

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Bruna Inez Carvalho de Figueiredo

**Cruzamentos entre leveduras da fermentação da  
cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial  
para produção de cervejas**

Dissertação de Mestrado

Ouro Preto

2016

PPGBIOTEC  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Bruna Inez Carvalho de Figueiredo

**Cruzamentos entre leveduras da fermentação da  
cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial  
para produção de cervejas**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGELIO LOPES BRANDÃO

COORIENTADORA: DR<sup>a</sup> MARGARETE ALICE FONTES SARAIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Industrial.

Ouro Preto,  
Março de 2016

F475c

Figueiredo, Bruna Inez Carvalho de.

Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes [manuscrito]: potencial para produção de cervejas / Bruna Inez Carvalho de Figueiredo. - 2016.

xii, 49f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.

Coorientadora: Profa. Dra. Margarete Alice Fontes Saraiva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Cerveja. 3. Ciclo de vida do produto. I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Saraiva, Margarete Alice Fontes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 663.45

**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

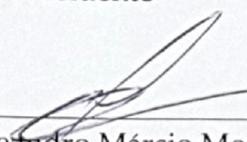
**“Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas”**

Aos quatro dias do mês de março de 2016, às 13h30min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Bruna Inez Carvalho de Figueiredo**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão  
Presidente

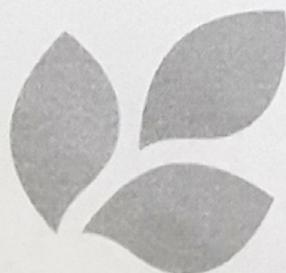


Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira  
Examinador (UFOP)



Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli  
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 04/03/2016



## **Agradecimentos**

Agradeço à UFOP pelo ensino de qualidade e pela oportunidade.

Às agências de fomento CNPQ, Capes e Fapemig pelo suporte.

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão pela oportunidade concedida e a confiança em mim depositada para o desenvolvimento do trabalho. Inspirados em seu trabalho e atitudes, seguimos seus exemplos.

À minha coorientadora Margarete, pelo apoio constante, pelos ensinamentos compartilhados, e por sua presença, principalmente nos momentos difíceis.

Ao Professor Ieso, pela ajuda e apoio constantes.

Aos pós docs, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos Thalita, Diogo, Anna Clara e Patrícia, pela amizade e companheirismo. Sem dúvida as horas compartilhadas tornaram a jornada muito mais leve e prazerosa.

À Maria Ana, Aureliano, Ivon e Renata, pela vivência e conhecimentos compartilhados.

Aos demais colegas do Laboratório que dividiram o ambiente de trabalho comigo ao longo desses dois anos, pela boa convivência e trocas de experiências.

À Zezé, pelo bom humor e sabedoria.

À Amanda e Miriam, do Laboratório de Imunoparasitologia, pela disponibilidade.

À Paloma, por ter sido uma excelente IC e por ter cumprido seu papel com excelência.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, William Borges, pela disponibilidade e prontidão em ajudar.

Aos demais professores do PPG-Biotecnologia, pelos ensinamentos.

Aos amigos e familiares que sempre torceram por mim.

À Dinha e Padrinho, por sempre cumprirem papel de pais.

Aos meus irmãos Lipe, Jô, Dó e FÁ, pelo amor incondicional.

Ao Diógenes, por realizar as conexões necessárias entre presente, passado e futuro. Agradeço por fazer parte de tudo e ter escolhido ser o amor da minha vida presente e de todas as outras.

Aos meus amados pais, João e Roseli, por serem exemplos de bondade, honestidade, justiça e integridade. Obrigada pelo apoio e amor incondicionais. Sem vocês, nada seria.

## Resumo

Na fabricação de cervejas estilos Ale ou Lager, são utilizadas leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, respectivamente. As cepas do estilo Lager fermentam em baixas temperaturas, produzem menores concentrações de compostos responsáveis por aroma e são consideradas de baixa fermentação, por flocularem. As cepas do estilo Ale fermentam a temperaturas mais elevadas, produzem altas concentrações de alcoóis superiores e ésteres e são consideradas de alta fermentação. O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de esporulação, a característica reprodutiva, assim como a aplicação de técnicas de cruzamentos entre leveduras isoladas de dornas de fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes com potencial para produção de cerveja. Das 128 cepas de leveduras caracterizadas quanto à frequência e eficiência da esporulação, 121 leveduras (95%) apresentaram esporulação acima de 50%, sendo que quatorze não foram capazes de esporular. Vinte e quatro cepas apresentaram viabilidade de esporos acima de 91% e sete cepas não apresentaram viabilidade dos esporos. Apenas, três cepas de leveduras foram classificadas como heterotáticas: LBCM1073, LBCM1078 e LBCM1115. A partir dos resultados apresentados e de outros resultados do nosso grupo de pesquisa, como a caracterização da produção de compostos responsáveis pelo aroma, capacidade de fermentação de açúcares e de floculação, duas cepas foram selecionadas para cruzamentos. A cepa LBCM1078 apresenta capacidade de fermentação de maltose e alta produção de compostos responsáveis por aroma, enquanto a cepa LBCM1092 apresenta uma floculação constitutiva. A partir das duas técnicas de cruzamento desenvolvidas, entre células haplóides e entre células diplóides, 21 e 33 híbridos foram obtidos, respectivamente. Os híbridos foram avaliados quanto à capacidade de fermentação de maltose e a capacidade de floculação, sendo selecionadas três novas cepas para futuros experimentos de fermentação em condições similares à produção de cerveja.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, esporulação, ciclo de vida, cruzamentos, cerveja.

## Abstract

Ale and Lager yeast strains are used in brewing industry and belongs to *S. cerevisiae* and *S. pastorianus* species, respectively. Lager yeast is adapted to low-temperature fermentation, produces low concentration of compounds responsible for flavor and due to its flocculation profile it is considered “bottom fermenting”. Ale yeast is adapted to fermentation in higher temperatures, produces high concentrations of higher alcohols and esters and it is considered “top fermenting”. The aim of this study was to investigate sporulation capacity, reproductive characteristics, as well as application of breeding techniques between yeasts isolated from *cachaça* production to obtain new strains with potential for brewing. We characterized the ability, efficiency and frequency of sporulation in 128 yeast strains. One hundred twenty-one strains (95%) presented sporulation efficiency above 50%, and fourteen were unable to sporulate. Twenty four strains showed spore viability above 91% and seven isolates did not present spore viability. Only three yeast strains were classified as heterothallic: LBCM1073, LBCM1078 and LBCM1115. These results, associated with other results from our research group, as characterization of flavor compounds production (responsible for aroma profile), maltose fermentation ability and flocculation phenotypes, allowed us to select two strains for breeding. LBCM1078 strain shows maltose fermentation ability and high production of flavor compounds, while LBCM1092 strain presents a constitutive flocculation. Two different types of breeding techniques were developed, between haploid and diploid cells, and we obtained 21 and 33 hybrids, respectively. These hybrids were evaluated for maltose fermentation and flocculating ability. Three new strains were selected for further experiments in similar brewing conditions.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, sporulation, life cycle, breeding, beer.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Etapas da produção de cerveja. Na etapa da maltagem ocorre a maceração, germinação e secagem dos grãos. A brassagem envolve filtragem, fervura e lupulagem. Na fermentação, as leveduras metabolizam açúcares formando etanol, gás carbônico e compostos secundários. Depois, a cerveja é submetida à maturação, filtração e envase (Saerens *et al.*, 2010)..... 4
- Figura 2:** Via metabólica da formação de álcoois superiores e seus ésteres de acetato em *S. cerevisiae*. A formação dos álcoois superiores é precedida por reações de redução e descarboxilação de um  $\alpha$ -cetoácido, que pode ser proveniente do metabolismo de aminoácidos ou de carboidratos (Pires *et al.*, 2014, Takagi *et al.*, 2015)..... 5
- Figura 3:** Reações químicas envolvidas na biossíntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia média em *S. cerevisiae* (Pires *et al.*, 2014). Ésteres de ácidos graxos de cadeia média são formados a partir da transferência do grupo acetil, proveniente do acetil-CoA, para o etanol (Kobayashi *et al.*, 2008, Ravasio *et al.*, 2014)..... 6
- Figura 4:** Ciclos de vida em *S. cerevisiae*. As cepas de leveduras podem ser classificadas quanto ao ciclo reprodutivo. O heterotalismo é caracterizado pela estabilidade do mating type dos esporos sendo incapazes de auto-diploidizar. O homotalismo é a capacidade das células em realizar a troca do *mating type* originando células filhas com MAT oposto das células mãe, sendo capazes de realizar auto diploidização. .... 10
- Figura 5:** Processo de recombinação da *HMRa/HMLa* no cromossomo III de leveduras *S. cerevisiae* homotáticas. Durante a divisão celular a célula homotática troca o *mating type* por recombinação homóloga após quebra da dupla fita de DNA em sítio específico por ação da endonuclease HO. O alelo *MAT* é substituído por uma cópia silenciada *HMLa* ou *HMLa* (Haber, 2012). .... 11
- Figura 6:** Formação dos flocos celulares em leveduras. A agregação das células ocorre pela ligação das floculinas (glicoproteínas) a sítios específicos das alfa mananas ambas presentes na parede celular das leveduras (Verstrepen *et al.*, 2003a)..... 15
- Figura 7:** Valores da frequência, eficiência e viabilidade dos esporos. (A) Porcentagem da frequência; (B) Porcentagem da eficiência; (C) Porcentagem da viabilidade. Os números contidos nas barras correspondem aos isolados, por ex.: LBCM1078= 78, LBCM1092= 92, etc..... 28
- Figura 8:** PCR *mating type* de leveduras. (A) Análise do ciclo reprodutivo); (B) Confirmação das parentais e híbridos do cruzamento entre leveduras haplóides; (C) Confirmação das parentais e híbridos do cruzamento entre leveduras diplóides. .... 31
- Figura 9:** Análise da ploidia verificada por citometria de fluxo. (A) Cepa LBCM1078. (B) Cepa LBCM1092. Cepas experimentais em vermelho e cepa controle diploide laboratorial S288C a / $\alpha$  em azul. .... 34

**Figura 10:** Compostos voláteis quantificados por cromatografia gasosa. Perfil de compostos voláteis formados a partir da fermentação da cepa LBCM1078 e seus segregantes..... 35

**Figura 11:** Análise de ploidia verificada por citometria de fluxo. (A) Segregante 78-2b. (B) Segregante 92-16F. Cepas experimentais em vermelho e cepa controle haploide laboratorial S288C  $\alpha$  em azul. .... 36

## **Lista de Tabelas**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Sequências dos primers utilizados neste trabalho.....   | 23 |
| <b>Tabela 2:</b> Condições cromatográficas da análise de compostos voláteis por CG-DIC. ....                   | 26 |
| <b>Tabela 3:</b> Capacidade de floculação das leveduras parentais e das cepas resultantes dos cruzamentos..... | 37 |
| <b>Tabela 4:</b> Caracterização das cepas de leveduras utilizadas no estudo.....                               | 48 |

## **Lista de abreviaturas**

**a.C.:** Antes de Cristo

**AGCM:** Ácidos graxos de cadeia média

**CO<sub>2</sub>:** Gás carbônico

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**LBCM:** Laboratório de Biologia Celular e Molecular

**PCR:** Reação em cadeia polimerase

**PSMs:** Membranas Pró-esporos

**SPBs:** Corpo polar do fuso ou *Spindle Pole Bodies*

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| Resumo .....  | v         |
| Abstract .....  | vi        |
| Lista de Figuras .....  | vii       |
| Lista de abreviaturas .....   | x         |
| Índice .....  | xi        |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Produção de cerveja .....  | 2         |
| 1.2. Estilos de cervejas e leveduras .....  | 6         |
| 1.3. Esporulação e ciclo reprodutivo de leveduras .....   | 8         |
| 1.4. Estratégias para obtenção de cepas melhoradas para produção de cerveja .....                           | 12        |
| 1.5. Floculação em leveduras .....  | 14        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>18</b> |
| 2.2. Objetivo geral .....   | 18        |
| 2.3. Objetivos específicos .....  | 18        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1. Micro-organismos e construções utilizadas nos experimentos .....                                       | 19        |
| 3.2. Meios de cultura .....   | 19        |
| 3.2.1. Meio YP .....  | 19        |
| 3.2.2. Meio YP 250 .....  | 19        |
| 3.2.3. Meio acetato de potássio para esporulação .....  | 19        |
| 3.2.4. Meio para dissecação de tétrades em micromanipulador .....   | 19        |
| 3.3. Procedimentos básicos de biologia molecular .....  | 20        |
| 3.4. Condições de esporulação .....   | 20        |
| 3.5. Análise das tétrades e da viabilidade dos esporos .....  | 20        |
| 3.6. Caracterização do ciclo reprodutivo das leveduras .....  | 21        |
| 3.7. Determinação da ploidia por citometria de fluxo .....  | 21        |
| 3.8. Deleção do Gene HO em <i>S. cerevisiae</i> LBCM1092 .....  | 22        |
| 3.9. Troca do mating type das leveduras .....   | 23        |
| 3.10. Condições dos cruzamentos entre as cepas de leveduras .....   | 24        |
| 3.11. Análise qualitativa e quantitativa da floculação .....  | 24        |
| 3.12. Fermentação em presença de maltose .....  | 25        |
| 3.13. Fermentação em escala laboratorial .....  | 25        |
| 3.14. Análise dos principais compostos voláteis formados durante a fermentação em escala laboratorial ..... | 25        |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....   | 27 |
| <b>4.1. Esporulação, viabilidade dos esporos e análise do ciclo reprodutivo</b> .....                         | 27 |
| <b>4.2. Seleção das cepas parentais para o cruzamento</b> .....   | 32 |
| <b>4.2.1. Seleção de cepas parentais haploides</b> .....  | 34 |
| <b>4.2.2. Seleção de cepas parentais diploides</b> .....  | 37 |
| <b>4.3. Desenvolvimento das técnicas de cruzamento entre células de leveduras haploides e diploides</b> ..... | 38 |
| <b>6. PERSPECTIVAS</b> .....  | 41 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 42 |
| <b>ANEXO 1- Tabela 4: Caracterização das cepas de leveduras utilizadas no estudo</b> .....                    | 48 |

## 1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das mais antigas bebidas alcoólicas consumidas pelo homem (Imure and Sato, 2013). A evidência de sua produção na antiguidade é uma tábua Suméria datada de 6000 anos a.C. (Morado, 2009). Nela, estava descrito o modo de preparo do “*beer bread*”, obtido por meio da mistura da farinha da cevada e água (Nelson, 2014). Esse método foi posteriormente aprimorado pela agregação das técnicas de fermentação provenientes da produção do vinho (Morado, 2009).

Inicialmente, a produção de cerveja era uma atividade caseira realizada pelas mulheres, tendo papel relevante na alimentação, sendo consumida por todos os membros da família, incluindo crianças (Oliver, 2012). Nos períodos de peste, foi de fundamental importância, sendo utilizada como alternativa para a água. Além disso, parte do que era produzido, era vendido ou trocado por outros produtos, representando um relevante papel na economia familiar (Morado, 2009, Oliver, 2012).

No século VI, a cerveja passou a ser fabricada nos mosteiros europeus, com a finalidade de alimentar os monges durante os períodos de jejum dos alimentos sólidos. Dessa forma, além de aprimorar o processo produtivo, os monges foram responsáveis pela introdução do lúpulo em sua formulação, agregando à cerveja o gosto amargo e conferindo ação conservante natural à bebida (Morado, 2009).

Em 1516, surgiu na Alemanha a *Reinheitsgebot*, ou Lei da Pureza, que estabeleceu os ingredientes que poderiam ser utilizados na produção da cerveja: malte, lúpulo e água. As leveduras não foram citadas uma vez que, naquele período, não se tinha o conhecimento da existência das mesmas (Morado, 2009).

A Lei da Pureza visou a destinação do uso do trigo à produção de pães, uma vez que havia carência de trigo naquela época, provocando aumento demasiado do seu preço, o qual era repassado para o pão. Além disso, acabou contribuindo para a padronização dos componentes utilizados para a produção da cerveja e, conseqüentemente, melhor qualidade do produto final (Morado, 2009).

No âmbito nacional, a cerveja foi trazida para o Brasil através da Companhia das Índias, vinda para o Brasil em 1630. Com a saída dos holandeses das terras brasileiras em

1654, caiu no esquecimento por aproximadamente 150 anos, sendo reintroduzida apenas com a vinda de D. João VI, no Século XIX (Morado, 2009).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, superado apenas pela China e os Estados Unidos. De acordo com dados do The Barth Report, em 2014, cervejarias brasileiras produziram mais de 140 milhões de litros de cerveja (Barth *et al.*, 2015).

A busca por cervejas de alto padrão de qualidade e características exclusivas e diferenciadas vem aumentando nos últimos anos. Nesse contexto, as cervejas artesanais vêm ganhando destaque, pois oferecem cervejas personalizadas com alto padrão de qualidade (Morado, 2009). Portanto, estratégias para melhorar a produção e as características sensoriais tornaram prioridade para a indústria cervejeira no Brasil.

### **1.1. Produção de cerveja**

O processo de produção da cerveja envolve as etapas de maltagem, brassagem, fermentação, maturação e envase (Figura 1). A maltagem é a etapa responsável pela ativação das enzimas presentes nos grãos da cevada, as quais são responsáveis pela quebra parcial do amido e das proteínas, sendo constituída de três processos: maceração, germinação e secagem (Morado, 2009).

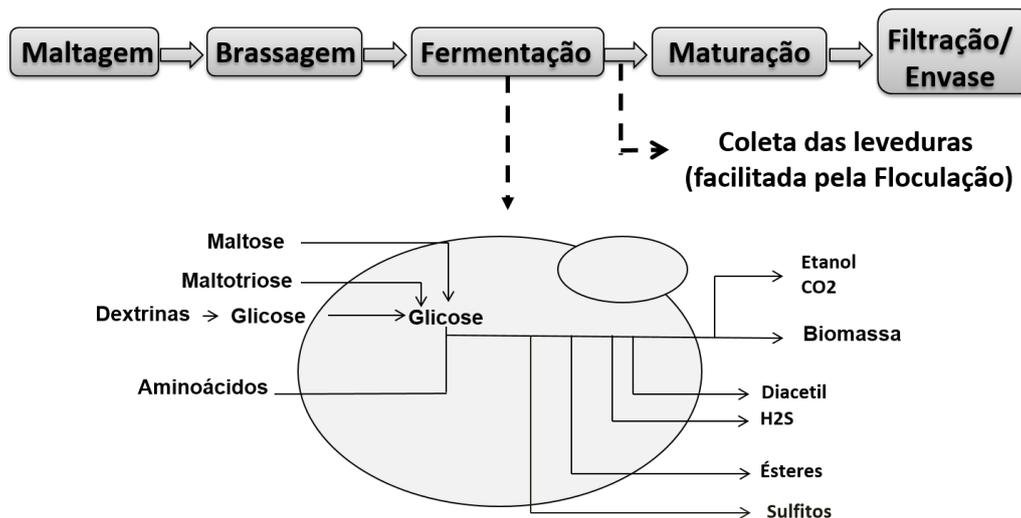
Os grãos maltados são submetidos à brassagem que envolve sacarificação, filtragem, fervura e lupulagem. Na sacarificação, os grãos são moídos, ficando expostos à ação das proteases, amilases e peptidases. Os açúcares resultantes da hidrólise do amido deverão ser fermentados, posteriormente, pelas leveduras (Morado, 2009). Após a filtração, é realizada a fervura, com a finalidade de inativar as enzimas dos cereais, além de reduzir a possível contaminação microbiana (Morado, 2009). Nessa etapa, o lúpulo é adicionado e a liberação de seus compostos ativos é favorecida pelo aumento da temperatura do mosto (Morado, 2009). Após resfriado, o mosto está pronto para o inóculo das leveduras e o início da fermentação.

A fermentação é o processo do metabolismo dos açúcares presentes no mosto pela ação das leveduras, formando gás carbônico, etanol e compostos secundários (Morado, 2009; Oliver, 2012). Os açúcares fermentáveis, glicose, maltose e maltotriose, são transportados para o interior da célula da levedura através da membrana, por

transportadores específicos (Morado, 2009). A fermentação termina quando cessa o consumo de açúcares pelas leveduras. A esse processo dá-se o nome de atenuação, cujo tempo pode variar conforme a cepa de levedura utilizada, o conteúdo inicial de açúcares no mosto e a temperatura de fermentação (Morado, 2009).

Ao final da fermentação, o produto obtido é chamado cerveja verde. Na próxima etapa, denominada maturação, a temperatura do tanque de fermentação deve ser reduzida, dando início a um conjunto de reações físico-químicas que contribuirão para melhorar o aspecto, o sabor e o aroma da cerveja. É durante a maturação que as leveduras irão reabsorver o diacetil, uma substância altamente indesejável por conferir à cerveja sabor de manteiga. O diacetil ou 2-3-butanodiona é uma dicetona vicinal formada durante a biossíntese de valina, na fermentação principal. A conversão de diacetil em acetoína e, posteriormente, em 2-3-butanodiol, compostos de menor percepção sensorial, é o passo limitante da maturação (Morado, 2009).

A baixa temperatura da maturação favorece a precipitação das leveduras que podem ser removidas no processo de filtração. Algumas cervejas, como as de trigo, não são filtradas, mantendo as leveduras até o envase. Isso também ocorre nos casos em que a cerveja sofre carbonatação após o envase, sendo adicionado açúcar, geralmente sacarose, para que as leveduras presentes produzam dióxido de carbono. Além de carbonatar a cerveja, esse processo também favorece o aumento do teor alcoólico e o perfil aromático da cerveja. Em grandes cervejarias, a carbonatação é realizada pela injeção de gás carbônico na cerveja logo após a filtração (Morado, 2009).



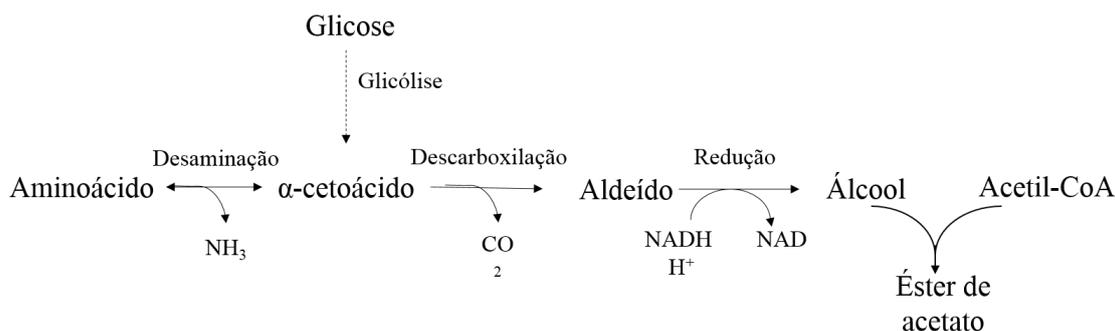
**Figura 1: Etapas da produção de cerveja.** Na etapa da maltagem ocorre a maceração, germinação e secagem dos grãos. A brassagem envolve filtragem, fervura e lupulagem. Na fermentação, as leveduras metabolizam açúcares formando etanol, gás carbônico e compostos secundários. Depois, a cerveja é submetida à maturação, filtração e envase (Saerens *et al.*, 2010).

A qualidade da cerveja está diretamente relacionada com a etapa da fermentação (Morado, 2009; Kobayashi *et al.*, 2008). A produção de concentrações equilibradas de compostos secundários desejáveis, como os alcoóis superiores e seus ésteres, e as baixas concentrações de compostos indesejáveis, como o diacetil, o sulfeto de hidrogênio e o dimetil sulfeto, influenciam diretamente no sabor e aroma, contribuindo para a obtenção de um produto final de qualidade (Morado, 2009; Kobayashi *et al.*, 2008; Mouret *et al.*, 2015).

O acetaldeído é um dos principais compostos carbonílicos produzidos durante a fermentação alcoólica (Pan *et al.*, 2011). No citoplasma, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído e CO<sub>2</sub>. Em seguida, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. Por outro lado, o piruvato também pode ser convertido em ácido acético e, posteriormente, a acetylCoA (Piškur and Compagno, 2014). Geralmente, altas concentrações de acetaldeído em cervejas estão associadas com aroma de maçãs verdes ou grama recém cortada e a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é uma das enzimas chave em seu metabolismo. Parte do acetaldeído produzido durante a fermentação é metabolizado pelas leveduras durante a maturação da cerveja (Shen *et al.*, 2014).

As leveduras são capazes de produzir compostos que influenciam no aroma, como alcoóis superiores e ésteres. Esses alcoóis podem ser formados por duas vias distintas:

uma anabólica e outra catabólica. Na via catabólica de Ehrlich, aminoácidos sofrem uma transaminação, com transferência do grupamento amino para os  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes. Em seguida, o  $\alpha$ -cetoácido sofre uma reação irreversível, sendo descarboxilado ao seu respectivo aldeído. Na última etapa da via, em uma reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase ou pela enzima formaldeído desidrogenase, os aldeídos são convertidos aos respectivos alcoóis (Figura 2)(Pires *et al.*, 2014).



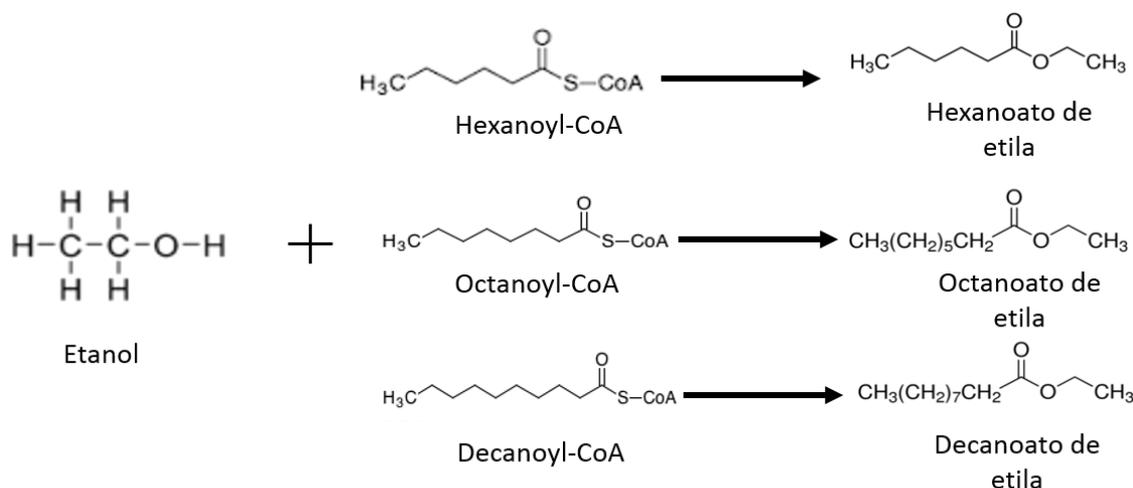
**Figura 2: Vias metabólicas da formação de alcoóis superiores e seus ésteres de acetato em *S. cerevisiae*.** A formação dos alcoóis superiores é precedida por reações de redução e descarboxilação de um  $\alpha$ -cetoácido, que pode ser proveniente do metabolismo de aminoácidos ou de carboidratos (Pires *et al.*, 2014; Takagi *et al.*, 2015).

Os alcoóis superiores também podem ser formados a partir de  $\alpha$ -cetoácidos provenientes da biossíntese *de novo* de aminoácidos, a partir de carboidratos. Essa é a via anabólica de produção de alcoóis superiores por *S. cerevisiae* (Figura2) (Pires *et al.*, 2014). Os alcoóis superiores mais importantes na composição do aroma de bebidas fermentadas são: álcool amílico, isoamílico, propílico, isobutílico e o 2-fenil-etanol, sendo esse último, um álcool aromático (Saerens *et al.*, 2008).

Além de contribuírem para o aroma da cerveja, os alcoóis superiores são precursores dos ésteres de acetato, cujos mais importantes são acetato de etila (aroma de solvente), acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de isobutila (aroma frutado) e acetato de fenil etila (aroma de rosas e mel). A síntese desses ésteres acontece no citoplasma celular, mas, por sua natureza lipofílica, eles difundem facilmente para o meio externo (Pires *et al.*, 2014).

Os ésteres de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) pertencem a outra classe de subprodutos da fermentação (Figura 3). Apesar de serem produzidos em menores quantidades que os ésteres de acetato, os ésteres de AGCM, como o hexanoato de etila,

octanoato de etila e decanoato de etila contribuem para a qualidade de cervejas por conferir aroma de maçã ou frutado (Kobayashi *et al.*, 2008; Ravasio *et al.*, 2014).



**Figura 3: Reações químicas envolvidas na biossíntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia média em *S. cerevisiae* (Pires *et al.*, 2014).** Ésteres de ácidos graxos de cadeia média são formados a partir da transferência do grupo acetil, proveniente do acetil-CoA, para o etanol (Kobayashi *et al.*, 2008; Ravasio *et al.*, 2014).

## 1.2. Estilos de cervejas e leveduras

A cerveja, assim como outros produtos fermentados, é resultante de um processo metabólico microbiano. Essa atividade está diretamente ligada a cada etapa da produção, contribuindo para a definição de diversas características sensoriais, como a produção de compostos responsáveis por aroma. A fermentação dos cereais pode ser ocasionada por diversos tipos de microorganismos, sendo as cepas da espécie *S. cerevisiae*, as mais utilizadas e difundidas na indústria cervejeira. Essa diversidade de microorganismos contribui para a vasta complexidade do processo e variedade de características atribuídas ao produto final (Bokulich and Bamforth, 2013).

Tradicionalmente, as cervejas podem ser classificadas em três estilos: Lambic, Ale e Lager. As cervejas Lambic são fermentadas de forma espontânea por diferentes espécies de bactérias e leveduras, naturalmente presentes no ambiente e nos utensílios utilizados em sua produção. As cervejas estilos Ale e Lager, são assim denominadas, devido à espécie de levedura utilizada em sua fabricação: leveduras Ale ou Lager. As cervejas Ale, em sua maioria, são fermentadas por *S. cerevisiae* (cepas Ale) em temperaturas que variam entre 16 e 25°C, sendo também classificadas como de alta

fermentação, uma vez que as leveduras tendem a permanecer na superfície do mosto durante o processo fermentativo, decantando ao final do mesmo (Bokulich and Bamforth, 2013; Sanchez *et al.*, 2012). Além disso, as leveduras do estilo Ale são conhecidas por produzirem uma alta concentração de compostos voláteis, conferindo à cerveja aroma frutado e floral (Gibson and Liti, 2015). As cervejas Lager são fermentadas por *S. pastorianus* (cepas Lager), e fermentam em temperaturas entre 8 a 15°C. Essas leveduras são conhecidas como de baixa fermentação, pois tendem a flocular e, conseqüentemente, se depositar no fundo das dornas de fermentação (Mertens *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2012).

Apesar de serem amplamente consumidas, as cervejas Lager possuem uma origem muito mais recente quando comparadas às cervejas Ale. A produção das cervejas Lager iniciou-se apenas no século XVI. Nessa época, provavelmente em ambiente de produção de cerveja, houve o cruzamento entre as espécies *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, originando a espécie *S. pastorianus*, um híbrido alotetraploide (Bokulich and Bamforth, 2013; Mertens *et al.*, 2015; Libkind *et al.*, 2011).

Acredita-se que *S. eubayanus* seja proveniente da Patagônia, e foi levada para Europa, a bordo de navios, sendo responsável pela porção “não-*cerevisiae*” da espécie *S. pastorianus* (Bokulich and Bamforth, 2013; Libkind *et al.*, 2011). Dessa maneira, o híbrido gerado apresentou vantagens em relação às cepas parentais. Dentre as vantagens podemos citar a fermentação dos açúcares maltose e maltotriose, provenientes da espécie *S. cerevisiae* (Gibson and Liti, 2015) e a capacidade de fermentação em baixas temperaturas, herança da *S. eubayanus*, permitindo produção de cerveja nos meses frios do ano (Morado, 2009; Libkind *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrada a presença de isolados de *S. eubayanus* em diversas áreas da China. Análises filogenéticas indicaram que esses isolados pertencem a subpopulações distintas daquelas provenientes da Patagônia e com maior grau de similaridade quando comparado à porção “não-*cerevisiae*” de *S. pastorianus*. Esses dados sugerem que essa espécie pode ter origem asiática (Gibson and Liti, 2015).

A espécie *S. pastorianus* possui duas linhagens, conhecidas como Saaz e Froberg, as quais diferem quanto às seqüência do genoma e níveis de ploidia. Essas duas linhagens de cepas foram isoladas no final do século XIX por Paul Lindner e inicialmente

utilizadas nas regiões da Bohemia e Alemanha (Gibson and Liti, 2015). A linhagem denominada Saaz, referenciada como grupo 1, foi amplamente utilizada na República Checa e na cervejaria Carlsberg, na Dinamarca. A linhagem Frohberg (grupo 2), foi utilizada na Holanda e Dinamarca (Gibson and Liti, 2015).

Apesar dos dois grupos apresentarem características tecnológicas de cerveja Lager, com processo de fermentação a baixas temperaturas e no fundo das dornas, resultante da floculação das leveduras, elas possuem algumas diferenças pontuais entre si. O grupo das cepas Saaz é considerado mais floculante, porém não possui capacidade de utilizar todo o açúcar presente no mosto, especificamente a maltotriose. Além disso, as cepas Saaz crescem melhor em temperaturas mais baixas quando comparadas às cepas Frohberg (Gibson *et al.*, 2013; Gibson and Liti, 2015). As cepas Frohberg são menos floculantes, apresentam melhor desempenho fermentativo e produzem maior quantidade de alcoóis superiores e ésteres. Ambas as linhagens apresentam capacidade de fermentar melbiose, mas é comum as leveduras Frohberg fermentarem maltotriose (Gibson and Liti, 2015).

Mesmo que as linhagens Saaz e Frohberg sejam originárias de um evento de hibridização entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, as mesmas apresentam diferenças genômicas que explicam seus diferentes desempenhos fermentativos. As cepas Frohberg apresentam características genômicas de *S. cerevisiae* e, por outro lado, no genoma de cepas da linhagem Saaz é possível notar a perda considerável de porções do DNA da cepa parental *S. cerevisiae*, por isso essas células possuem mais características da parental *S. eubayanus* (Gibson and Liti, 2015).

O sequenciamento do genoma de cepas *S. pastorianus* demonstrou uma larga fração de eventos de recombinação entre os genomas das cepas *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*. Dentre os genes relacionados, podemos citar o gene *Lg-FLO1*, envolvido na floculação, uma das características determinantes das cepas Lager (Gibson and Liti, 2015; Sim *et al.*, 2013).

### **1.3. Esporulação e ciclo reprodutivo de leveduras**

As leveduras da espécie *S. cerevisiae*, em condições adequadas de crescimento, como a presença de concentrações apropriadas de nutrientes, se multiplicam por brotamento antecedido por processo mitótico, dando origem a uma nova geração de

células. No entanto, quando há depleção de nutrientes essenciais, as células diploides (Ezov *et al.*, 2010) sofrem meiose e esporulam (Piekarska *et al.*, 2010).

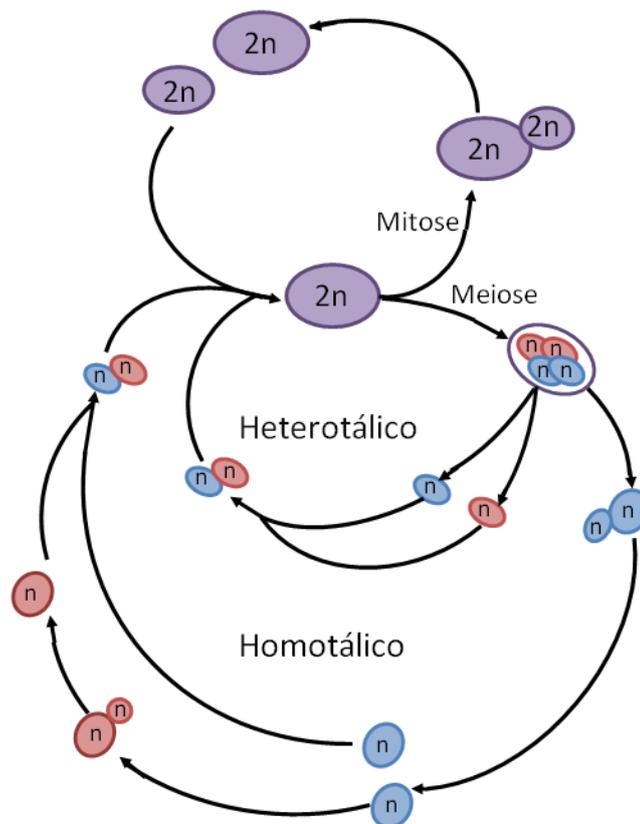
Os ascos são, geralmente, formados por quatro ascósporos originados pelo empacotamento do núcleo após a divisão meiótica, sendo essa divisão celular bastante diferente da utilizada durante o crescimento vegetativo (brotamento) (Neiman, 2005). O processo de esporulação é desencadeado em resposta à baixa disponibilidade de nitrogênio e glicose, e à presença de fontes de carbono não fermentáveis (Neiman, 2005; Taxis *et al.*, 2005). Nesse caso, ocorrem mudanças na expressão de genes envolvidos com a formação de células haploides (Piekarska *et al.*, 2010).

A esporulação envolve dois processos: a meiose e a morfogênese. A meiose está relacionada a duas fases que ocorrem em sequência: meiose S e fase pré-meiótica S. As células sofrem duas divisões nucleares, meiose I e meiose II, resultando na formação de quatro esporos. Os quatro núcleos haploides formados são empacotados por membranas pró-esporos (PSMs). As PSMs sofrem uma expansão na meiose II, sendo que no momento da divisão nuclear, cada membrana envolve o núcleo celular formado, o qual será ancorado via corpo polar do fuso. A maturação ocorre com a formação da parede celular, a qual confere resistência aos esporos que são capazes de sobreviver por longos períodos em condições de estresse. Esse processo é conhecido como morfogênese (Piekarska *et al.*, 2010).

Os esporos podem apresentar *mating type* opostos, Mat a ou Mat  $\alpha$ , determinado por dois diferentes alelos do locus e realizar o ciclo sexuado, originando células diplóides, Mat a/ $\alpha$  (Ezov *et al.*, 2010; Montelone, 2002). O cruzamento entre cepas de leveduras é possível devido à presença dos feromônios sintetizados pelas células. As leveduras Mat a são responsáveis por sintetizar feromônios chamados Fator a, e as leveduras Mat  $\alpha$ , por sintetizar feromônios Fator  $\alpha$ . Esses feromônios possuem receptores específicos, sendo que o Fator a se liga a Ste2p, presente na parede das células vizinhas (Mat  $\alpha$ ) e Fator  $\alpha$  se liga a Ste3p, presente na parede das células Mat a (Ezov *et al.*, 2010; Montelone, 2002).

As leveduras podem ser classificadas quanto ao ciclo reprodutivo em homotáticas ou heterotáticas. O homotalismo é a capacidade das células haploides de trocarem o *mating type*, formando células com *mating type* oposto daquele da célula de origem. Isso ocorre porque espécies homotáticas são capazes de expressar o gene *HO*, que codifica

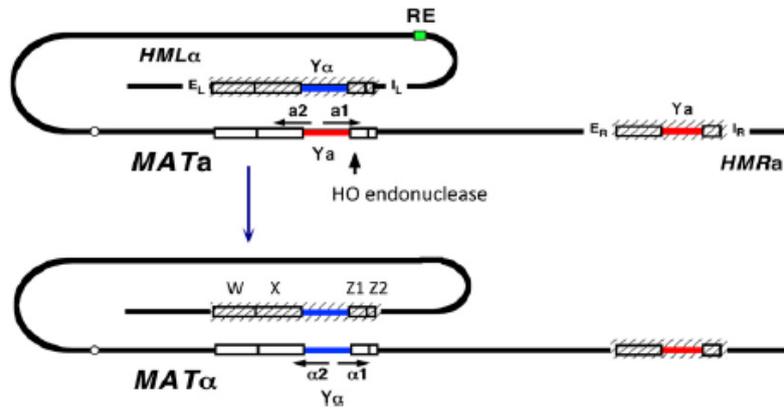
uma endonuclease responsável pela conversão do Mat a para Mat  $\alpha$  ou vice versa. Dessa maneira, as células haploides são capazes de cruzarem entre si e tornarem-se diploides (Figura 5) (Ezov *et al.*, 2010; Haber, 2012). As cepas heterotáticas possuem *mating type* estável e o cruzamento pode ocorrer por meio dos esporos haploides originados de tetrades diferentes ou originados de uma mesma tétrede, mas não são capazes de auto diploidizar (Figura 5) (Ezov *et al.*, 2010).



**Figura 4: Ciclos de vida em *S. cerevisiae*.** As cepas de leveduras podem ser classificadas quanto ao ciclo reprodutivo. O heterotalismo é caracterizado pela estabilidade do *mating type* dos esporos sendo incapazes de auto diploidizar. O homotalismo é a capacidade das células em realizar a troca do *mating type*, originando células filhas com MAT oposto da célula mãe, sendo capazes de realizar auto diploidização.

A troca do *mating type* das células homotáticas ocorre por recombinação homóloga após quebra da dupla fita de DNA em sítio específico, durante a divisão celular (Ezov *et al.*; 2010; Fukuda *et al.*, 2013; Lee and Haber, 2015; Mortimer, 2000). Neste caso, as células haploides sofrem uma conversão de genes, na qual o alelo *MAT* é substituído por uma cópia silenciada, *HMRa* ou *HMLa* (Ezov *et al.*, 2010). Essa

conversão, iniciada pela endonuclease sítio específica HO, ocorre de forma que *Mat a* recombina com *HML $\alpha$*  e *Mat  $\alpha$*  recombina com *HMRa* (Figura 6)(Ezov *et al.*, 2010; Fukuda *et al.*, 2013; Mortimer, 2000; Lee and Haber, 2015).



**Figura 5: Processo de recombinação da *HMRa/HML $\alpha$*  no cromossomo III de leveduras *S. cerevisiae* homotáticas.** Durante a divisão celular, a célula homotática troca o *mating type* por recombinação homóloga após quebra da dupla fita de DNA em sítio específico por ação da endonuclease *HO*. O alelo *MAT* é substituído por uma cópia silenciada *HML $\alpha$*  ou *HMRa* (Haber, 2012).

O *MAT* locus, responsável pelo *mating type* nas cepas de leveduras haploides, se localiza no braço direito do cromossomo III e é dividido em 5 regiões: W,X,Y,Z1 e Z2 (Ezov *et al.*, 2010). Os dois alelos do *mating type*, *Mat a* e *Mat  $\alpha$* , diferem em aproximadamente 700 pb, que contém sequências designadas *Ya* e *Y $\alpha$* , detentoras da maior parte das ORFs para proteínas que regulam o ciclo reprodutivo sexual. Tanto *HMRa* quanto *HML $\alpha$*  funcionam como doadores durante o processo de recombinação (Figura 6) (Lee and Haber, 2015; Haber, 2012).

Acredita-se que a maioria das leveduras *S. cerevisiae* são homotáticas e que o heterotalismo está relacionado ao acúmulo de mutações no gene *HO* e à baixa capacidade de esporulação das cepas de leveduras, interferindo diretamente na renovação do genoma. Uma vez que a evolução está diretamente relacionada com a renovação do genoma, a formação de híbridos e a capacidade de esporulação das cepas favorecem a diversidade e a evolução das espécies (Mortimer, 2000).

#### **1.4. Estratégias para obtenção de cepas melhoradas para produção de cerveja**

Em geral, é improvável isolar uma única cepa de levedura selvagem na natureza ou em ambientes de produção da bebida que apresente todas as características desejáveis para a produção de cerveja. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas para obtenção de cepas melhoradas e que sejam detentoras da maior quantidade de fenótipos desejáveis possíveis (Pérez-Través *et al.*, 2012, Steensels *et al.*, 2014b). A técnica de cruzamento clássico é recomendada, uma vez que organismos geneticamente modificados, para a indústria alimentícia, não são aceitos pela Legislação Brasileira atual (Steensels *et al.*, 2014b).

Um híbrido é usualmente identificado como sendo uma cepa heterozigótica que contém genes característicos das duas espécies. Combinações favoráveis de fenótipos positivos, incluindo melhora da adaptação a determinadas condições, podem ser aumentadas a partir da mistura dos genes de duas ou mais cepas de leveduras (Sipiczki, 2008).

Em estudos realizados por Sipiczki (2008) o desenvolvimento de técnicas de melhoramento de estirpes de leveduras por métodos moleculares permitiu a geração de diversas cepas cujos genomas são provenientes de duas ou mais espécies de cepas de leveduras utilizadas na produção de vinhos. Espécies híbridas podem ser geradas a partir de cruzamentos entre espécies ou interespecies, sendo que, os interespecies são híbridos geralmente construídos em laboratórios, resultando em genomas instáveis, necessitando assim de processos para a estabilização do mesmo (Sipiczki, 2008).

As cepas Lager passaram por eventos de perdas e rearranjo de cromossomos, processos favorecidos pelo tempo e adaptação em ambiente cervejeiro. Até a atualidade, a variedade de cepas Lager é bastante restrita, exibindo uma baixa diversidade em relação aos fenótipos encontrados. Esse fato apresenta grande contraste em relação às cepas disponíveis em outras indústrias de fermentação, como a do vinho (Gibson and Liti, 2015).

Os cruzamentos entre cepas do gênero *Saccharomyces* são possíveis e vem sendo utilizados como alternativa para a geração de cepas industriais melhoradas, objetivando-se obter um produto final diferenciado com alto padrão de qualidade, além de alta

produtividade e resistência das cepas às condições de estresse durante o processo produtivo (Bizaj *et al.*, 2012).

A obtenção de cepas híbridas em laboratório é possível a partir de técnicas como o cruzamento (hibridação sexuada) entre esporos haploides, cepas diploides ou pela fusão dos protoplastos (hibridação assexuada) (Sipiczki, 2008). A introdução de modificações genéticas por meio de técnicas de biologia molecular (deleção ou introdução de genes) para construção de cepas melhoradas é outra estratégia que, embora seja permitida em alguns países, não apresenta uma boa aceitação pelos consumidores (Fernández-González *et al.*, 2014).

A seleção de esporos ou células e a técnica de cruzamento são estratégias bastante usadas pela indústria cervejeira (Sanchez *et al.*, 2012), a fim de obter uma cepa com resistência às condições de estresse fermentativo e produzindo adequadamente compostos responsáveis pelo aroma (Steensels *et al.*, 2014a). No caso de cepas de leveduras, esse aprimoramento pode ser realizado por hibridações: célula-célula; esporo-célula; e esporo-esporo (Steensels *et al.*, 2014b). A aplicabilidade desses métodos depende primordialmente do ciclo reprodutivo e da ploidia das cepas parentais (Steensels *et al.*, 2014b).

Leveduras podem ser haploides, diploides, aneuploides ou poliploides; homotáticas ou heterotáticas; e variar quanto à frequência de esporulação e a viabilidade desses esporos. A baixa frequência da esporulação ou baixa viabilidade de seus esporos são características que dificultam a utilização de algumas cepas para experimentos de hibridação, cruzamentos clássicos (Ezov *et al.*, 2010), sendo necessária nesses casos, a utilização da metodologia de fusão de protoplastos.

As leveduras com perfil de ciclo de vida heterotático são passíveis de serem utilizadas em cruzamentos entre haploides, devido à capacidade de selecionar seus segregantes haploides. A grande vantagem da escolha dessas cepas para o cruzamento seria a possibilidade de escolha dos segregantes portadores de fenótipos de interesse, o que aumenta consideravelmente as chances de se conseguir híbridos com fenótipos superiores. Além disso, as cepas parentais podem ser usadas diversas vezes em sucessivos cruzamentos (Steensels *et al.*, 2014b).

As leveduras com ciclo reprodutivo homotálico não são hábeis em realizar cruzamentos entre haploides, uma vez que seus segregantes não apresentam *mating type* estável, sendo possível realizar cruzamentos apenas após manipulação genética, por deleção do gene *HO* nessas cepas (Steensels *et al.*, 2014b).

Apesar da grande variabilidade genética apresentada por híbridos obtidos, podem ser detectadas perdas no material genético, baixa estabilidade e uma invariabilidade durante futuras utilizações das leveduras na indústria. Para obter cepas estáveis geneticamente e possibilitar seu uso em fermentações comerciais, já existem métodos descritos na literatura que possibilitam verificar a estabilização do DNA e sua confirmação por marcadores (Pérez-Través *et al.*, 2012). Um desses métodos foi baseado em cinco fermentações consecutivas em mosto a temperatura de 20°C e avaliação por meio da análise de diferentes marcadores moleculares, por exemplo, RAPD, que se baseia na amplificação de regiões no DNA. Mudanças ocorridas no DNA total foram analisadas posteriormente (Pérez-Través *et al.*, 2012).

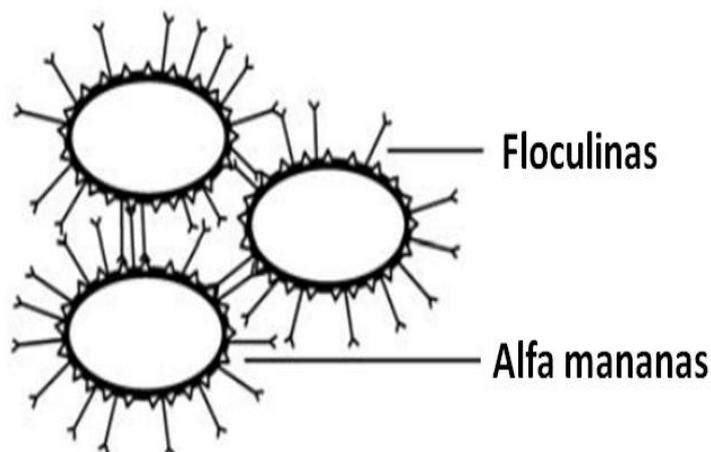
Devido à baixa esporulação e viabilidade dos esporos, os cruzamentos clássicos tendem a ser limitados (Gibson and Liti, 2015). Esporos da cepa *S. pastorianus* podem ser utilizados em cruzamentos com cepas laboratoriais ou cepas Ale, *S. cerevisiae*, com o intuito de melhorar a esporulação e a resistência em relação condições de estresse, incluindo altas temperaturas, tolerância ao etanol e estresse osmótico (Gibson and Liti, 2015).

### **1.5. Floculação em leveduras**

A floculação é a agregação das células com formação de flocos multicelulares capazes de depositar no fundo das dornas de fermentação, sendo um processo que facilita a coleta das leveduras no final da fermentação (Bauer *et al.*, 2010). A floculação é um fenótipo de grande relevância industrial por tornar menos onerosa a remoção da biomassa celular (Bauer *et al.*, 2010; Verstrepen *et al.*, 2003a).

A floculação é um processo complexo que envolve a expressão de genes específicos como *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* e *FLO11*, sendo a sua transcrição relacionada também aos fatores externos como nutrientes presentes no meio, estresse, pH, oxigênio e temperatura. Está diretamente relacionada com a composição ou morfologia das células (Verstrepen *et al.*, 2003a; Goossens and Willaert, 2010). O processo depende da presença

de glicoproteínas específicas chamadas floculinas (Flo1p), nas paredes celulares, as quais se ligam a seus sítios de ligação, as alfa mananas, presentes nas paredes das células vizinhas (Figura 4) (Verstrepen *et al.*, 2003a; Sim *et al.*, 2013; Goossens and Willaert, 2010).



**Figura 6: Formação dos flocos celulares em leveduras.** A agregação das células ocorre pela ligação das floculinas (glicoproteínas) a sítios específicos, alfa mananas, ambas presentes na parede celular das leveduras (Verstrepen *et al.*, 2003a).

As floculinas podem ser divididas em domínio lectina (A), domínio central (B) e C-terminal (C). O domínio C-terminal é responsável por ancorar as proteínas Flo1p à parede celular. O domínio central é uma estrutura longa e rígida, rica em resíduos de serina, treonina e prolina. O domínio lectina reconhece e interage com resíduos de manose, alfa mananas, presentes nas paredes das células vizinhas, sendo assim, a porção responsável pelo fenômeno da floculação (Bauer *et al.*, 2010; Bony *et al.*, 1997; Fichtner *et al.*, 2007).

Quando há a presença de manose no mosto, a mesma ocupa os sítios de ligação das floculinas, impedindo, assim, que ocorra a ligação célula a célula, e, com isso, a floculação. Para algumas cepas de leveduras, a floculação é inibida não apenas pela manose presente no mosto, mas também pela glicose, sacarose e maltose (Verstrepen *et al.*, 2003a; Sim *et al.*, 2013). Esse fenótipo da floculação, New Flo, pode ser encontrado em cepas cervejeiras, enquanto a floculação da maioria das cepas laboratoriais são inibidas pela maltose (fenótipo Flo1p) (Verstrepen *et al.*, 2003a). Outros tipos de

floculação têm sido descritos, sugerindo que algumas cepas de leveduras podem flocular por meio de diferentes mecanismos. Essas leveduras apresentam floculação insensível à adição de manose (Verstrepen *et al.*, 2003a).

O comportamento da floculação é altamente específico, sendo que as características de cada cepa aumentam a complexidade do processo. A expressão dos genes *FLO* ocorre em diferentes níveis, sendo regulados por mecanismos distintos. Por esses fatores, as diferentes cepas de leveduras apresentam perfis de floculação específicos (Bauer *et al.*, 2010; Bony *et al.*, 1997).

Como já mencionado anteriormente, as leveduras cervejeiras podem ser classificadas em dois grupos. As cepas de alta fermentação, ou “top-fermenting”, incapazes de flocular e subindo para o topo das dornas de fermentação. O segundo grupo de leveduras cervejeiras, classificadas como cepas de baixa fermentação ou, “bottom-fermenting”, são aquelas capazes de flocular e depositarem no fundo das dornas de fermentação (Sanchez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Embora, as cepas de leveduras cervejeiras da espécie *S. cerevisiae* (Ale) sejam normalmente consideradas “top-fermenting” e as espécies *S. pastorianus* (Lager) “bottom-fermenting”, recentemente espécies *S. cerevisiae* isoladas de dornas de produção de cachaça demonstraram capacidade de floculação muito superior a uma cepa comercial cervejeira Lager (Alvarez *et al.*, 2014).

Em 2015, Conceição e colaboradores investigaram a diversidade fenotípica de cepas de leveduras integrantes do mesmo conjunto de cepas com as quais trabalharam Alvarez e colaboradores. Essas cepas, isoladas em quatro estados brasileiros, compõem a coleção de leveduras do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM). Dentre as características avaliadas por Conceição e colaboradores estão propriedades necessárias à produção de bioetanol, incluindo capacidade de tolerar altas concentrações de etanol, metanol, resistência ao alumínio e zinco, variações de pH e produção de espuma (da Conceição *et al.*, 2015).

Com o intuito de contribuir para a obtenção de uma maior diversidade de cepas Lager, no presente trabalho, foram caracterizadas 128 cepas de leveduras isoladas de dornas de produção de cachaça, integrantes da coleção LBCM, visando selecionar aquelas com o perfil mais adequado para o desenvolvimento dos cruzamentos. A fim de obter

novas cepas com fenótipos desejáveis, como a floculação e características adequadas à produção de cervejas, alguns critérios para a escolha dessas cepas foram adotados, como a frequência, eficiência e viabilidade dos esporos, além do ciclo reprodutivo destas cepas e características como floculação, metabolização de maltose e produção de compostos voláteis.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.2. Objetivo geral**

Utilizar técnicas de cruzamentos entre leveduras isoladas de dornas de fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes com potencial para produção de cerveja.

### **2.3. Objetivos específicos**

- Analisar a frequência, a eficiência da esporulação e a viabilidade dos esporos das leveduras;
- Caracterizar o tipo de ciclo reprodutivo (homotalismo ou heterotalismo) apresentado pelas cepas de leveduras;
- Obter novas cepas híbridas por meio das técnicas de cruzamentos entre leveduras diploides e entre leveduras haploides;
- Selecionar e avaliar as novas cepas híbridas com fenótipo de interesse para produção de cerveja.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no LBCM do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

#### **3.1. Micro-organismos e construções utilizadas nos experimentos**

As leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas de dornas de fermentação de cachaça de diversas regiões do Brasil. As cepas comerciais *S.pastorianus* var. *Weihenstephan* 34/70, *S.cerevisiae* WB-06 e as cepas laboratoriais *S.cerevisiae* S288c (Mat *a/α*, diplóide), S288c (Mat *a*, haploide), S288c (Mat *α*, haplóide) foram utilizadas como controles. *S.cerevisiae* LBCM1092 Mat *a/αHO::KanMX/HO::hph* (LBCM1092*hoΔ*) foi construída neste estudo. Todas as cepas de leveduras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C em meio YP glicose e 30% (v/v) de glicerol.

#### **3.2. Meios de cultura**

##### **3.2.1. Meio YP**

O meio YP foi utilizado para cultivo de cepas de leveduras sendo composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona de carne 2% (p/v). Como fonte de carbono o meio foi acrescido de 2% (p/v) de glicose ou de 2% (p/v) de maltose. No meio sólido foi adicionado 2% (p/v) de ágar.

##### **3.2.2. Meio YP 250**

O meio YP250 é composto por 0,27% de extrato de levedura (p/v) e 0,54% de peptona (p/v), pH 4.5.

##### **3.2.3. Meio acetato de potássio para esporulação**

O meio para esporulação é composto por acetato de potássio 1% (p/v), bicarbonato de potássio 0,05% (p/v) e ágar 2% (p/v), pH 6.0.

##### **3.2.4. Meio para dissecação de tétrades em micromanipulador**

Para dissecação das tétrades foi utilizado o meio contendo extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona de carne 1% (p/v), glicose 2% (p/v) e ágar 1,5% (p/v).

### **3.3. Procedimentos básicos de biologia molecular**

A extração e purificação de DNA plasmidial em *Escherichia coli* foram realizadas utilizando Plasmid Kit (Geneaid, USA). A integridade do DNA e os produtos de PCRs foram verificados usando eletroforese em gel de agarose a 0,8%, 1,0% ou 1,2%, conforme tamanho dos fragmentos analisados. Reações de PCRs foram realizadas em termociclador T100 ThermalCycler (Bio-Rad), utilizando Master Mix e Taq DNA polimerase (Promega, USA). Primers usados foram sintetizados pela Integrated DNA technology, Inc (Brasil). Os produtos de PCRs foram purificados usando kit Nucleo Spin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.4. Condições de esporulação**

As cepas de leveduras foram pré-cultivadas em 3mL de meio YP glicose a 30°C sob agitação constante a 200 rpm por 24 horas. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 2885g por 3 minutos e lavadas em água destilada estéril gelada por 3 vezes. O *pellet* celular foi ressuspenso em 20 µL de água destilada estéril e inoculado em forma de microgotas em placas contendo o meio para a esporulação. Em seguida, as placas foram incubadas a 22°C por aproximadamente 7 dias, ou até a visualização da formação dos ascos contendo os esporos em microscópio óptico.

### **3.5. Análise das tétrades e da viabilidade dos esporos**

As leveduras que apresentaram formação de esporos foram submetidas à dissecação das tétrades em micromanipulador (MSM System 400, Singer Instruments). Amostras de células foram coletadas da biomassa das microgotas, transferidas para 45 µL de água destilada estéril contendo 5 µL de solução de Liticase (5000 U/mL) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para digestão da parede dos ascos. Uma alíquota de 10 µL dessa suspensão celular foi inoculada em placa contendo meio para micromanipulador e aproximadamente 10 tétrades de cada cepa de levedura foram dissecadas. Após incubação das placas a 30°C, os esporos que formaram colônias visíveis foram considerados viáveis. A viabilidade dos esporos foi determinada dividindo o número de esporos viáveis pelo o número de esporos dissecados (Fernández-González *et al.*, 2015). Para determinação da frequência e eficiência da esporulação foi realizada a contagem do número das células, díades, tríades e tétrades em câmara de Neubauer. A frequência da esporulação foi calculada dividindo o número de ascos (díades, tríades,

tétrades) pelo somatório do número de células mais o número total dos ascos. A eficiência da esporulação foi calculada dividindo o somatório dos ascos (número de tétrades) pelo total de ascos contabilizados (Fernández-González *et al.*, 2015).

### **3.6. Caracterização do ciclo reprodutivo das leveduras**

O ciclo reprodutivo (homotalismo ou heterotalismo) das leveduras foi verificado pelo *mating type* dos esporos de uma mesma tétrade conforme descrito anteriormente (Illuxley *et al.*, 1990). *Mating type* foi determinado por PCR com a combinação de primers complementares ao MAT locus, Mat a e Mat  $\alpha$  (listados na Tabela 1) utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto; 58°C por 2 minutos; 72°C por 1 minuto e temperatura de extensão final de 72°C por 10 minutos.

### **3.7. Determinação da ploidia por citometria de fluxo**

A ploidia das leveduras foi determinada por meio da intensidade da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio intercalados aos ácidos nucléicos, possibilitando quantificar o conteúdo de DNA, analisado por citometria de fluxo conforme já descrito na literatura (Popolo *et al.*, 1982), com as devidas modificações. As células de leveduras previamente cultivadas em 3mL de YP glicose por 12 horas foram coletadas por centrifugação e lavadas 3 vezes em tampão Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.7). Uma amostra de  $2 \times 10^7$  células/mL foi fixada com 1mL de etanol 70% (v/v) gelado, a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas, em 100  $\mu$ L de tampão Tris-HCl com RNase (0,25 mg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com proteinase K (1mg/mL) por 1 hora a 50°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100  $\mu$ L de solução de iodeto de propídio (0,046 mM) e mantidas a 4°C por 48 horas. As amostras foram analisadas em citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson) emitindo laser a 488 nm. As células foram detectadas a 564-606 nm (FL2-A) e a quantidade de DNA foi estimada com base na intensidade da fluorescência e comparando com o conteúdo de DNA das células de leveduras de referência.

### 3.8. Deleção do Gene *HO* em *S. cerevisiae* LBCM1092

A deleção do gene *HO* foi realizada na cepa LBCM 1092 por meio da técnica de recombinação inserindo cassetes com genes que conferem resistência a geneticina e a higromicina. Essa metodologia visa à interrupção da sequência de mais de uma cópia do gene *HO*, uma vez que os transformantes podem ser selecionados por marcadores diferentes. Foram realizadas duas PCRs objetivando amplificar as cassetes de deleção a partir de dois plasmídeos (pJET1,2-B-kanMX-P e pJET1,2-B-hph-P) utilizando os primers *pdelfw* e *pdelrv* (Tabela 1) e uma Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs Inc. New England). Para a PCR foram utilizados 5ng do DNA plasmidial, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, DMSO 3% (v/v), 0,5 U de DNA polimerase e tampão GC (1X). As condições da reação incluíram uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 5 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min, 72°C por 2 min, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 71,5°C por 3 segundos, 72°C por 2 minutos, e uma extensão final de 5 min a 72°C. A transformação da cepa LBCM1092 foi realizada de acordo com o método descrito na literatura (Gietz *et al.*, 1995). As leveduras foram pré-cultivadas em 5mL de meio YP glicose a 30°C, sob agitação por 24 horas. O pré-inóculo foi transferido para 45 mL de meio YP glicose e incubado nas mesmas condições descritas acima até atingir um valor de densidade ótica igual a 1,0 (a 600 nm). As células foram coletadas por centrifugação, lavadas em água destilada estéril e ressuspensas em 1mL de acetato de lítio 100 mM. As células foram centrifugadas a 3000 g por 30 segundos e ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio 100 mM. Uma alíquota de 50 µL dessa suspensão celular foi transferida para um microtubo e foram adicionados 240 µL de polietilenoglicol 50% (v/v), 36 µL de acetato de lítio 1M, 10 µL de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) e 50 µL do produto de PCR purificado. A amostra foi incubada a 30°C por 45 minutos e, posteriormente, a 42°C por 25 minutos. Após centrifugação a 3000 g por 30 segundos, as células foram ressuspensas em 1mL de YP glicose e incubadas a 30°C por 4 horas. As células foram plaqueadas em ágar YP glicose contendo o composto antimicrobiano utilizado como marca de seleção específica para cada plasmídeo, geneticina (400 µg/mL) ou higromicina (600 µg/mL), e incubadas a 30°C por 72 horas. As colônias crescidas nos meios seletivos foram cultivadas em meio líquido YP glicose para posterior confirmação da efetividade da transformação. A primeira transformação da LBCM1092 foi realizada utilizando o produto de PCR com a cassette

KanMX (geneticina). O mutante selecionado foi submetido a segunda transformação utilizando o produto de PCR com a cassete hph (higromicina).

**Tabela 1: Sequências dos primers utilizados neste trabalho**

| Primer       | Seqüência (5' - 3')   |
|--------------|---|
| MATLocu      | AGTCACATCAAGATCGTTTATGG   |
| s            |   |
| Mat a        | ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG   |
| Mat $\alpha$ | GCACGGAATATGGGACTACTTCG   |
| Pdelfw       | TAGCAGATGCGCGCACCTGCGTTGTTACCACAACCTCTTATGA<br>G                                  |
|              | GCCCCGCGGAGTGGTCGGCTGGAGATCGG   |
| Pdelrv       | ATGCTTCTGAAAACACGACTATTCTGATGGCTAACGGTGAA<br>A<br>TTAAAGACATCGAGCCGTTATGGCGGGCATC |

\*Primers: MAT locus/Mat a/Mat  $\alpha$  (seqüências complementares a região do MAT locus); pdelfw/pdelrv (amplificação das cassetes para deleções);

### 3.9. Troca do mating type das leveduras

Para obter cepas de leveduras diplóides (Mat a/a ou Mat  $\alpha/\alpha$ ) foi utilizada a metodologia para troca do *mating type*. As cepas de leveduras foram transformadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  do plasmídeo pFL39GAL1HOKanMX (Connolly *et al.*, 1988), o qual contém o gene *HO* funcional, controlado pelo promotor GAL1 (induzido por galactose). A transformação foi realizada como descrito anteriormente, no item 3.8, e as células foram selecionadas em ágar YP glicose com geneticina (400  $\mu\text{g/mL}$ ). As células transformadas foram pré-inoculadas em meio líquido YP glicose contendo geneticina (400  $\mu\text{g/mL}$ ) a 30°C por 24 horas. As células foram posteriormente centrifugadas e ressuspendidas em YP contendo galactose 2% e geneticina (400  $\mu\text{g/mL}$ ) a 30°C sob constante agitação. Após 1 hora de crescimento foi adicionado 2% de glicose. Amostras de células foram coletadas a cada hora durante um período de 12 horas de incubação e plaqueadas em ágar YP glicose. A confirmação da troca do *mating type* foi realizada por meio da PCR como descrito anteriormente no item 4.6. As colônias com o *mating type* alterado (Mat a/a ou Mat  $\alpha/\alpha$ ) foram cultivadas em meio YP glicose sem geneticina, para indução da perda do plasmídeo, e em seguida foram estocadas a -80°C.

### 3.10. Condições dos cruzamentos entre as cepas de leveduras

Os cruzamentos foram realizados entre os segregantes haploides, Mat a e Mat  $\alpha$ , e entre diploides com *mating type* trocado (Mat a/a e Mat  $\alpha/\alpha$ ), ambos os cruzamentos utilizando as cepas LBCM1092 e LBCM1078. Para cada cruzamento amostras de células de colônias das leveduras de *mating type* opostos foram misturadas com 10  $\mu$ L de água destilada estéril na superfície do ágar YP glicose. Após secagem da mistura de células, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse período, amostras da biomassa foram coletadas, diluídas e plaqueadas em ágar YP glicose objetivando obter colônias isoladas. O *mating type* dos híbridos foi confirmado por meio da PCR.

### 3.11. Análise qualitativa e quantitativa da floculação

A capacidade de floculação das leveduras foi verificada pela formação de flocos celulares após cultivo das cepas em caldo YP glicose a 30°C por 48 horas. A verificação qualitativa da floculação foi realizada pela visualização macroscópica, evidenciada pela rápida deposição das células no fundo do tubo, após agitação vigorosa. A quantificação da floculação foi baseada no teste de Helms como descrito por (Alvarez *et al.*, 2014). As células de leveduras previamente crescidas em 3 ml de meio YP glicose a 30°C por 72 horas foram lavadas 3 vezes em água destilada estéril e diluídas para um valor de densidade ótica entre 0,35 – 0,4 a 600 nm. Nove alíquotas de 1mL referente a cada cepa de levedura foram coletadas, sendo 03 alíquotas controles e 06 alíquotas experimentais. As alíquotas experimentais foram primeiramente ressuspensas em tampão de lavagem, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de suspensão, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L), acetato de sódio (6,8 g/L), ácido acético glacial (4,5 g/L) e etanol 4%, pH 4,5. As alíquotas utilizadas como controle, foram ressuspensas em 1mL de EDTA 0,5 M, pH 7.0. As amostras foram submetidas a 30 segundos de agitação em vortex, sendo todos os tubos de uma mesma amostra, agitados ao mesmo tempo. Após a agitação e um período de 15 minutos de sedimentação, amostras foram coletadas e diluídas 10 vezes. A leitura da absorbância foi realizada a 600 nm e o percentual da floculação foi determinado utilizando a seguinte fórmula (Alvarez *et al.*, 2014):

$$\% \text{ floculação} = \frac{\text{Valor da D. O. Controle} - \text{Valor da D. O. Experimental}}{\text{Valor da D. O. Controle}} \times 100$$

### **3.12. Fermentação em presença de maltose**

As cepas de leveduras foram inoculadas em tubos contendo 3mL de meio YP maltose 2% (p/v), com tubos de Durham invertidos, e incubadas a 30°C, sem agitação por 24 horas. Em seguida os tubos foram analisados e a fermentação foi confirmada pela presença de bolhas nos tubos de Durham.

### **3.13. Fermentação em escala laboratorial**

Para o pré inoculo, as leveduras foram reativadas em 3mL de meio YP glicose a 30°C, sob agitação, durante 24 horas. As células pré-crescidas foram transferidas para 50 mL de YP 250 e incubadas a 30°C por 24 horas. Após contagem do número de células, um volume correspondente a  $5 \times 10^6$  células/ mL foi inoculado em 100 mL de YP 250 glicose 10% (p/v) e incubado a 30°C, sem agitação, durante 4 dias. A fermentação foi monitorada pesando-se os tubos diariamente e a partir da perda de peso (liberação de CO<sub>2</sub>) a concentração de etanol foi estimada.

### **3.14. Análise dos principais compostos voláteis formados durante a fermentação em escala laboratorial**

Os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chamas (CG-DIC). Esses compostos voláteis correspondem à fração *headspace* (entre a porção líquida e a tampa do frasco) do sobrenadante da fermentação. Alíquotas de 5mL do líquido fermentado, foram coletadas e misturadas com 20µL do padrão interno n-pentanol 2% em água (v/v). Após aquecimento a 60°C, por 30 minutos, 5mL da fração *headspace* foi coletada da seringa *gás tight* de 25 mL e injetada em cromatógrafo CP-Varian Modelo 3380, coluna DB-Wax polietileno glicol (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). As análises foram realizadas conforme as condições descritas na Tabela 2. Os compostos voláteis verificados foram os alcoóis superiores (n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico), os ésteres de acetato (acetato de etila, acetato de isoamila e acetato de isobutila), os ésteres de ácidos graxos de cadeia média (hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila), diacetil e acetaldeído. As concentrações dos compostos foram obtidas a partir das relações entre as áreas dos picos observados para as amostras e as áreas dos picos do padrão interno (n-pentanol), utilizando a respectiva equação da reta.

**Tabela 2: Condições cromatográficas da análise de compostos voláteis por CG-DIC.**

| Itens operacionais     | Condições analíticas  |
|------------------------|---|
| Modo de injeção        | Splitless por 2 min, Split: 1/30.   |
| Gás de Arraste         | Hidrogênio (99,9990%)   |
| Injetor (temperatura)  | 225°C   |
| Detector (temperatura) | 280°C   |
| FID                    | N <sub>2</sub> (gasmakeup): 29 mL/min, H <sub>2</sub> : 30 mL/min e Ar: 300 mL/min                                    |
| Taxa de aquecimento    | 80°C (1 min), 80°C a 110°C a uma taxa de 5°C/min, 110°C (1 min), 110°C a 240°C a uma taxa de 30°C/min, 240°C (1 min). |

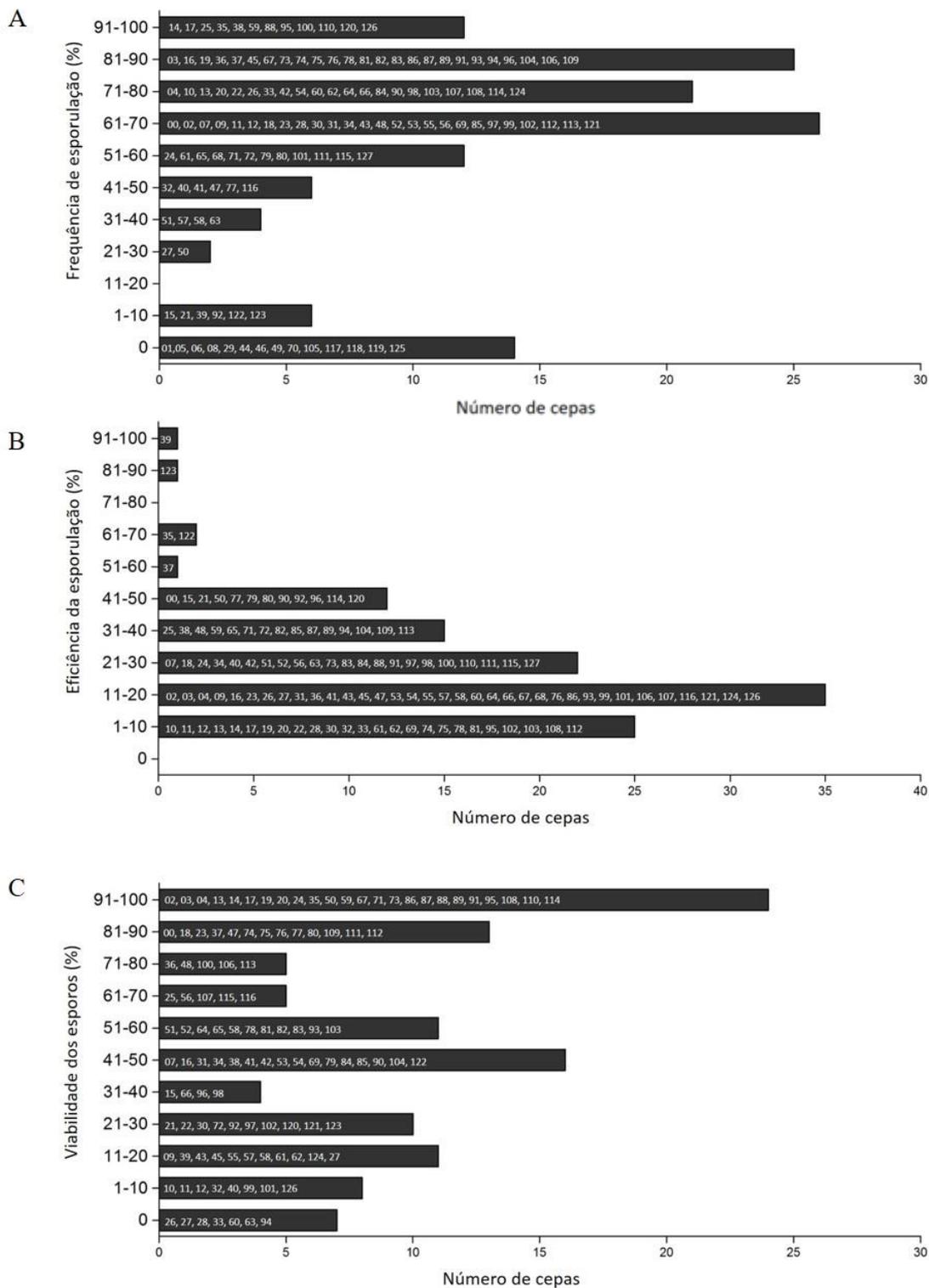
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Esporulação, viabilidade dos esporos e análise do ciclo reprodutivo**

No presente trabalho, 128 cepas de leveduras isoladas de ambiente de produção de cachaça foram submetidas ao estudo da capacidade de esporulação, a eficiência da formação de esporos, a viabilidade dos esporos e o ciclo reprodutivo. Essa estratégia foi realizada com intuito de obter informações a respeito das cepas de leveduras, objetivando selecioná-las para o desenvolvimento de técnicas de cruzamentos.

A frequência e eficiência da esporulação foram determinadas por meio da contagem, em câmara de Neubauer, do número de ascos e células presentes. A frequência foi determinada através da razão entre total de ascos por células e ascos encontrados na contagem. Já a eficiência foi determinada pela razão entre as tétrades encontradas pelo total de ascos disponibilizados. A viabilidade dos esporos foi relacionada com a quantidade de esporos dissecados e que apresentaram crescimento (Piekarska *et al.*, 2010; Neiman, 2005).

A Figura 7 apresenta a porcentagem da frequência e eficiência da esporulação, assim como a viabilidade dos esporos das cepas de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça.



**Figura 4: Valores da frequência, eficiência e viabilidade dos esporos.** (A) Porcentagem da frequência; (B) Porcentagem da eficiência; (C) Porcentagem da viabilidade. Os números contidos nas barras correspondem aos isolados, por ex.: LBCM1078= 78, LBCM1092= 92, etc.

A maior parte das leveduras, 96 isolados, apresentou uma porcentagem de esporulação acima de 50% (Figura 7A). No entanto, catorze cepas foram incapazes de esporular nas condições testadas, mesmo quando o tempo de incubação ultrapassou 30 dias (Figura 7A). Todas as cepas que apresentaram esporulação foram capazes de formar tétrades, entretanto, em alguns casos, o número de ascos com dois esporos (díades) e três (tríades) foi relativamente alto, tornando a eficiência da esporulação baixa (Figura 7B). Apenas cinco cepas apresentaram eficiência de esporulação acima de 50%, sendo elas: LBCM1037, LBCM1035, LBCM1122, LBCM1123 e LBCM1039 (Figura 7B). A eficiência da esporulação está relacionada com a formação de tétrades, sendo para grande parte das cepas avaliadas a presença de díades verificada em maior quantidade. Desse modo, em geral, a eficiência da esporulação para as 128 estirpes de leveduras foi baixa.

A formação de esporos está relacionada com diversos fatores como: a ploidia, os fatores nutricionais e a presença de mutações que afetam a divisão meiótica (Neiman, 2005; Mortimer, 2000; Piekarska *et al.*, 2010). A maior parte dos defeitos nos genes está envolvida com funções metabólicas (mitocondriais); com autofagia e vacúolo; genes caracterizados por apresentar defeitos na fase pré-mitótica ou da mitose (Neiman, 2005). A regulação da expressão dos genes envolvidos na formação de esporos está relacionada com as condições nutricionais da célula, como na regulação da função dos SPB (*Spindle pole bodies*) na meiose (Taxis *et al.*, 2005).

Vinte e quatro cepas de leveduras mostraram viabilidade entre 91 e 100%, enquanto sete cepas não apresentaram esporos viáveis (Figura 7C). Para estas sete cepas e para as cepas que apresentaram um menor número de esporos viáveis, foi necessário dissecar um grande número de tétrades (acima de 10 tétrades) para obtenção de esporos viáveis. A viabilidade geralmente é determinada pela capacidade de crescimento dos esporos em um período de 2 a 5 dias a temperatura de 30° C (Fernández-González *et al.*, 2014).

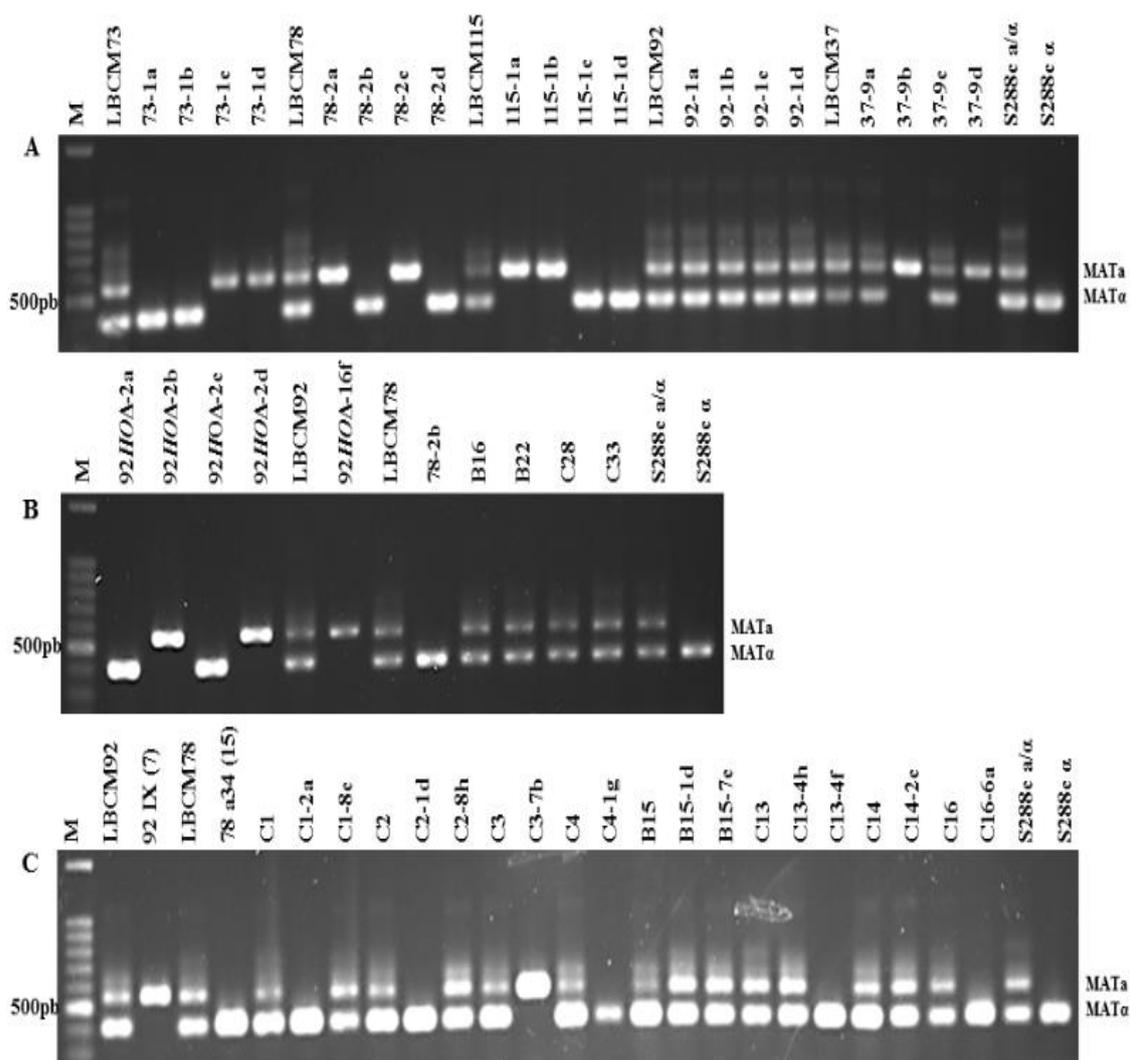
Alguns estudos mostraram que leveduras cervejeiras, como as cepas Lager, possuem esporos com baixa viabilidade, podendo ser poliploides ou aneuploides, característica que contribui para a estabilidade das estirpes. Ao contrário, as estirpes de vinho são, em sua maioria, diploides e apresentaram aproximadamente 100% de viabilidade dos esporos (Mortimer, 2000).

Leveduras híbridas, resultantes do cruzamento interespécies podem ser estéreis, produzindo esporos com menos de 1% de viabilidade. Essa esterilidade é basicamente devida à incapacidade dos cromossomos de parear na prófase da meiose I, o que não permite que a meiose ocorra de forma correta. A alta viabilidade dos esporos, como observado em alguns estudos com cepas tetraploides, em contrapartida, se deve à presença de pares homólogos para cada cromossomo, o que possibilita a ocorrência da meiose adequadamente (Mortimer, 2000; Sipiczki, 2008).

Estudo realizado por Coloretti e colaboradores (2006), demonstrou que híbridos obtidos a partir de cruzamentos entre cepas *S. cerevisiae* e *S. uvarum* foram capazes de esporular, formando ascos contendo quatro esporos, porém os esporos não foram capazes de germinar, apresentando, assim, viabilidade nula. Em contrapartida, estudo desenvolvido por Mortimer (2000), demonstrou que híbrido proveniente de cruzamento entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* apresentou viabilidade de esporos de quase 100%, resultado inesperado para cruzamento realizado entre espécies diferentes.

De acordo com os resultados obtidos, não foi possível observar um padrão entre os valores determinados para a frequência, eficiência da esporulação e a viabilidade dos esporos. Algumas estirpes, como LBCM1014 e LBCM1095 apresentaram alta frequência da esporulação (acima de 91%) baixa eficiência da esporulação, ou seja, baixa formação de tétrades (entre 1-10%) e alta viabilidade dos esporos (acima de 91%). A cepa LBCM1100 apresentou altos valores de frequência, entre 91 e 100%, eficiência entre 21 e 30%, e viabilidade dos esporos entre 71 e 90% (Figura 7). As cepas LBCM1035 e LBCM1037 apresentaram alta frequência, entre 81 e 100%, alta eficiência, 51 e 70% e alta viabilidade, entre 81 e 100%.

As cepas que apresentaram esporos viáveis foram submetidas à análise do tipo de ciclo de vida (homotálico ou heterotálico). As tétrades foram dissecadas em micromanipulador e os esporos de um mesmo asco (tétrade) foram submetidos a PCR para verificar *mating type*. Um único amplicon mostra que os esporos são Mat a ou Mat  $\alpha$  e dois amplicons determinam o homotalismo dos esporos, sendo os mesmos Mat a/ $\alpha$  (Figura 8A). Todas as leveduras analisadas são homotálicas, exceto três cepas (2,4%), sendo elas: LBCM1073, LBCM1078 e LBCM1115, que apresentaram MATa ou MAT $\alpha$  para os quatro esporos provenientes de uma mesma tétrade (Figura 8A).



**Figura 5: PCR *mating type* de leveduras.** (A) Análise do ciclo reprodutivo; (B) Confirmação das parentais e híbridos do cruzamento entre leveduras haploides; (C) Confirmação das parentais e híbridos do cruzamento entre leveduras diploides.

Leveduras *S. cerevisiae* podem ser classificadas quanto ao ciclo reprodutivo em homotáticas ou heterotáticas. No homotalismo as células são capazes de realizar a troca do *mating type* após a expressão do gene *HO* que codifica uma endonuclease sítio específica, formando células com MAT oposto daquele da célula de origem. Essa troca pode ocasionar a auto diploidização, caracterizada pelos cruzamentos entre a cepa mãe e a originada com *mating type* oposto (Haber, 2012; Lee and Haber, 2015; Ezov *et al.*, 2010). As cepas heterotáticas, em contrapartida, possuem *mating type* estável e o cruzamento pode ocorrer por meio dos esporos haploides originados de tétrades diferentes

ou originados de uma mesma tétrade, mas não são capazes de auto diploidizar como as cepas homotáticas (Lee and Haber, 2015; Ezov *et al.*, 2010).

*S. cerevisiae* geralmente são conhecidas por possuir ciclo reprodutivo homotático (Mortimer, 2000). No entanto, nossos resultados mostraram cepas *S. cerevisiae* heterotáticas, semelhante aos resultados encontrados por Fernández-González e colaboradores (2015) e Ezov e colaboradores (2010), que verificaram cepas heterotáticas da espécie *S. cerevisiae* isoladas de ambientes naturais e de produção de vinhos. No entanto, as cepas de ambientes de vinhos selecionadas por Fernández-Gonzalez e colaboradores (2015) e Mortimer e colaboradores (2000) apresentaram 69% de homotalismo.

Em nosso estudo, verificamos 97% de homotalismo nas cepas isoladas de alambique de cachaça. Se uma cepa homotática apresenta característica de heterozigose para um ou mais fenótipos e possui capacidade de esporular, os haploides resultantes possuirão possibilidades de combinações dessa heterozigose. Do cruzamento destes haploides poderão resultar híbridos homozigotos pela auto diploidização (devido à troca do *mating type*) que poderão competir com as estirpes parentais. Dessa forma, o homotalismo pode representar vantagem seletiva (Mortimer, 2000).

#### **4.2. Seleção das cepas parentais para o cruzamento**

Diversas cepas de leveduras, como algumas cepas de vinhos e cepas cervejeiras Lager, são naturalmente provenientes de eventos de cruzamentos, resultando em híbridos com vantagens adaptativas quando comparadas às cepas parentais (Bokulich and Bamforth, 2013; Steensels *et al.*, 2014b; Mertens *et al.*, 2015; Libkind *et al.*, 2011).

A hibridação é um importante mecanismo para obtenção de cepas industriais melhoradas, objetivando-se obter cepas contendo fenótipos superiores e com elevada resistência às condições de estresse no processo de produção, resultando em um produto final diferenciado com alto padrão de qualidade (Bizaj *et al.*, 2012).

Um trabalho realizado por Araújo (2013) permitiu a caracterização de 21 cepas isoladas de dornas de fermentação de cachaça e pertencentes à coleção LBCM. Dentre as cepas avaliadas, foi selecionada LBCM1078, identificada como *S. cerevisiae*, por possuir características adequadas à produção de cerveja tais como a capacidade de crescimento

em baixas temperaturas, metabolização de maltose e produção de compostos responsáveis por aroma (Araújo, 2013).

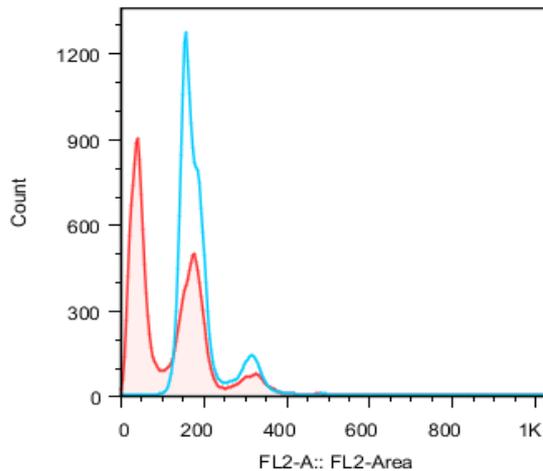
Em 2014, Alvarez e colaboradores, investigando a capacidade de floculação das cepas pertencentes à coleção LBCM, verificaram que a LBCM1092, *S. cerevisiae*, floculava além das demais. O percentual de floculação apresentado (96%) supera até mesmo a cepa comercial cervejeira Lager W-3470 (35%) (Alvarez *et al.*, 2014).

Diante do exposto, as cepas LBCM1092 e LBCM1078 foram selecionadas para realização de cruzamento tanto entre cepas haploides quanto entre cepas diploides, objetivando a obtenção de uma cepa híbrida que associasse a alta capacidade de floculação, produção de compostos responsáveis por aroma e metabolização de maltose. Dessa forma, o emprego de técnicas de cruzamentos pode favorecer a combinação de características de diferentes cepas, visando a geração uma nova cepa Lager tipo Froberg.

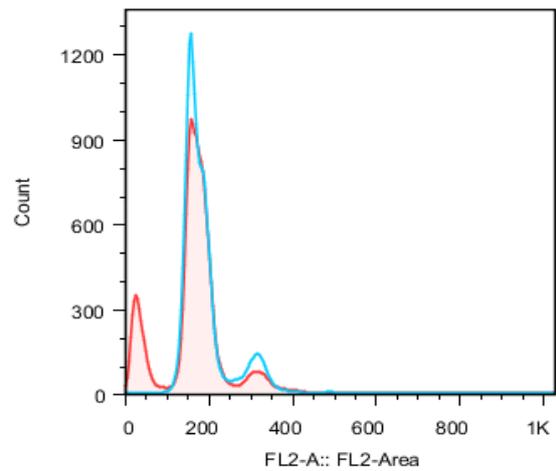
No presente trabalho, foi observado que o isolado LBCM1078 apresentou uma boa frequência de esporulação (81-90%), baixa eficiência (1-10%) e esporos que permaneceram viáveis (51-60%) (Figura 7). Além disso, esse isolado foi caracterizado como heterotático (Figura 8A). Por outro lado, a cepa LBCM1092 apresentou frequência de esporulação baixa (1-10%), eficiência de esporulação entre 41 e 50% e baixa viabilidade dos esporos (21-30%) (Figura 7). A análise do *mating type* dos esporos permitiu a classificação dessa cepa como homotática (Figura 8A).

Para realização do cruzamento, foi realizada a confirmação da ploidia das cepas parentais (Figura 9), por citometria de fluxo, sendo determinado que ambas são diploides.

A



B



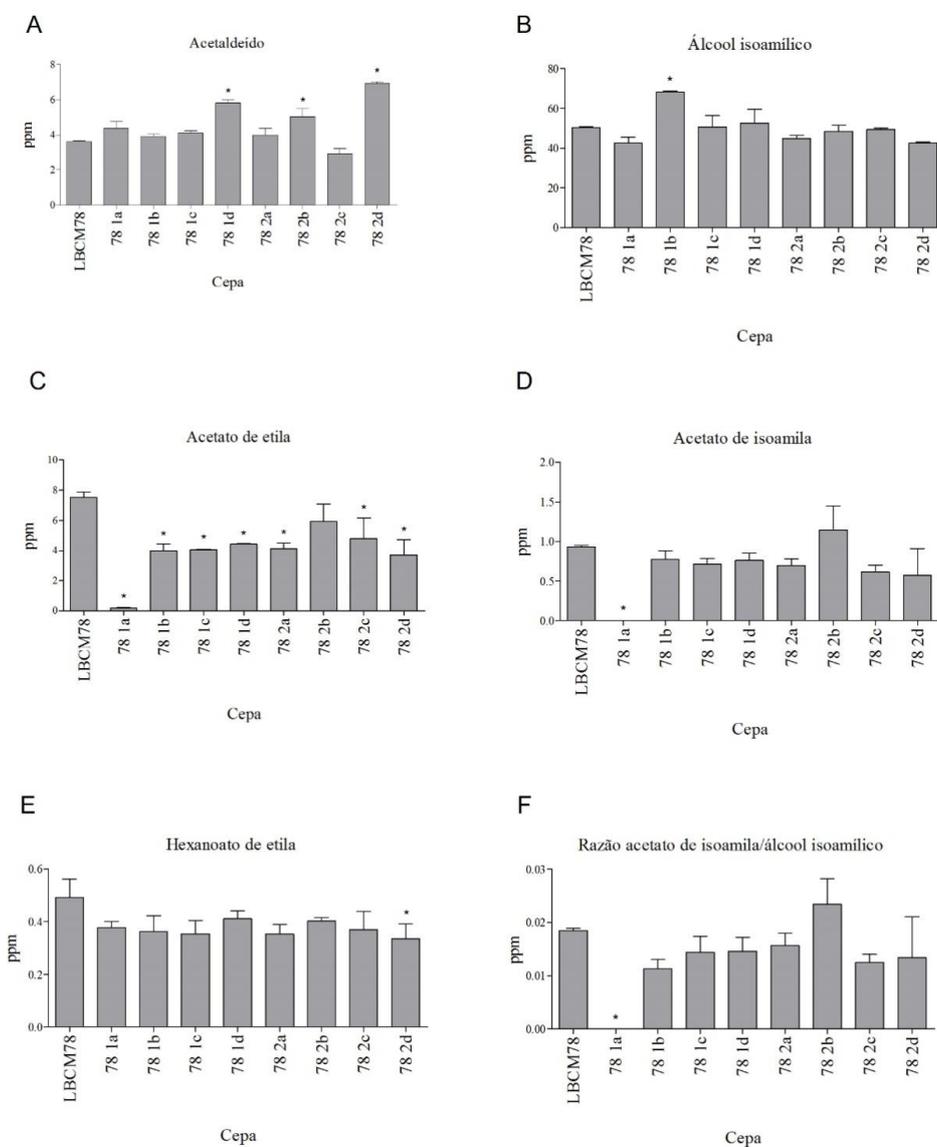
**Figura 6: Análise da ploidia verificada por citometria de fluxo.** (A) Cepa LBCM1078. (B) Cepa LBCM1092. Cepas experimentais em vermelho e cepa controle diploide laboratorial S288C  $a/\alpha$  em azul.

#### 4.2.1. Seleção de cepas parentais haploides

Para obtenção de células filhas haploides do isolado LBCM1092, foi necessário realizar a deleção do gene *HO* na cepa selvagem. A transformação foi realizada, primeiramente, por recombinação homóloga com a cassette contendo a sequência responsável pela resistência a geneticina, o que permitiu a obtenção de diversos transformantes. No entanto, a análise do *mating type* dos segregantes obtidos, após a esporulação dos mesmos, evidenciou haver ainda pelo menos uma cópia ativa do gene *HO*, pois os segregantes ainda apresentavam *mating type a/α*. Transformantes foram selecionados ao acaso para serem submetidos a uma segunda transformação, com cassette detentora de marca de resistência à higromicina. Seis transformantes foram obtidos a partir do meio seletivo contendo os antibióticos usados como marcadores (geneticina e higromicina), assim como a confirmação por PCR da cassette inserida na região do gene *HO* (não mostrado). Um desses transformantes foi selecionado e submetido à esporulação, e posteriormente confirmada a estabilidade do *mating type* dos segregantes, como mostrado na Figura 4B.

Devido à sua característica heterotática, o isolado LBCM1078 apresentou esporos com *mating type* estável.

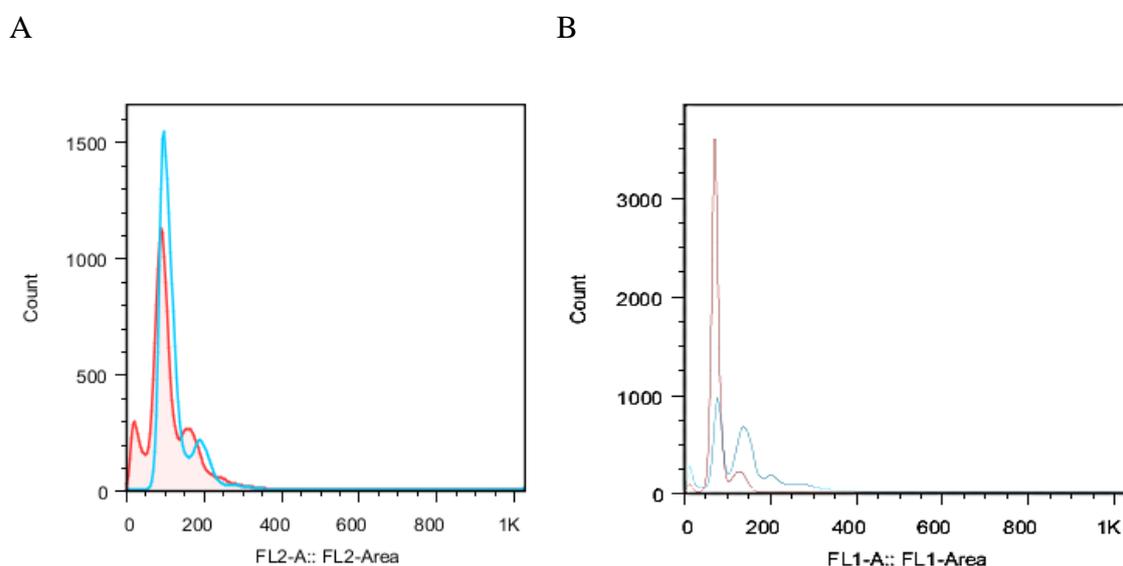
Após a esporulação, foi realizada a análise de tétrades de 72 segregantes, sendo 23 da cepa LBCM1078 e 49 provenientes da cepa LBCM1092*hoA*. Dos vinte e três segregantes analisados, provenientes da cepa LBCM1078, todos apresentaram fermentação em maltose. Para analisar o perfil de compostos de aroma, foi realizada a fermentação em pequena escala dos segregantes (Figura 11). O segregante 78-2b apresentou produção de acetato de isoamila e álcool isoamílico em concentrações semelhantes àquela verificada na cepa parental, LBCM1078, sendo esse escolhido para realizar o cruzamento (Figura 10).



**Figura 10: Compostos voláteis quantificados por cromatografia gasosa.** Perfil de compostos voláteis formados a partir da fermentação da cepa LBCM1078 e seus segregantes.

O *mating type* (Mat  $\alpha$ ) do segregante 78-2b foi estável (Figura 8B) e a análise da ploidia verificada por citometria de fluxo, confirmou perfil haploide (Figura 12-A) do segregante 78-2b.

Dos quarenta e nove segregantes da cepa LBCM1092*hoA*, apenas oito apresentaram uma alta capacidade de floculação qualitativa e três deles apresentaram perfis de floculação quantitativa próximos ao da cepa parental LBCM1092 (Tabela 4 - Anexo I). O segregante 92*hoA*-16f (Mat  $\alpha$ ) apresentou uma maior porcentagem de formação de flocos celulares (93%) quando comparado ao valor verificado para a floculação da parental LBCM92, 92% (Tabela 3) e foi caracterizado como haploide (Figura 11-B).



**Figura 11: Análise de ploidia verificada por citometria de fluxo.** (A) Segregante 78-2b. (B) Segregante 92-16F. Cepas experimentais em vermelho e cepa controle haploide laboratorial S288C  $\alpha$  em azul.

**Tabela 3: Capacidade de floculação das leveduras parentais e das cepas resultantes dos cruzamentos.**

| Estirpe             | Floculação (%) |
|---------------------|----------------|
| LBCM1092 (selvagem) | 92 ± 1         |
| LBCM1078 (selvagem) | 44 ± 3         |
| 1078-2B             | 55 ± 4         |
| 1092-16F            | 93 ± 1         |
| Híbrido B16         | 63 ± 1         |
| Híbrido B22         | 70 ± 1         |
| Híbrido C28         | 55 ± 1         |
| Híbrido C33         | 44 ± 2         |
| 1092 IX (7)         | 94 ± 2         |
| 1078 a34 (15)       | 36 ± 3         |
| C1-2a               | 64 ± 4         |
| C1-8c               | 64 ± 1         |
| C2-1d               | 91 ± 1         |
| C2-8h               | 73 ± 1         |
| C3-7b               | 91 ± 0         |
| C4-1g               | 93 ± 2         |
| B15-1d              | 75 ± 1         |
| B15-7c              | 56 ± 2         |
| C13-4h              | 61 ± 1         |
| C13-4f              | 67 ± 1         |
| C14-2c              | 62 ± 2         |
| C16-6a              | 50 ± 4         |

\*Os valores representam as médias e os respectivos desvios padrão

A fim de obter híbridos diploides, foram selecionados para cruzamento os segregantes haploides 78-2b (MAT $\alpha$ ) e 92 $ho\Delta$ -16f (MATa) (Figura 8B).

#### 4.2.2. Seleção de cepas parentais diploides

O cruzamento entre leveduras diploides é possível apenas quando elas apresentam *mating type* opostos Mata/a e Mata/ $\alpha$ . Desta forma, para possibilitar o cruzamento entre as cepas diploides, LBCM1078 e LBCM1092 utilizou se a metodologia da troca de *mating type*. As cepas LBCM1092 e LBCM1078 foram transformadas com o plasmídeo pFL39GAL1HOKanMX e cultivadas em meio YP contendo galactose com o objetivo de induzir a expressão do gene *HO*.

Após a transformação, foram obtidas 55 colônias da cepa parental LBCM1078 e 42 da cepa parental LBCM1092. Foi verificada a troca de *mating type* em apenas duas colônias da cepa LBCM1092, identificadas como 92 IX Mat a/a e 92 C Mat  $\alpha/\alpha$ ; e apenas

quatro colônias da cepa LBCM1078, identificadas como 78a32Mat a/a, 78a69Mat a/a, 78a21Mat  $\alpha/\alpha$  e 78a34Mat  $\alpha/\alpha$ .

Após a indução da perda do plasmídeo, em meio com ausência de antibiótico, foi verificada a perda da habilidade das cepas 78 a34 Mat  $\alpha/\alpha$  e 92 IX Mat a/a, em crescer em YPD com 400  $\mu\text{g/mL}$  de geneticina, confirmando, assim, a perda do plasmídeo. Essas cepas foram, então, selecionadas para o cruzamento.

### **4.3. Desenvolvimento das técnicas de cruzamento entre células de leveduras haploides e diploides**

Foi realizado o cruzamento entre as cepas haploides 78-2b e 92-16f, com obtenção de 21 híbridos. A Tabela 4, Anexo1, mostra a confirmação do *mating type* (MATa/ $\alpha$ ) dessas estirpes.

Todos os híbridos foram capazes de fermentar maltose e 9 deles apresentaram floculação qualitativa (Tabela 4- Anexo 1). No entanto, apenas quatro (B16, B22, C28 e C33), apresentaram valores de floculação entre 44 a 70%, embora ainda inferiores àquele apresentado pela cepa parental LBCM1092 (Tabela 3). Essa baixa porcentagem apresentada por esses híbridos pode ser devido à característica poligênica da floculação, como sugerido por Alvarez e colaboradores (2014). Dessa maneira, nos híbridos pode haver a repressão de determinados genes, responsáveis por esse fenótipo.

A partir dos cruzamentos entre as cepas diploides 78 a 34 Mat  $\alpha/\alpha$  e 92 IX Mat a/a foram obtidos 33 híbridos, dos quais apenas 31 apresentaram capacidade de fermentar maltose e nenhum desses híbridos apresentou fenótipo de floculação qualitativa (Tabela 4 – Anexo I). Esses resultados podem se relacionar com a característica poligênica da floculação e com a repressão de genes envolvidos com a mesma (Alvarez *et al*, 2014). Foram escolhidos aleatoriamente oito híbridos (B15, C1, C2, C3, C4, C13, C14 e C16) para serem submetidos à esporulação, com o objetivo de obter segregantes diploides.

A partir da esporulação e segregação dos híbridos tetraploides, foram obtidos e analisados 495 esporos viáveis dos quais 12 apresentaram fenótipo da floculação visualmente semelhante à cepa parental LBCM1092 (Anexo I). Os doze segregantes foram avaliados quanto ao *mating type*, sendo obtidos os seguintes resultados: Mat a: segregantes C1-2a, C2-1d, C4-1g, C3-4f, C16-6a; Mat  $\alpha$ : segregante C3-7b; Mat a/ $\alpha$ :

segregantes C1-8c, C2-8h, B15-1d, B15-7c, C13-4h, C14-2c (Figura8C). A análise da floculação quantitativa revelou que somente três dos doze segregantes testados, C2-1d, C3-7b e C4-1g, apresentaram valor de aproximadamente 92% (Tabela 3), ou seja, comparável à cepa parental LBCM1092. A presença de *mating type* Mat a ou Mat  $\alpha$  nestes segregantes sugere que eles sejam diploides Mat a/a ou Mat  $\alpha/\alpha$ ; ou aneuploides, havendo a perda de uma das cópias do cromossomo III. A confirmação da ploidia das cepas em questão necessita análise por citometria de fluxo, o que pode permitir a utilização destes segregantes em novos cruzamentos.

As duas técnicas utilizadas, cruzamentos entre cepas haploides e entre cepas diploides, deram origem a híbridos com fenótipos esperados. No entanto, os segregantes obtidos a partir dos híbridos do cruzamento entre as cepas diploides, apresentaram um melhor perfil de floculação, quando comparados aos híbridos provenientes de cruzamentos entre haploides. Coloretti e colaboradores (2006) obtiveram leveduras híbridas com alta capacidade de floculação a partir do cruzamento entre segregantes haploides de *S. cerevisiae* e *S. uvarum* embora não tenham realizado testes de cruzamentos entre diploides.

Para o cruzamento entre haploide-haploide foi realizada a construção da estirpe LBCM1092 Mat a/a HO:: *KanMX/HO*:: *hph* (LBCM92*ho* $\Delta$ ), um organismo geneticamente modificado. A legislação não permite a utilização de organismos geneticamente modificados na indústria de alimentos, sendo dessa forma, a técnica de cruzamento entre estirpes diploides, mais apropriada (Steensels *et al.*, 2014b).

## 5. CONCLUSÕES

A partir do trabalho desenvolvido foi possível caracterizar o ciclo reprodutivo, a capacidade de esporulação e viabilidade dos esporos de 128 cepas de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça de diversas regiões do país, o que contribui para pesquisas futuras a serem desenvolvidas no LBCM.

Das cepas avaliadas, quatorze não foram capazes de esporular e das cento e quatorze cepas que esporularam, sete não apresentaram esporos viáveis.

Através da análise do ciclo reprodutivo, foi confirmado que as leveduras LBCM1073, LBCM1078 e LBCM1115 apresentaram esporos haploides estáveis, confirmando assim o perfil de heterotalismo. O restante das cepas analisadas, portanto, são homotáticas.

Foram empregadas técnicas de cruzamento entre cepas haploides e diploides para obtenção de híbridos detentores de características desejadas para produção de cerveja. A partir do cruzamento entre haploides, foram obtidos 4 híbridos sendo o B22 o que apresentou melhor perfil de floculação. Esse fenótipo foi verificado por teste quantitativo de floculação e o perfil de floculação do híbrido B22 foi bem próximo ao perfil de floculação da cepa parental LBCM1092.

O desenvolvimento da técnica de cruzamento entre cepas haploides viabilizou a padronização da deleção do gene *HO*. Técnica que poderá ser empregada para o desenvolvimento de outros trabalhos, o que contribui cientificamente para o LBCM.

O cruzamento entre cepas diploide proporcionou a obtenção de 12 híbridos, sendo C2-1d e C4-1g, os melhores híbridos em relação à floculação. O cruzamento entre cepas diploides viabilizou a padronização da indução de troca de *mating type*, técnica que também contribui para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Ambas as técnicas de cruzamento foram eficientes para obtenção de híbridos com fenótipos de interesse, porém o cruzamento entre diploides merece destaque, uma vez que, além de apresentar os melhores valores de floculação de seus híbridos, não foi realizado nenhum tipo de manipulação genética, o que não é bem visto pela sociedade, nem aceito pela legislação brasileira.

## **6. PERSPECTIVAS**

- Realizar a confirmação da ploidia e produção de compostos voláteis dos híbridos obtidos pelo cruzamento de haploides e diploides;
- A incapacidade de esporulação e inviabilidade dos esporos apresentada por parte das cepas, além da predominância de leveduras homotáticas na coleção, podem ser objeto de estudos futuros;
- O baixo perfil de floculação apresentado pela maioria dos híbridos obtidos, sugere um perfil multigênico desse fenótipo, devendo ser melhor investigado, por exemplo por mapeamento de QTL's.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, F., DA MATA CORREA, L. F., ARAÚJO, T. M., MOTA, B. E. F., DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R., DE MIRANDA CASTRO, I. & BRANDÃO, R. L. 2014. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. *International journal of food microbiology*, 190, 97-104.
- ARAÚJO, T. M. 2013. Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). NUPEB. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, Minas Gerais.
- BARTH, J., GMBH, S. & KG, C. 2015. The Barth Report. Nuremberg: Barth-HAAS Group.
- BAUER, F. F., GOVENDER, P. & BESTER, M. C. 2010. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, 31-39.
- BIZAJ, E., CORDENTE, A. G., BELLON, J. R., RASPOR, P., CURTIN, C. D. & PRETORIUS, I. S. 2012. A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production. *FEMS yeast research*, 12, 456-465.
- BOKULICH, N. A. & BAMFORTH, C. W. 2013. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 157-172.
- BONY, M., THINES-SEMPOUX, D., BARRE, P. & BLONDIN, B. 1997. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of bacteriology*, 179, 4929-4936.
- CONNOLLY, B., WHITE, C. & HABER, J. 1988. Physical monitoring of mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 8, 2342-2349.
- DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R., SARAIVA, M. A. F., DINIZ, R. H. S., OLIVEIRA, J., BARBOSA, G. D., ALVAREZ, F., DA MATA CORREA, L. F., MEZADRI, H., COUTRIM, M. X. & AFONSO, R. J. D. C. F. 2015. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42, 237-246.
- EZOV, T. K., CHANG, S.-L., FRENKEL, Z. E., SEGRE, A. V., BAHALUL, M., MURRAY, A. W., LEU, J.-Y., KOROL, A. & KASHI, Y. 2010. Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. *Molecular ecology*.

- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J. F. & BRIONES, A. I. 2014. Study of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strains for Breeding Through Fermentation Efficiency and Tetrad Analysis. *Current Microbiology*, 70, 441-449.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J. F. & BRIONES, A. I. 2015. Study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for breeding through fermentation efficiency and tetrad analysis. *Current microbiology*, 70, 441-449.
- FICHTNER, L., SCHULZE, F. & BRAUS, G. H. 2007. Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell–cell and cell–substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Molecular microbiology*, 66, 1276-1289.
- FUKUDA, N., MATSUKURA, S. & HONDA, S. 2013. Artificial conversion of the mating-type of *Saccharomyces cerevisiae* without autopolyploidization. *ACS synthetic biology*, 2, 697-704.
- GIBSON, B. & LITI, G. 2015. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32, 17-27.
- GIBSON, B. R., STORGÅRDS, E., KROGERUS, K. & VIDGREN, V. 2013. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, 30, 255-266.
- GIETZ, R. D., SCHIESTL, R. H., WILLEMS, A. R. & WOODS, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355-360.
- GOOSSENS, K. & WILLAERT, R. 2010. Flocculation protein structure and cell–cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 32, 1571-1585.
- HABER, J. E. 2012. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191, 33-64.
- IIMURE, T. & SATO, K. 2013. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, 54, 1013-1020.
- ILLUXLEY, C., GREEN, E. D. & DUNBAM, I. 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in genetics*, 6, 236.
- KOBAYASHI, M., SHIMIZU, H. & SHIOYA, S. 2008. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106, 317-323.
- LEE, C.-S. & HABER, J. E. 2015. Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology spectrum*, 3.

- LI, H., LI, H., LIU, X. & CHEN, B. 2012. Analysis of volatile flavor compounds in top fermented wheat beer by headspace sampling-gas chromatography. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 5, 67-75.
- LIBKIND, D., HITTINGER, C. T., VALÉRIO, E., GONÇALVES, C., DOVER, J., JOHNSTON, M., GONÇALVES, P. & SAMPAIO, J. P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14539-14544.
- MERTENS, S., STEENSELS, J., SAELS, V., DE ROUCK, G., AERTS, G. & VERSTREPEN, K. J. 2015. A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 8202-8214.
- MONTELONE, B. A. 2002. Yeast mating type. *eLS*.
- MORADO, R. 2009. *Larousse da Cerveja*, São Paulo, *Larousse do Brasil*.
- MORTIMER, R. K. 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*, 10, 403-409.
- MOURET, J., CADIÈRE, A., AGUERA, E., ROLLERO, S., ORTIZ-JULIEN, A., SABLAYROLLES, J. & DEQUIN, S. 2015. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 32, 257-269.
- NEIMAN, A. M. 2005. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 565-584.
- NELSON, M. 2014. The Geography of Beer in Europe from 1000 BC to AD 1000. *The Geography of Beer*. Springer.
- OLIVER, G. 2012. *A mesa do mestre cervejeiro: descobrindo os prazeres das cervejas e das comidas verdadeiras*, São Paulo, Editora Senac São Paulo.
- PAN, W., JUSSIER, D., TERRADE, N., YADA, R. Y. & DE ORDUNA, R. M. 2011. Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values. *Food Research International*, 44, 660-666.
- PÉREZ-TRAVÉS, L., LOPES, C. A., BARRIO, E. & QUEROL, A. 2012. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *International journal of food microbiology*, 156, 102-111.
- PIEKARSKA, I., RYTKA, J. & REMPOLA, B. 2010. Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 241-50.

- PIRES, E. J., TEIXEIRA, J. A., BRÁNYIK, T. & VICENTE, A. A. 2014. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 1937-1949.
- PIŠKUR, J. & COMPAGNO, C. 2014. *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*, Springer.
- POPOLO, L., VANONI, M. & ALBERGHINA, L. 1982. Control of the yeast cell cycle by protein synthesis. *Experimental cell research*, 142, 69-78.
- RAVASIO, D., WALTHER, A., TROST, K., VRHOVSEK, U. & WENDLAND, J. 2014. An indirect assay for volatile compound production in yeast strains. *Sci Rep*, 4, 3707.
- SAERENS, S., DELVAUX, F., VERSTREPEN, K., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J. & DELVAUX, F. 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 74, 454-461.
- SAERENS, S. M., DUONG, C. T. & NEVOIGT, E. 2010. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1195-1212.
- SANCHEZ, R. G., SOLODOVNIKOVA, N. & WENDLAND, J. 2012. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. *Yeast*, 29, 343-355.
- SHEN, N., WANG, J., LIU, C., LI, Y. & LI, Q. 2014. Domesticating brewing yeast for decreasing acetaldehyde production and improving beer flavor stability. *European Food Research and Technology*, 238, 347-355.
- SIM, L., GROES, M., OLESEN, K. & HENRIKSEN, A. 2013. Structural and biochemical characterization of the N-terminal domain of flocculin Lg-Flo1p from *Saccharomyces pastorianus* reveals a unique specificity for phosphorylated mannose. *FEBS Journal*, 280, 1073-1083.
- SIPICZKI, M. 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS yeast research*, 8, 996-1007.
- STEENSELS, J., MEERSMAN, E., SNOEK, T., SAELS, V. & VERSTREPEN, K. J. 2014a. Large-Scale Selection and Breeding To Generate Industrial Yeasts with Superior Aroma Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6965-6975.
- STEENSELS, J., SNOEK, T., MEERSMAN, E., NICOLINO, M. P., VOORDECKERS, K. & VERSTREPEN, K. J. 2014b. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38, 947-995.

- TAKAGI, H., HASHIDA, K., WATANABE, D., NASUNO, R., OHASHI, M., IHA, T., NEZUO, M. & TSUKAHARA, M. 2015. Isolation and characterization of awamori yeast mutants with L-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119, 140-147.
- TAXIS, C., KELLER, P., KAVAGIOU, Z., JENSEN, L. J., COLOMBELLI, J., BORK, P., STELZER, E. H. & KNOP, M. 2005. Spore number control and breeding in *Saccharomyces cerevisiae* a key role for a self-organizing system. *The Journal of cell biology*, 171, 627-640.
- VERSTREPEN, K., DERDELINCKX, G., VERACHTERT, H. & DELVAUX, F. 2003a. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and biotechnology*, 61, 197-205.
- VERSTREPEN, K. J., VAN LAERE, S. D., VANDERHAEGEN, B. M., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J.-P., PRETORIUS, I. S., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M. & DELVAUX, F. R. 2003b. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and environmental microbiology*, 69, 5228-5237.

**ANEXO 1- Tabela 4: Caracterização das cepas de leveduras utilizadas no estudo**

| Cruzamento haploide-haploide |             |          |                     |                         | Cruzamento diploide-diploide |                 |             |                     |                         |        |             |         |                     |                         |
|------------------------------|-------------|----------|---------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------------------|--------|-------------|---------|---------------------|-------------------------|
| Cepas                        | Mating type | Ploidia  | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> | Cepas                        | Mating type     | Ploidia     | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> | Cepas  | Mating Type | Ploidia | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> |
| 78 1a                        |             |          | +                   | -                       | 78 a34 (15)                  | $\alpha/\alpha$ | diploide    | +                   | -                       | B15-1d | $a/\alpha$  |         | +                   | ++                      |
| 78 1b                        |             |          | +                   | -                       | 92 IX (7)                    | $a/a$           | diploide    | -                   | ++                      | C1-2a  | A           |         | +                   | ++                      |
| 78 1c                        |             |          | +                   | -                       | Hyb B6                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C1-7b  | A           |         | +                   | +                       |
| 78 1d                        |             |          | +                   | -                       | Hyb B8                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C1-8a  | $a/a$       |         | +                   | +                       |
| 78 2a                        | a           | haploide | +                   | -                       | Hyb B11                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C1-8c  | $a/a$       |         | +                   | ++                      |
| 78 2b                        | $\alpha$    |          | Hyb B12             | $a/a$                   | +                            | -               | C1-9e       | $a/a$               | +                       | +      |             |         |                     |                         |
| 78 2c                        | a           |          | Hyb B13             | $a/a$                   | +                            | -               | C2-1d       | A                   | diploide                | +      | ++          |         |                     |                         |
| 78 2d                        | $\alpha$    |          | Hyb B14             | $a/a$                   | +                            | -               | C2-8h       | $a/a$               | aneuploide              | +      | ++          |         |                     |                         |
| 92HO $\Delta$ 2b             | a           |          | Hyb B15             | $a/a$                   | +                            | -               | C3-4h       | $a/a$               | +                       | +      |             |         |                     |                         |
| 92HO $\Delta$ 2f             | a           |          | -                   | +                       | Hyb C1                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C3-5f  | A           | +       | +                   |                         |
| 92HO $\Delta$ 9f             | a           |          | -                   | +                       | Hyb C2                       | $a/a$           | tetraploide | +                   | -                       | C3-6f  | $a/a$       | +       | +                   |                         |
| 92HO $\Delta$ 11c            | a           |          | -                   | ++                      | Hyb C3                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C3-7b  | A           | +       | ++                  |                         |
| 92HO $\Delta$ 11e            | a           |          | -                   | +                       | Hyb C4                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C4-1g  | A           | +       | ++                  |                         |
| 92HO $\Delta$ 16f            | a           | haploide | -                   | ++                      | Hyb C5                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C4-6h  | A           | +       | +                   |                         |
| 92HO $\Delta$ 17d            | a           | haploide | -                   | ++                      | Hyb C6                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C4-7a  | A           | +       | +                   |                         |
| 92HO $\Delta$ 18c            | a           |          | -                   | +                       | Hyb C7                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C13-4f | A           | +       | ++                  |                         |
| Hyb B16                      | $a/\alpha$  |          | +                   | ++                      | Hyb C8                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C13-4h | $a/a$       | +       | ++                  |                         |
| Hyb B18                      | $a/\alpha$  |          | +                   | -                       | Hyb C9                       | $a/a$           |             | +                   | -                       | C13-6d | $a/a$       | +       | +                   |                         |
| Hyb B19                      | $a/\alpha$  |          | +                   | -                       | Hyb C12                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C13-9a | $a/a$       | +       | +                   |                         |
| Hyb B21                      | $a/\alpha$  |          | +                   | +                       | Hyb C13                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C14-2c | $a/a$       | +       | ++                  |                         |
| Hyb B22                      | $a/\alpha$  |          | +                   | ++                      | Hyb C14                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C14-9f | A           | +       | +                   |                         |
| Hyb B23                      | $a/\alpha$  |          | +                   | +                       | Hyb C15                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C16-6a | A           | +       | ++                  |                         |
| Hyb B24                      | $a/\alpha$  |          | +                   | +                       | Hyb C16                      | $a/a$           |             | +                   | -                       | C16-6g | $a/a$       | +       | +                   |                         |
| Hyb B25                      | $a/\alpha$  |          | +                   | +                       | Hyb C17                      | $a/a$           |             | +                   | -                       |        |             |         |                     |                         |
| Hyb B26                      | $a/\alpha$  |          | +                   | -                       | Hyb C18                      | $a/a$           |             | +                   | -                       |        |             |         |                     |                         |
| Hyb B28                      | $a/\alpha$  |          | +                   | ++                      | Hyb C19                      | $a/a$           |             | +                   | -                       |        |             |         |                     |                         |
| Hyb C28                      | $a/\alpha$  |          | +                   | +                       | Hyb C20                      | $a/a$           |             | +                   | -                       |        |             |         |                     |                         |
| Hyb C30                      | $a/\alpha$  |          | +                   | -                       | Hyb C21                      | $a/a$           |             | +                   | -                       |        |             |         |                     |                         |

Hyb, híbrido; ND, não determinado; <sup>a</sup> ++, células muito floculantes; +, células parcialmente floculantes; -, células não floculantes

**ANEXO 1- Tabela 4: Caracterização das cepas de leveduras utilizadas no estudo**

| Cruzamento haploide-haploide |             |         |                     |                         | Cruzamento diploide-diploide |             |         |                     |                         |       |             |         |                     |                         |
|------------------------------|-------------|---------|---------------------|-------------------------|------------------------------|-------------|---------|---------------------|-------------------------|-------|-------------|---------|---------------------|-------------------------|
| Cepas                        | Mating type | Ploidia | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> | Cepas                        | Mating type | Ploidia | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> | Cepas | Mating Type | Ploidia | Fermentação maltose | Floculação <sup>a</sup> |
| Hyb C31                      | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb C23                      | a/α         |         | +                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb C33                      | a/α         |         | +                   | ++                      | Hyb C24                      | a/α         |         | +                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb C42                      | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb C25                      | a/α         |         | +                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb C44                      | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb C26                      | a/α         |         | +                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb V                        | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb C27                      | a/α         |         | +                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb E                        | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb A8                       | a/α         |         | -                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb F1                       | a/α         |         | +                   | -                       | Hyb A9                       | a/α         |         | -                   | -                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb F2                       | a/α         |         | +                   | -                       | B15-2d                       | a/α         |         | +                   | +                       |       |             |         |                     |                         |
| Hyb J1                       | a/α         |         | +                   | -                       | B15-7c                       | a/α         |         | +                   | ++                      |       |             |         |                     |                         |

Hyb, híbrido; ND, não determinado; <sup>a</sup> ++, células muito floculantes; +, células parcialmente floculantes; -, células não floculantes