, em especial por espécies não pertencentes ao gênero

Saccharomyces (CAPECE *et al.*, 2018; OSBURN *et al.*, 2016; BASSO *et al.*, 2016), como *Zygosaccharomyces bailii* (BELLUT *et al.*, 2018), *Lachancea fermentati* (BELLUT *et al.*, 2020), *Wickerhamomyces anomalus* (CAPECE *et al.*, 2018), *Kloeckera apiculata* (ESTELA-ESCALANTE *et al.*, 2018) e *Brettanomyces anomalus* (MICHEL *et al.*, 2016). Seu uso como iniciadores de fermentação ainda é raro, sendo usualmente utilizadas de modo conjunto com outras espécies de *Saccharomyces*, em processos de cofermentação ou fermentação sequencial (CHEN, 2011; HOLT *et al.*, 2018). Os aromas e sabores produzidos por estas leveduras incluem: álcool amílico e 2-feniletanol, de aroma frutado (CAPECE *et al.*, 2018); hexanoato de etila, com sabor semelhante a maçã e frutas (CANONICO *et al.*, 2016); 1-nonanol, 2-heptanol e 2-nonanol, de sabor frutado (BELLUT *et al.*, 2018). Sannino *et al.* (2019) apresentam uma revisão sobre os aromas produzidos por leveduras não-convencionais aplicadas à produção de cerveja.

Existem diversas fontes das quais podem ser isoladas leveduras não-convencionais, como bebidas fermentadas, frutas, cascas de árvores e solo (SNIEGOWSKI *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ *et al.*, 2018). Este isolamento é normalmente realizado através de etapas de diluição seriada e plaqueamento, sendo possível incluir uma etapa de enriquecimento, que consiste no uso de meios de cultivo que promovem o crescimento das cepas com características desejadas, sendo usado quando a concentração dessa cepa na amostra é baixa ou desconhecida (GRIJALVA-VALLEJOS *et al.*, 2020; OSBURN *et al.*, 2018). Após o isolamento, as cepas devem ser caracterizadas e selecionadas de acordo com as características visadas pelos pesquisadores.

Neste contexto, o objetivo desta revisão é compilar e comparar diferentes metodologias de seleção e caracterização, considerando os objetivos e os equipamentos utilizados em cada uma, visando facilitar a escolha da metodologia adequada para a bioprospecção de leveduras a serem utilizadas em processos de produção de cerveja.

2 | ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

O modo mais comum para a recuperação de microrganismos é o método de isolamento por plaqueamento. As variações na metodologia são relativas às amostras usadas como ponto de partida; à presença ou à ausência de etapa de enriquecimento; aos métodos utilizados para o enriquecimento, caso este seja realizado; à composição dos meios de cultivo usados no plaqueamento; e às condições das etapas de incubação. Gutiérrez *et al.* (2018) e Cubillos *et al.* (2019) apresentam uma relação de tipos de amostras que já foram utilizadas no isolamento de leveduras para produção de cerveja, como líquens, frutos, grãos e outros produtos fermentados.

Tanto para a etapa de enriquecimento quanto para a etapa de plaqueamento, existem diferentes metodologias que variam de acordo com as características desejadas

para a levedura e com o tipo de amostra. Por exemplo, é importante que seja usado um método de seleção que iniba o crescimento de bactérias, favorecendo o isolamento de leveduras. Para isso, é comum suplementar o meio com um antibacteriano, como o cloranfenicol (GRIJALVA-VALLEJOS *et al.*, 2020; LAITILA *et al.*, 2007). Alternativamente, Cubillos *et al.* (2019) sugerem a adição de etanol ou acidificação do pH do meio, o que reduz o crescimento das bactérias, porém, também reduz a diversidade de cepas de leveduras capazes de crescer no meio (ROSSO *et al.*, 1995; RUSSELL; DIEZ- GONZALEZ, 1997).

Outro método de seleção frequentemente empregado consiste na utilização de meios de cultivo com composições que simultaneamente limitam o crescimento de cepas indesejadas e oferecem condições que beneficiam apenas as cepas que são de interesse na pesquisa, simulando as condições do processo fermentativo. Podem ser utilizados como meio de cultivo, por exemplo, o mosto cervejeiro (BELLUT *et al.*, 2018) ou um meio de cultivo sintético suplementado com etanol, como o meio YPD8E5 (1% extrato de levedura, 2% peptona, 8% glicose e 5% etanol), proposto por Osburn *et al.* (2016) e utilizado durante o enriquecimento de amostras por Barry *et al.* (2018).

O trabalho de Barry *et al.* (2018) é um exemplo de isolamento utilizando etapas enriquecimento, visando leveduras para produção de hidromel. Com o intuito de selecionar leveduras tolerantes ao etanol, utilizaram uma metodologia adaptada de Osburn *et al.* (2016), na qual as amostras foram enriquecidas através de incubação em meio líquido YPD8E5 a 30 °C com aeração por 24 h, avaliando o crescimento dos microrganismos através da observação de turbidez no meio, seguida de plaqueamento em meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutriente). As amostras utilizadas como fonte de prospecção foram mel, favo, própolis, fragmentos de colmeia e abdômen rompido de abelha, no entanto, somente na amostra de abdômen foi possível isolar leveduras devido à baixa carga microbiana das demais amostras. Dessa forma, Barry *et al.* (2018) obtiveram duas cepas de *Torulasporea delbrueckii*.

Barry *et al.* (2018) testaram estas cepas obtidas em fermentação de mel diluído e de mosto cervejeiro, usando uma cepa de laboratório de *S. cerevisiae* como controle. No mel diluído, ambas as cepas tiveram crescimento mais lento do que a cepa controle, mas, atingiram teor alcóolico semelhante, aproximadamente 11 % (v/v), o que indica que o método de enriquecimento utilizado permitiu o isolamento de cepas que tolerassem etanol. Por outro lado, a concentração de etanol na fermentação de mosto cervejeiro não passou de 1 % (v/v), uma vez que as cepas não eram capazes de metabolizar maltose, o que é necessário para obtenção de etanol no mosto. Barry *et al.* (2018) apresentaram dois motivos para este resultado: as leveduras são oriundas de amostras que não contém maltose; e não foi realizada uma seleção por leveduras capazes de fermentar maltose, uma vez que a fonte de carbono no meio de enriquecimento era glicose. Para que a bioprospecção seja bem-sucedida, Barry *et al.* (2018) ressaltam a importância de definir os métodos de seleção com base nos fenótipos desejados, como capacidade de fermentação de carboidratos e

tolerância ao etanol. Dessa forma, visando à obtenção de leveduras para produção de cerveja, seria mais indicado o uso de mosto cervejeiro na etapa de enriquecimento.

3 I CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

Para determinar as características bioquímicas das leveduras obtidas, frequentemente são empregados ensaios de caracterização, nos quais se avalia a capacidade das cepas crescerem quando expostas a diferentes condições químicas e físicas, e alterando a disponibilidade de micro- e macronutrientes. As principais características avaliadas para leveduras aplicadas na produção de cerveja são: fermentação de carboidratos, tolerância ao lúpulo e tolerância ao etanol.

3.1 Fermentação de Carboidratos

Os carboidratos fermentescíveis presentes em maiores concentrações no mosto cervejeiro são: maltose (38 a 61 g/L), maltotriose (11 a 18 g/L), glicose (5 a 15 g/L), sacarose (1 a 6 g/L) e frutose (1 a 10 g/L) (MACWILLIAM, 1968). As concentrações exatas de cada carboidrato variam de acordo com o tipo de cerveja e a receita utilizada, especialmente, os tipos de maltes utilizados e as condições de mostura (tempo e temperatura das rampas). Os carboidratos são consumidos pelas leveduras de modo sequencial de acordo com a complexidade de sua estrutura, iniciando pela glicose e pela frutose, seguindo para a hidrólise da sacarose e por último a hidrólise da maltose e da maltotriose (LAGUNAS, 1993). Essa ordem de consumo dos carboidratos ocorre devido à repressão catabólica das vias metabólicas de carboidratos alternativos em favorecimento à utilização da glicose (LAGUNAS, 1993).

É importante determinar a capacidade de utilizar carboidratos presentes no mosto, visto que impacta diretamente nas características da cerveja produzida (CAPECE *et al.*, 2018). A fermentação parcial ou a ausência da fermentação de um ou mais carboidratos presentes no mosto pode acarretar produtos com sabores e aromas atípicos, reduzindo sua qualidade, por exemplo, a utilização lenta ou incompleta de maltotriose resulta em sabores adocicados (ZASTROW *et al.*, 2001).

A capacidade de utilização da maltose e da maltotriose também determina a concentração de etanol na cerveja. Quando a levedura não é capaz de consumir estes oligossacarídeos, como é o caso da maioria das cepas não-*Saccharomyces*, obtém-se cervejas com baixo teor alcoólico e com sabores adocicados. Neste caso, é uma alternativa simples para a produção de cerveja sem álcool em comparação ao processo com leveduras convencionais, no qual fermentação é conduzida em baixa temperatura ou as leveduras são removidas antes da formação de etanol (SANNINO *et al.*, 2019; BELLUT *et al.*, 2018). Nos últimos anos, visando obter cerveja com álcool e com aromas diferenciados, tem-se utilizado leveduras não-*Saccharomyces* junto com uma levedura *Saccharomyces*, que

produz etanol (SANNINO *et al.*, 2019; RAVASIO *et al.*, 2018).

A capacidade de metabolizar carboidratos é avaliada com metodologias que indiquem crescimento celular em meio líquido contendo um único carboidrato como fonte de carbono, através da visualização da acidificação do meio ou da medição da densidade óptica (DO). Kali *et al.* (2015), por exemplo, utilizaram uma microplaca de multipoços, sendo que cada poço continha meio líquido com diferentes carboidratos (Tabela 1). Os meios utilizados continham vermelho de fenol, cuja coloração é alterada quando o meio é acidificado pela fermentação do carboidrato presente, de modo que a detecção do crescimento é visual. O método empregado por Kali *et al.* (2015) não requer materiais ou equipamentos de alto custo, é de simples interpretação dos resultados, e o uso da microplaca é vantajoso por ser compacta e reduzir o volume de meio. Entretanto, o resultado não é quantitativo.

Fonte das leveduras	Meio de cultivo	Carboidrato avaliado	Forma de incubação	Temperatura	Parâmetros medidos
Banco de cepas ¹	Caldo vermelho fenol + 2 % carboidrato	Glicose	Microplaca Sem agitação Análise após 7 dias	25 a 30 °C	Mudança da coloração por acidificação
		Sacarose			
		Lactose			
		Maltose			
Banco de cepas ²	0,7 % YNB + Carboidrato	1 % Glicose	Microplaca Sem agitação Análise a cada 24 h por 4 dias	28 °C	DO 600 nm
		1 % Frutose			
		2 % Sacarose			
		5,5 % Maltose			
		2 % Maltotriose			
		1 % Melibiose			
Banco de cepas de kombucha ³	YT MicroPlate™ (BioLog)	Maltose	Microplaca Sem agitação Análise após 72 h	25 °C	DO 590 nm
		Maltotriose			
		Glicose			
		Frutose			
		Sacarose			
		Melibiose			
		Raffinose			
		Celobiose			
Isoladas de destilarias de cachaça ⁴	YP + 2 % carboidrato	Glicose	Fracos Agitação a 200 rpm Análise a cada 2 h por 72 h	30 °C	DO 600 nm
		Maltose			
		Maltotriose			

Tabela 1 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à utilização de carboidratos.

Fonte: ¹Kali *et al.* (2015), ²Methner *et al.* (2019), ³Bellut *et al.* (2018), ⁴Araújo *et al.* (2018).

A fim de obter dados quantitativos, pode ser medida a densidade óptica do meio, como feito por Methner *et al.* (2019), Bellut *et al.* (2018) e Araújo *et al.* (2018) (Tabela 1), no

entanto, é necessário espectrofotômetro ou leitor de microplaca. Dentre estes trabalhos, destaca-se a metodologia usada por Methner *et al.* (2019), devido aos cuidados realizados pelos autores: lavagem do inóculo para remover nutrientes residuais; padronização do inóculo por contagem celular; uso de controle negativo para cada meio testado; triplicata; incubação sem agitação para mimetizar as condições de fermentação do mosto, mas, com homogeneização imediatamente antes da medição da DO para suspender a biomassa; medição periódica da DO para construção de curva de crescimento; e uso de meio de cultivo no qual a única molécula orgânica em concentração significativa é o carboidrato testado.

A medição periódica de DO permite determinar a duração da fase lag e a velocidade de crescimento, e também foi feita por Araújo *et al.* (2018), que determinaram a velocidade específica de crescimento na fase exponencial para cada cepa. Por outro lado, como Methner *et al.* (2019) testaram 110 cepas, o resultado de DO foi apresentado de forma simplificada num mapa de calor, em que “houve crescimento” correspondia a DO maior que 0,4 e “não houve crescimento” a DO menor do que 0,4. Para uma cepa selecionada como exemplo por não utilizar maltose, Methner *et al.* (2019) mostraram a curva de crescimento para cada meio de cultivo testado. Em outra abordagem, Bellut *et al.* (2018) apenas avaliaram se a DO teve diferença em relação ao branco após a incubação.

As metodologias de Methner *et al.* (2019) e Araújo *et al.* (2018) também divergem quanto ao uso de agitação, à composição do meio e ao uso de cepas comerciais para comparação. A agitação não é recomendada, porque induz metabolismo aeróbico e, como algumas leveduras consomem maltotriose somente em aerobiose (ZASTROW *et al.*, 2001), poderia resultar em falso positivo. Para contornar este problema, Araújo *et al.* (2018) adicionaram antimicina A, que é inibidor da respiração celular, ao meio com maltotriose.

Em relação à composição do meio, Methner *et al.* (2019) usaram o meio YNB (base nitrogenada para levedura), no qual as moléculas orgânicas estão em baixa concentração. Por outro lado, Araújo *et al.* (2018) usaram meio YP, composto de 1% extrato de levedura e 2% peptona, que também podem ser usados como fonte de carbono pelas leveduras, resultando em crescimento basal para todas as cepas. Devido à maior precisão do resultado, o uso do meio YNB é mais recomendado do que o meio YP para avaliação da utilização de carboidratos.

Por fim, Araújo *et al.* (2018) utilizaram 4 cepas comercialmente utilizadas na produção de cerveja para comparar os resultados obtidos com as cepas isoladas, permitindo avaliar a quão significativa era a velocidade específica de crescimento de cada cepa. Methner *et al.* (2019) não utilizaram cepas comerciais para comparação, fazendo apenas uma distinção entre crescimento ou não de cada cepa, mas, seria interessante se tivessem utilizado um controle para comparar a DO máxima e velocidade de crescimento das cepas isoladas com cepas comerciais.

3.2 Tolerância ao Lúpulo

O lúpulo confere amargor à cerveja e atua como antimicrobiano (ALMAGUER *et al.*, 2014; DELYSER; KASPER, 1994). A ação antimicrobiana do lúpulo é mais eficiente contra bactérias gram-positivas do que contra a maioria das bactérias gram-negativas, fungos filamentosos ou leveduras (EDWARDSON, 1952; OHSUGI *et al.*, 1997; SALLE *et al.*, 1949). As propriedades antimicrobianas do lúpulo são majoritariamente conseqüentes dos α -ácidos e dos β -ácidos (SRINIVASAN *et al.*, 2004). Os α -ácidos presentes são humolona, cohumulona, adhumolona, prehumulona e posthumulona, cujas formas isomerizadas (iso- α -ácidos) contribuem para o amargor da cerveja. Enquanto isso, os β -ácidos presentes são lupolona, colupulona, adlupolona, prelupolona e postlupulona (SRINIVASAN *et al.*, 2004). Os β -ácidos geralmente estão presentes em menor concentração no mosto do que os iso- α -ácidos devido à baixa solubilidade no mosto (SAKAMOTO, KONINGS, 2003) e pela preferência por lúpulo com menores teores de β -ácidos, uma vez que os β -ácidos são indesejados na cerveja porque seus produtos da oxidação apresentam características organolépticas desagradáveis (DE KEUKELEIRE, 2000). Portanto, apesar dos β -ácidos apresentarem atividade antimicrobiana maior do que os iso- α -ácidos (METHNER *et al.*, 2019), a análise do efeito do lúpulo na cerveja normalmente é baseada na concentração de iso- α -ácidos (BELLUT *et al.*, 2018).

A concentração de iso- α -ácidos é mensurada em *International Bitterness Units* (IBU), de modo que 1 IBU corresponde a 1 ppm de iso- α -ácidos (HUNTER; DOMPKOWSKI, 2018). A mensuração do IBU pode ser feita por HPLC, cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida com detecção de absorvância ultravioleta ou com espectroscopia de massa, ou línguas eletrônicas, porém o método mais recomendado é a extração dos iso- α -ácidos com iso-octano, seguida pela determinação da absorvância em 275 nm (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Os valores de IBU divergem entre tipos de cerveja ou ainda dentro do mesmo tipo, devido a modificações nos ingredientes e nas receitas utilizados. Por exemplo, a Weisse varia de 3 a 6 IBU, a Lager estilo americana varia de 5 a 15 IBU, a Pale Ale estilo internacional varia de 20 a 42 IBU, e alguns tipos de cerveja podem chegar a 100 IBU (BREWERS ASSOCIATION, 2020).

A capacidade de uma cepa tolerar iso- α -ácidos é uma caracterização frequentemente realizada na seleção de cepas para produção de cerveja (Tabela 2). Methner *et al.* (2019) realizaram os testes de tolerância ao lúpulo simultaneamente ao teste de fermentação de carboidratos, utilizando microplacas e considerando como cepas tolerantes aquelas que apresentaram aumento de densidade óptica de pelo menos 0,4 após 4 dias de incubação. Nestes ensaios, utilizaram meio sintético composto por YNB e YCB (base carbono para levedura) enriquecido com extrato de lúpulo comercial isomerizado, para atingir 50 e 100 IBU de iso- α -ácidos, ou com extrato de lúpulo comercial rico em β -ácidos, para atingir 100 e 200 ppm de β -ácidos, avaliando a tolerância para iso- α -ácidos e para β -ácidos

separadamente e em mistura. A desvantagem do método de Methner *et al.* (2019) é a utilização de meio sintético ao invés de mosto cervejeiro, o que pode afetar o metabolismo do microrganismo e, portanto, o resultado obtido pode ser diferente do comportamento da levedura em mosto cervejeiro lupulado.

Fonte das leveduras	Meio de cultivo	Concentração de iso- α -ácidos (IBU) e β -ácidos (BA)	Forma de incubação	Temperatura	Parâmetros medidos
Banco de cepas ¹	0,7 % YNB + 2,33 % YCB + extrato de lúpulo	50 IBU	Microplaca Sem agitação Análise a cada 24 h por 4 dias	28 °C	DO 600 nm
		100 IBU			
		100 ppm BA			
		200 ppm BA			
		50 IBU + 100 ppm BA			
		100 IBU + 200 ppm BA			
Banco de cepas de kombucha ²	Mosto cervejeiro + iso- α -ácidos	0 IBU	Fracos Sem agitação Análise a cada 40 min por 96 h	25 °C	DO 600 nm
		50 IBU			
		100 IBU			
Banco de cepas ³	Mosto cervejeiro lupulado + glicose	25 IBU	Fracos Sem agitação Análise após 2 semanas	22,3 °C	Análise sensorial

Tabela 2 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à tolerância ao lúpulo.

Fonte: ¹Methner *et al.* (2019), ²Bellut *et al.* (2018), ³Osburn *et al.*, (2018).

Ao contrário de Methner *et al.* (2019), Bellut *et al.* (2018) e Osburn *et al.* (2018) utilizaram mosto cervejeiro como meio de cultivo. O mosto usado por Bellut *et al.* (2018) foi preparado dissolvendo extrato em pó de malte cervejeiro em água e enriquecendo com iso- α -ácidos, sem avaliar o efeito de β -ácidos (Tabela 2). Outra diferença é que Bellut *et al.* (2018) usaram frascos que apresentem menor área de troca gasosa por volume de meio do que as microplacas, portanto, simulando melhor as condições de fermentação industrial mesmo que dificultando a análise simultânea de muitas cepas.

Osburn *et al.* (2018) prepararam mosto cervejeiro por mosturação, com adição de lúpulo na etapa de fervura, e conduziram a fermentação em frascos com airlock (Tabela 2). Dessa forma, as cepas foram submetidas a condições mais próximas às condições de produção de cerveja artesanal do que nos métodos utilizados por Methner *et al.* (2019) e Bellut *et al.* (2018). A modificação da receita do mosto consistiu na adição de glicose ao mosto, provavelmente para favorecer o crescimento de cepas que não sejam capazes de utilizar maltose e maltotriose. A desvantagem da utilização de mostos cervejeiros é a variedade de tipos de mosto e de teores de IBU, de modo que o pesquisador precisa optar por um ou alguns tipos de mosto para testar.

A abordagem utilizada por Osburn *et al.* (2018) também se destaca das demais porque

avaliaram o aroma gerado, fazendo uma única etapa de seleção através da fermentação de mosto cervejeiro em menor escala (aproximadamente 400 mL), de modo que o crescimento foi determinado de forma indireta através da alteração do aroma. A vantagem deste método é que exclui cepas que não contribuem a um aroma interessante independente das demais características, como capacidade de fermentação de carboidratos. Através deste método, os autores conseguiram selecionar leveduras com potencial para produção de diferentes aromas ao mesmo tempo que avaliaram a tolerância ao lúpulo, num único ensaio.

Os resultados de Methner *et al.* (2019) e Bellut *et al.* (2018) indicam que a maioria das leveduras não são inibidas pelas concentrações de ácidos de lúpulo testadas, por exemplo, dentre as 110 cepas avaliadas por Methner *et al.* (2019), somente três cepas não cresceram em 200 ppm de β -ácidos e somente uma cepa foi inibida por 100 IBU. Dentre as cepas testadas por Bellut *et al.* (2018), todas apresentaram aumento da DO de pelo menos 0,6 e algumas cepas cresceram mais rápido do que a cepa comercial usada como controle, no entanto, nenhuma cepa atingiu o valor de DO final do controle provavelmente por não serem capazes de metabolizar todos os carboidratos do mosto. Methner *et al.* (2019) observaram que as leveduras possuem uma maior resistência para os compostos iso- α -ácidos do que em relação com os β -ácidos e que as misturas de iso- α -ácidos com β -ácidos resultam em maior inibição, que indica que as propriedades antimicrobianas desses compostos podem agir de modo acumulativo sobre os microrganismos presentes.

Os valores testados por Methner *et al.* (2019) e por Bellut *et al.* (2018) são maiores do que as concentrações presentes na grande maioria dos mostos cervejeiros utilizados comercialmente, mas, existem tipos de cerveja com valores elevados de até 100 IBU (BREWERS ASSOCIATION, 2020).

3.3 Tolerância ao Etanol

O etanol é um estressante ambiental para leveduras, de modo que, quanto maior a concentração de etanol, maior será a fluidez da membrana plasmática, gradualmente prejudicando sua integridade estrutural, reduzindo a velocidade de crescimento e podendo levar à morte celular (DING *et al.*, 2009). As leveduras possuem diferentes estratégias para contornar o efeito negativo do etanol, como a inserção de compostos na membrana plasmática para aumentar a estabilidade, a expressão de fatores capazes de estabilizar ou reparar as proteínas prejudicadas pelo etanol e a expressão de outros genes relacionados à tolerância a diferentes tipos de stress (YOU *et al.*, 2003; MACPHERSON *et al.*, 2006; BETZ *et al.*, 2004; SWAN, WATSON, 1998; VIANNA *et al.*, 2007).

Cepas utilizadas comercialmente apresentam maior eficiência de produção de etanol e tolerância a etanol do que as cepas não-convencionais (CAPECE *et al.*, 2018). O uso de espécies não-convencionais pode ser feito junto com cepas comerciais, em cofermentação ou em fermentação sequencial. Tal processo pode resultar em cervejas com características aromáticas e gustativas diferenciadas como consequência do uso de

espécies não-convencionais, enquanto a concentração alcoólica permanece em níveis adequados devido à fermentação por cepas convencionais (CANONICO *et al.*, 2016; RAVASIO *et al.*, 2018). No caso da cofermentação, a cepa não-convencional estará sujeita a concentrações crescentes de etanol ao longo da fermentação, por isso, é importante caracterizar a tolerância ao etanol (MUKHERJEE *et al.*, 2017). Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) ressaltam que diferentes cepas da mesma espécie podem apresentar resultados bastante contrastantes de tolerância a etanol e outras condições ambientais, logo, é importante a realização da caracterização, independente da classificação filogenética.

A seleção de leveduras com tolerância a etanol pode ser realizada através da adição de etanol ao meio durante as etapas de isolamento ou caracterização (CUBILLOS *et al.*, 2019). Semelhante ao ensaio de tolerância ao lúpulo, Methner *et al.* (2019) avaliaram a tolerância ao etanol utilizando meio composto por YNB e YCB enriquecidos com diferentes concentrações de etanol considerando como cepas tolerantes aquelas que apresentaram aumento de densidade óptica de pelo menos 0,4 após 4 dias de incubação (Tabela 3). Novamente, a desvantagem deste procedimento está no uso do meio sintético ao invés do mosto cervejeiro, uma vez que os componentes do mosto podem influenciar positivamente ou negativamente a tolerância ao etanol.

Fonte das leveduras	Meio de cultivo	Concentração de etanol (v/v)	Forma de incubação	Temperatura	Parâmetros medidos
Banco de cepas ¹	0,7 % YNB + 2,33 % YCB + Etanol	1 %	Microplaca Sem agitação Análise a cada 24 h por 4 dias	28 °C	DO 600 nm
		2 %			
		5 %			
		8 %			
		10 %			
Banco de cepas de vinho ²	YPD + Etanol	0 %	Tubos de ensaio Sem agitação	22 ou 37 °C	DO 595 nm ou formação de gás
		10 %			
		15 %			
		18 %			
Fermentação espontânea de chicha ³	GPY + Etanol	2 %	Placas de petri Análise a cada 24 h por 3 dias	30 °C	Formação de colônias
		5 %			
		10 %			
		12 %*			

Tabela 3 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à tolerância ao etanol.

Fonte: ¹Methner *et al.* (2019), ²Benítez *et al.* (1983), ³Grijalva-Vallejos *et al.* (2020).

Meios sintéticos também foram utilizados por Benitez *et al.* (1983) e por Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020). Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) compararam o crescimento das cepas isoladas das chichas com o crescimento de cepas comerciais usando o meio GPY (4 % glicose, 0,5 % peptona e 0,5 % extrato de levedura) enriquecido etanol em placas

Petri. Benitez *et al.* (1983) visavam a caracterização de leveduras *Saccharomyces* para a produção de vinho e utilizaram YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) enriquecido com concentrações maiores de etanol, conduzindo os ensaios em duas temperaturas (Tabela 3).

O principal diferencial do trabalho de Benitez *et al.* (1983) foi na análise dos resultados: para cada ensaio, calcularam o tempo de duplicação a partir da densidade óptica medida, caracterizando o crescimento; além disso, separadamente, avaliaram a liberação de gás com tubo de Durham, caracterizando a capacidade fermentativa. Dessa forma, demonstraram que a capacidade fermentativa não está relacionada ao crescimento, uma vez que a influência do etanol foi maior no crescimento do que na capacidade fermentativa. Inclusive, algumas cepas apresentaram alta capacidade fermentativa em condições em que não apresentaram crescimento celular (Benitez *et al.*, 1983), o que sugere que a medida da liberação de CO₂ pode ser um parâmetro mais útil do que a densidade óptica comumente utilizada.

As concentrações de etanol testadas por Methner *et al.* (2019) e Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) incluem os valores comumente encontrados na cerveja, entre 2 e 6% (WOOD, 1998), mas também incluem concentrações de até 10 %, que são menos comuns. Methner *et al.* (2019) destacam que houve uma redução no número de cepas tolerantes conforme a concentração de etanol aumenta: dentre as 110 cepas testadas somente 1 cepa não tolerou 5 % de etanol, enquanto aproximadamente 25 % não toleraram 8 %. Os resultados obtidos evidenciam que o aumento da concentração de etanol resulta na desaceleração do crescimento das leveduras, havendo um limite que, uma vez ultrapassado, pode impedir por completo o crescimento das cepas presentes na solução. Portanto, o uso de concentrações elevadas de etanol, como feito por Benitez *et al.* (1983), que utilizaram apenas concentrações acima de 10 %, é indicado somente se é desejável obter cepas que serão submetidas a estas condições, uma vez que tende a reduzir a variedade e quantidade de cepas selecionadas.

Benitez *et al.* (1983) também observou que as cepas utilizadas apresentaram uma maior tolerância ao etanol em temperaturas menores, apresentando crescimento até a concentração de 18 % a 22 °C, enquanto o crescimento parava completamente na concentração de 15 % a 37 °C. Este resultado é esperado uma vez que o aumento da temperatura também causa o aumento da fluidez da membrana, de modo que o acúmulo de estressores ambientais acarreta um número reduzido de cepas selecionadas. Por um lado, é importante que sejam avaliados os efeitos dos fatores limitantes para o crescimento das leveduras em conjunto, mas, por outro lado, deve-se mimetizar as condições da produção da cerveja. Portanto, é interessante que o ensaio de tolerância ao etanol seja realizado em mosto cervejeiro contendo lúpulo, mas, em temperaturas menores do que as utilizadas por Methner *et al.* (2019) e Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020), e mais próximas das temperaturas comumente utilizadas. É possível que a porcentagem das cepas avaliadas por Methner *et*

al. (2019) e Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) que toleram etanol a 8% e 10 % fosse maior se os experimentos tivessem sido realizados a 20 °C, por exemplo.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a produção de cerveja, a escolha de cepas que melhor se adequem à receita escolhida e, assim, apresente as características desejadas é uma etapa crucial para que a cerveja produzida expresse a qualidade almejada atendendo às expectativas tanto do produtor quanto do consumidor. A escolha dos métodos de seleção e caracterização a serem empregados deve ser cuidadosamente realizada, tendo em mente os principais critérios para que as cepas escolhidas sejam adequadas para a produção da cerveja de interesse, tolerando os estressores presentes durante o processo de produção e sendo capazes de produzir aromas e sabores adequados ao tipo de cerveja.

Outros critérios importantes na escolha da metodologia são o número de cepas a serem avaliadas e as limitações técnicas e orçamentárias. Existe uma grande gama de métodos que podem ser empregados de modo individual ou complementar, dependendo do tipo de produto que se deseja obter e dos recursos disponíveis. Ao aplicar estes métodos, recomenda-se usar temperatura de incubação próxima à temperatura de processo e incluir metodologias que avaliem os aromas e os sabores gerados.

Por conta da diversidade de tipos de cerveja, nenhum dos critérios de caracterização analisados no presente artigo deve ser considerado como excludente na seleção da cepa quando não é definido um tipo específico de cerveja a ser produzida. Por exemplo, cepas que utilizam maltose e maltotriose podem ser usadas para produção de cerveja sem álcool ou para agregar aromas em cerveja com álcool em cofermentação ou fermentação sequencial. Leveduras com baixa tolerância ao lúpulo são raras, mas, ainda poderiam ser usadas para produzir cervejas com baixo valor de IBU. Portanto, é importante definir o tipo de cerveja que se almeja produzir para definir as metodologias a serem empregadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Tecnológica concedida à Marcela Moreira Albuquerque.

REFERÊNCIAS

ALMAGUER, C. *et al.* Humulus lupulus—a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.

ARAÚJO, T. M. *et al.* Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 10, p.1749-1766, 2018.

BARRY, J. *et al.* Two Novel Strains of *Torulaspora delbrueckii* Isolated from the Honey Bee Microbiome and Their Use in Honey Fermentation. **Fermentation**, v.22, p.1-11, 2018.

BASSO, R. F. *et al.* Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.

BELLUT, K. *et al.* Lachancea fermentati strains isolated from kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 764, 2020.

BELLUT, K. *et al.* Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 66, 2018.

BENÍTEZ T. *et al.* Selection of Wine Yeasts for Growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose. **Applied And Environmental Microbiology**, v.45, p.1429-1436, 1983.

BETZ, C. *et al.* Asr1p, a Novel Yeast Ring/PHD Finger Protein, Signals Alcohol Stress to the Nucleus. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p.28174-28181, 2004.

BREWERS ASSOCIATION, 2020 Brewers Association Beer Style Guidelines. 2020. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/>. Acesso em: 25 out. 2020.

CANONICO, L. *et al.* *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food microbiology**, v. 56, p. 45-51, 2016.

CAPECE, A. *et al.* Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation, Potenza**, v.4, p.38-48, 2018.

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 581-597, 2011.

CUBILLOS, F. A. *et al.* Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 383-398, 2019.

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química nova**, v. 23, p. 108-112, 2000.

DELYSER, D.Y.; KASPER, W.J. Hopped Beer: the case for cultivation. **Economic Botany**, v.48, n.2, p. 166-170, 1994.

DING, J. *et al.* Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v.85, n. 2, p. 253-263, 2009.

DURELLO, R. *et al.* Química do Lúpulo. **Química Nova**, v.42, p.900-919, 2019.

EDWARDSON, J.R. Hops: their botany, history, production and utilization. **Economic Botany**, v.6, n.2, p.160-175, 1952.

- ESTELA-ESCALANTE, W. D. *et al.* Evaluation of the fermentative potential of *Candida zemplinina* yeasts for craft beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 3, p. 530-535, 2016.
- GRIJALVA-VALLEJOS, N. *et al.* Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. **International journal of food microbiology**, v. 317, p. 108462, 2020.
- GUTIÉRREZ, A. *et al.* Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 389-402, 2018.
- HOLT, S. *et al.* Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.
- HUNTER, Rebecca A.; DOMPKOWSKI, Eric J. Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 11, p. 2009-2012, 2018
- KALI, A. *et al.* A cost-effective carbohydrate fermentation test for yeast using microtitre plate. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, v.33, p.293-295, 2015.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.10, p. 229-242, 1993.
- LAITILA, A. *et al.* Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 1, p. 9-20, 2007.
- MACPHERSON, S. *et al.* A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 583-604, 2006.
- MACWILLIAM, I. C. Wort composition—A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, n. 1, p. 38-54, 1968.
- METHNER, Y. *et al.* Screening for the brewing ability of different non-*Saccharomyces* yeasts. **Fermentation**, v.5, n.4, p.101, 2019.
- MICHEL, M. *et al.* Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 129-144, 2016.
- MUKHERJEE, V. *et al.* Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology For Biofuels**, v.10, n.1, p. 1-19, 2017.
- NASCIMENTO, I. *et al.* Dynamic Evolution of Bitterness Units in Beer Worts: Modeling and Concerns. **American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 80, n. 1, p. 145-155, 2021.
- OHSUGI, M. *et al.* Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. **Journal Of Traditional Medicines**, v.14, p.186-191, 1997.

OSBURN, K. *et al.* Bio-prospecting, selection, and analysis of wild yeasts for ethanol fermentation. **Zymurgy**, v.39, p.81-88, 2016.

OSBURN, K. *et al.* Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76-84, 2018.

RAVASIO, D. *et al.* Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. **Fermentation**, v. 4, n.1, p.15, 2018.

ROSSO, L. *et al.* Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995.

RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in microbial physiology**, v. 39, p. 205-234, 1997.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, n.2, p.105–124, 2003.

SALLE, A.J. *et al.* Lupulon--An Antibiotic Extracted from the Strobiles of *Humulus lupulus*. **Experimental Biology And Medicine**, v. 70, p. 409-411, 1949.

SANNINO, C. *et al.* Non-conventional Yeasts for producing alternative beers. In: **Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application**, p. 361-388, 2019.

SIBIRNY, A. A.; SCHEFFERS, L. Thematic section "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts". **FEMS Yeast Res**, v. 2, n. 293, p. 1567-1364.2002.

SNIEGOWSKI, P. D. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS yeast research**, v. 1, n. 4, p. 299-306, 2002.

SRINIVASAN, V. *et al.* Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. **Economic Botany**, v.58, p.230-238, 2004.

SWAN, T. M.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **Fems Microbiology Letters**, v. 169, p.191-197, 1998.

VIANNA, C.R.; SILVA, C. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p. 205-217, 2007.

WOOD, B. J. **Microbiology of Fermented Foods**. 2 edição. Thomas Science, 1998.

YOU, K. M. *et al.* Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1499-1503, 2003.

ZASTROW, C. R. *et al.* Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, v.27, n.1, p.34-38, 2001.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Alicina 75, 83

Amarelão 92, 93

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F.Macbr 92, 94, 95

Atrovimicina 75, 83

C

Calliphoridae 38, 39, 40, 43, 45, 47, 48, 49

Culicoides 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Cunninghamella elegans 66, 67, 68, 69, 70, 71

E

Entomologia forense 38, 39, 40, 47

F

Fungos 57, 67, 70, 96

I

Infecções bacterianas 32

Infecções odontogênicas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17

K

Klebsiella pneumoniae 15, 20, 21, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37

L

Larvas e pupas 38, 40, 45, 47

Leveduras não-convencionais 51, 52

Lúpulo 51, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63

M

Maltose 51, 53, 54, 55, 56, 58, 62

Maruins 1, 6

Microbiota do solo 92, 96, 100

Mosca-varejeira 39

Mycobacterium tuberculosis 75, 76, 80, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90

P

Patogenicidade 21, 22, 25, 36

Pneumonias 20, 29

Produção de cerveja 50, 51, 52, 54, 56, 57, 58, 62

Produção de etanol 50, 59

R

Resistência antimicrobiana 24

Rizobactérias 92, 93, 94, 96, 97, 98

S

Staphylococcus 9, 11, 12, 13, 15, 16, 27

Streptococcus 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16

T

Tensão superficial 67, 69, 70, 71

Tensoativo 67

U

Uso racional de fármacos 9, 16

V

Viabilidade pupal 39, 44, 46



MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

The background of the cover is a vibrant blue with a bokeh effect of various microscopic organisms. In the upper center, there is a large, detailed illustration of a microorganism with a curved, textured body and a long, thin, wavy tail. Surrounding it are several circular, textured structures that resemble spores or cells, some with distinct internal patterns. The overall aesthetic is scientific and modern.

MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 