

ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 1º PARTE – AS LEVEDURAS

Resumo

A cerveja pode ser definida como sendo uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação por leveduras do malte de cevada, contendo lúpulo e água de boa qualidade, podendo ainda utilizar-se de outras matérias-primas, como arroz, trigo ou milho. Há milênios o homem vem utilizando leveduras para a produção de pão, cerveja, vinho e outros alimentos obtidos por fermentação. Atualmente, elas são usadas numa ampla faixa de processos fermentativos visando a produção dos mais variados tipos de produtos. As leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam várias cepas consideradas seguras e capazes de produzir dois metabólicos primários importantíssimos na cerveja, etanol e dióxido de carbono. Na presente revisão, estão demonstrados os elementos clássicos e modernos principais relacionados às leveduras e sua ligação com o processo biotecnológico cervejeiro.

Palavras-chave: leveduras, cerveja, biotecnologia

*Giovani Brandão Mafra de Carvalho**,
Camila Vieira Bento e
João Batista de Almeida e
Silva

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de
Lorena (EEL),
Departamento de
Biotecnologia

* Autor para correspondência:
Estr. Municipal do Campinho
Caixa Postal 116
CEP: 12602-810. Lorena. SP
Fone: (12) 3159-5107
E-mail: gbmafra@yahoo.com.br

Summary

Beer can be defined as being a carbonated drink of low alcoholic content, prepared from the yeast fermentation of barley malt, containing hop and well qualified water, besides using other raw-materials, as rice, wheat or corn. The mankind has over millenium been using yeast to produce bread, beer, wine and food obtained from fermentation. Actually, they have been used in a widely range of fermentation processes aiming at the production of varied types of products. The yeast from *Saccharomyces* species presents several strains considered as safe and capable of producing two primary metabolic substances very important for beer, ethanol and carbon dioxide. The present review, classical and modern elements are demonstrated as well the ones related to the yeast and its linking to the biotechnological brewing.

Keywords: yeasts, beer, biotechnology

Introdução

As leveduras (microrganismos eucarióticos predominantemente unicelulares do Reino Fungi) contribuíram para o processo científico, constituindo modelo celular de escolha na elucidação dos processos bioquímicos e metabólicos fundamentais das células vivas eucarióticas. Esta escolha não foi surpreendente, porque as leveduras podem ser produzidas em enormes quantidades pelo uso da biotecnologia nas indústrias de pão e cervejeiras.

Entende-se por Biotecnologia a aplicação da Bioquímica, da Biologia, da Microbiologia e da Engenharia Química aos

processos e produtos industriais (incluindo os produtos relativos à saúde, energia e agricultura) e ao meio ambiente.

Devido à sua longa história, a produção de cerveja é geralmente mencionada como um exemplo típico da biotecnologia clássica. Entretanto, a cervejaria moderna aplica uma ampla gama de inovações técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas.

Dando início a uma série de revisões sobre tecnologia cervejeira, o presente trabalho aborda alguns elementos principais do universo das leveduras e sua relação com o processo biotecnológico de obtenção de cervejas.

As leveduras e seus aspectos básicos

As leveduras, como os bolores, são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Sua reprodução vegetativa se faz, geralmente, por gemulação ou brotamento. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores. Também são mais eficientes, numa base ponderal, na realização de alterações químicas por causa de sua maior relação área/volume. As leveduras também se diferem das algas, pois não efetuam a fotossíntese, e igualmente não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. As leveduras não são uma entidade taxionômica natural, embora exibam uniformidade morfológica. Na verdade, devido à escassez de critérios morfológicos, as espécies de leveduras são diferenciadas menos de acordo com elementos da morfologia e mais de conformidade com características fisiológicas. Algumas não formam esporos e são consideradas como “Fungos Imperfeitos”. Outras produzem esporos sexuados e, assim, apresentam clara relação com os ascomicetos ou com os basidiomicetos (Pelcsar, 1980).

O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura ascomicética gemulante típica. Cepas desta espécie são utilizadas no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas. Na presença de oxigênio, as leveduras oxidam os açúcares a dióxido de carbono que são responsáveis pelas “bolhas de ar” no pão. As leveduras de cervejaria e padaria têm sido utilizadas a milhares de anos. Assim, a *S. cerevisiae* é uma levedura de grande importância econômica há muito tempo (Pelcsar Jr. et al., 2004).

As células de *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento (ou gemulação). Durante o processo de brotamento, o núcleo se divide por constrição e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é fechada pela síntese de novo material de parede celular. Outras leveduras podem reproduzir-se assexuadamente por fissão binária transversa. São denominadas leveduras fissuladas (em oposição às gemulantes). O ciclo de vida da *S. cerevisiae* está representado na Figura 1. Nesta levedura, tanto os estágios fermentativos haplóides como diplóides podem estar presentes. A *cariogamia* (fusão dos núcleos gaméticos) precede o estágio vegetativo diplóide; a meiose precede o estágio vegetativo haplóide. O ciclo de vida das leveduras pode ser complementemente variado. Estas variações podem ser devidas às diferenças de tempo e local em que ocorre a *plasmogamia* (fusão de protoplastos), *cariogamia* e meiose (Pelcsar Jr. et al., 2004).

As leveduras na produção de cerveja

A cerveja é uma bebida de malte resultante da fermentação alcoólica do extrato aquoso do malte de cevada com

lúpulo. O processo cervejeiro é consequentemente um processo de múltiplos estágios envolvendo a conversão biológica de materiais *in natura* em produto final (Walker, 2000; Carvalho et al., 2006).

O desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação, que é a habilidade das leveduras em “metabolizar eficientemente os constituintes do mosto em etanol e em outros produtos da fermentação a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade satisfatórias” (Russell e Stewart, 1995), é influenciada e controlada por vários fatores:

- **Características Genéticas:** a escolha da cepa de levedura empregada.
- **Fisiologia Celular:** a tolerância ao stress pelas células de levedura, a viabilidade e a vitalidade das células e a concentração celular do inoculo.
- **Disponibilidade Nutricional:** a concentração e a natureza do nitrogênio assimilável, a variedade e a concentração de açúcares no mosto e a disponibilidade de íons metálicos.
- **Condições Físicas:** temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto.

Todas as leveduras cervejeiras, tradicionalmente usadas na produção de cervejas ale e lager, são cepas de *S. cerevisiae* que representam em totalidade, um grupo diversificado de microorganismos. Para efeito histórico e prático, ao invés de razões definitivamente taxionômicas, as leveduras lager, são referidas na literatura como *S. carlsbergensis* [mais estreitamente *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*] (Walker, 2000).

Kielland-Brandt et al. (1995) tem discutido as razões científicas para a diferenciação entre *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis*, e a Tabela 1 compara e contrasta algumas das diferenças genéticas e fisiológicas entre leveduras cervejeiras lager e ale.

Nos últimos anos, taxonomistas de leveduras têm designado todas as cepas empregadas na produção de cerveja como pertencentes à espécie *S. cerevisiae* (STEWART, 2000).

Embora a literatura científica progressivamente se refira às leveduras como *S. cerevisiae* tipo ale e *S. cerevisiae* tipo lager, existem algumas diferenças bioquímicas entre esses dois tipos de cepas de leveduras, que justificam manter uma diferenciação entre elas. As cepas de *S. uvarum* (*carlsbergensis*) tipo lager possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). Porém, as cepas de *S. cerevisiae* tipo ale carecem desses genes MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose. Além disso, às cepas ale podem crescer a 37°C, enquanto que as cepas lager não apresentam crescimento a temperaturas superiores a 34°C (STEWART e RUSSELL, 1998).

As cepas de *S. cerevisiae* de laboratório (ou “científicas”) também foram acrescentadas na Tabela 1 para que suas propriedades possam ser diferenciadas das propriedades das cepas industriais desta levedura. Naturalmente, a aplicação destas leveduras é diferente: as leveduras de laboratório são

Tabela I. Algumas diferenças genéticas e fisiológicas entre *S.cerevisiae* de laboratório e de processo cervejeiro industrial (Kielland-Brandt *et al.*, 1995)

Diferentes Parâmetros		Cepas de Laboratório	Cepas Ale	Cepas Lager
Genética	Seleção	Selecionada para estudos genéticos	Selecionada para produção de álcool	Selecionada para produção de álcool
	Auxotrofia	Disponível auxotrófico mutantes	Prototróficos	Prototróficos
	Plóide	Estável haplóide ou diplóide	Poliplóide ou aneuplóide	Allotetraplóide
	Cariotipo	16 cromossomos	Variável	Variável
Crescimento	Esporulação	Boa	Fraca	Fraca
	Taxa	Alta taxa de crescimento	Baixa taxa de crescimento	Baixa taxa de crescimento
	Floculação	Geralmente não flocula (comportamento fica suspensa livremente)	Flocula fracamente (comportamento de flotação)	Flocula fortemente (comportamento de sedimentação)
	Caráter assassino	Vários fenótipos assassinos	Não assassino	Não assassino
Metabolismo	Fermentação	Baixa taxa	Alta taxa	Alta taxa
	Utilização de açúcar	Não utiliza Melibiose	Não utiliza Melibiose	Melibiose clivada (α -galactosidase) e fermentada
		Único transportador de maltose	A glicose inibe o consumo da maltose de alta afinidade	A glicose não inibe o consumo da maltose de alta afinidade
		Transportador variável da maltotriose	Fraco transportador de maltotriose	Bom transportador de maltotriose
	Transporte de aminoácido	Valina transportada	Fraco consumo de valina	Fraco consumo de valina
	Componentes do flavour	Ácido ferúlico descarboxilado (para produção de compostos fenólicos off-flavour-POF1 allele)	Ausência de POF1- não tem ácido ferúlico descarboxilado.	Ausência de POF1- não tem ácido ferúlico descarboxilado.
	Fermentação a 37°C	?	Sim	Não

^a A levedura da cepa lager, *S.carlsbergensis*, possui dois genomas divergentes - um da *S. cerevisiae* e um da *S. monacensis*. *S. carlsbergensis* podendo, portanto, ser um híbrido natural entre *S.cerevisiae* e *S.monacensis*.

Métodos	Descrição	Referências
Restrição na análise da enzima (DNA fingerprinting)	O DNA total, ribossomal ou mitocondrial está digerido com restrição das endonucleases e os fragmentos específicos hibridizados depois da separação eletroforética com investigação do DNA multilocus tais como Ty1 retrotransposon. É detectado restrição aos polimorfismos do comprimento do fragmento (RFLPs)	Pedersen (1986); Walmsley <i>et al.</i> (1989); Wightman <i>et al.</i> (1996)
Cariotipo Eletroforético (cromossomos por fingerprinting)	Todos os cromossomos são separados eletroforéticamente usando a técnica de campo pulsante	Pedersen (1987); Oakley Gutowski <i>et al.</i> (1992); Vaughan-Martini <i>et al.</i> (1993)
Reações em cadeia da polimerase (PCR)	As seqüências específicas do DNA são propagadas exponencialmente in vitro e nos produtos amplificados analisados após a separação eletroforética. O DNA polimorfo amplificado aleatório pode também ser analisado por PCR (RAPD-PCR)	Ness <i>et al.</i> (1993)
Etiqueta genética	As seqüências genéticas específicas, inclusive marcas selecionáveis, são introduzidas em leveduras para facilitar seu reconhecimento (por exemplo, reposição de seqüências da resistência do cloranfenicol com uma 'etiqueta' que confere sensibilidade ao antibiótico)	Lancashire e Hadfield (1986)
Cromatografia	Cromatografia a gás (ésteres metilados de ácidos graxos de cadeia longa)	Hammond (1993)
Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	As proteínas totais solúveis na levedura são separadas por eletroforese e os testes padrões analisados pelo computador	Hammond (1993)

Tabela 2. Métodos moleculares para diferentes espécies de levedura produtora de cerveja (Walker, 2000)

empregadas para a pesquisa fundamental e crescem geralmente em meios sólidos ou em frascos agitados com temperaturas em torno de 25-30°C; as leveduras cervejeiras industriais são empregadas para a produção industrial da bebida em grandes fermentadores sem agitação e crescem em temperaturas abaixo da temperatura ambiente. Mesmo nas leveduras cervejeiras industriais existem características significativamente diferentes de crescimento. Por exemplo, na maioria das fermentações para elaboração de cervejas ale o processo é mais rápido (5 contra 14 dias) e conduzidos em temperaturas mais altas (20 contra 8°C) comparados com as fermentações com cepas de leveduras lager. Tradicionalmente, as leveduras cervejeiras ale foram descritas como “de alta fermentação” ou seja, que se elevavam à superfície do líquido no final da fermentação formando uma película flutuante e espessa de biomassa que poderiam ser retiradas desta superfície. Já as leveduras lager foram des-

critas como “de baixa fermentação” floculando na base do fermentador no final da fermentação formando uma fase sedimentada de biomassa apta a ser retirada no fundo da base do fermentador. Com o emprego de altos fermentadores cilindrocônicos (de aproximadamente 20 m) as leveduras de baixa fermentação podem ser utilizadas atualmente na produção de cervejas ale e as diferenças de processamento entre as leveduras ale “de superfície” e as leveduras lager “floculantes” tem se tornado cada vez menos discriminativas e usuais (Walker, 2000).

Atualmente, diversos métodos moleculares têm sido utilizados para caracterizar e diferenciar as cepas de leveduras cervejeiras (Tabela 2). As técnicas genéticas de fingerprinting, em particular, tem provado ser útil no gerenciamento, autenticação e verificação das cepas, especialmente porque as múltiplas cepas de *S. cerevisiae* são armazenadas e distribuídas sob licença para produção de cerveja ou bebidas mistas (Walker, 2000).

As técnicas de genética molecular podem fazer facilmente a diferenciação entre cepas de leveduras cervejeiras com propriedades fisiológicas similares.

Por exemplo, a análise do cariotipo pelo método eletroforetico de campo pulsante pode ser usado para detectar polimorfismos no comprimento do cromossomo (CLPs) em leveduras industriais porque isto é uma característica individual de cada cepa. Elas possuem suas próprias características e padrões de banda (Naumov *et al.*, 1992). Em contrapartida, embora a identificação molecular das leveduras cervejeiras seja mais objetiva, sensível e reprodutível em relação aos testes bioquímicos e morfológicos tradicionais, eles ainda não são particularmente rápidos para atender as necessidades dos processos cervejeiros modernos que operam em larga escala (Meaden, 1996).

Referências adicionais sobre a técnica genética de fingerprinting para cepas de leveduras cervejeiras, podem ser encontradas nos artigos de Meaden (1990), Walmsley (1994), Pedersen (1994) e Schofield *et al.* (1995).

Melhoramento Genético-Molecular das Leveduras Cervejeiras

Priest e Campbell (1996) definiram as principais propriedades das leveduras cervejeiras para que sejam consideradas “boas produtoras de cervejeira” da seguinte maneira:

- Uma velocidade rápida de fermentação sem crescimento celular excessivo.
- Uma utilização eficiente da maltose e maltotriose com uma boa conversão em etanol.
- A habilidade de tolerar o stress imposto pelas altas concentrações de álcool e pressões osmóticas do mosto.
- Uma produção reprodutível de certos níveis de compostos do flavor e do aroma.
- Uma floculação ideal para o processo ampliado.
- Boas características de manuseio (retenção da viabilidade durante armazenamento e estabilidade genética).

Infelizmente, as cepas de leveduras cervejeiras são limitadas em várias dessas características, e, na realidade, não fermentam suficientemente os açúcares disponíveis no mosto. Hammond (1995) explica que: “As leveduras cervejeiras estão longe de ser otimizadas para a função na qual o pesquisador as escolheu para realizar”.

Existem várias possibilidades do uso de cepas modificadas geneticamente, com o objetivo de melhorar as características das leveduras cervejeiras. Avanços importantes foram atingidos usando a tecnologia de DNA recombinante. Estratégias de transformação têm aberto a possibilidade do uso de leveduras cervejeiras que: fermentam uma ampla variedade de açúcares; floculam apropriadamente e em tempos curtos da fermentação; toleram melhor o stress químico e físico causado pela fermentação e produz cerveja mais estável e saborosa (Walker, 2000).

A Tabela 3 destaca algumas das melhorias no processo cervejeiro utilizando-se leveduras recombinantes. Os benefícios das leveduras recombinantes na indústria são relacionados a: diminuição de custo da matéria-prima; aumento na eficiência e produtividade da fermentação; melhora na qualidade da cerveja e desenvolvimento de “novas” cervejas (Walker, 2000).

Segundo Linko *et al.*, 1998 citado por Carvalho *et al.*, (2006), as leveduras geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas com a finalidade de: a) manter a concentração de diacetil em valores inferiores ao limiar de detecção sensorial, b) facilitar a filtração da cerveja, e c) produzir cervejas com baixos teores de carboidratos.

Diversos fatores impedem o desenvolvimento do uso da tecnologia de DNA recombinante em leveduras cervejeiras. Casey (1990) comentou que esses fatores incluem: a dúvida e demorada aprovação do governo para seu uso; disponibilidade de soluções alternativas (tradicionais); aplicações de patente e a preocupação pela aprovação do consumidor. Além dessas preocupações, geralmente, a existência de conhecimentos inadequados com respeito à fisiologia das leveduras cervejeiras recombinantes.

Uma levedura cervejeira recombinante foi aprovada para uso comercial no Reino Unido (Hammond, 1995), mas ainda tem que receber a aprovação do mercado industrial mundial. Mesmo sendo os obstáculos científicos e técnicos superados, considera-se a aceitação do consumidor o obstáculo mais desafiante.

Contaminantes Microbianos no Processo Cervejeiro

Leveduras selvagens

Levedura selvagem é qualquer levedura diferente da levedura de cultivo utilizada na elaboração de determinada cerveja. Leveduras selvagens podem se originar de diferentes fontes. Estudos com 120 leveduras selvagens isoladas a partir da cerveja, leveduras em propagação e garrafas vazias, mostram que, além de várias espécies de *Saccharomyces*, foram encontradas espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulasporea* e *Zygosaccharomyces* (Almeida e Silva, 2005). As leveduras selvagens podem causar defeitos, como é o caso da formação de película na superfície da cerveja, produção de turbidez, desenvolvimentos de odor e sabor estranhos e fermentação com desvio na atenuação (Venturini Filho e Cereda, 2001; Almeida e Silva, 2005).

O gênero *Saccharomyces* é o mais importante. Cerca de 80% das leveduras selvagens pertence a este gênero. Assim *S. diastaticus* ataca a cerveja envasada, mas não pasteurizada (chope), produzindo turbidez, super atenuação e sabor desagradável. Uma fermentação contaminada com *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* resulta em cerveja com sabor fenólico. Cepas deficientes respiratórias de *S. cerevisiae* podem se desenvolver ao lado da cultura industrial e produzir, na cerveja, odor e sabor anormais, dentre eles o diacetil (Venturini Filho e Cereda, 2001).

Limitações atuais da espécie	Propriedades desejáveis da cepa.	Melhorias usando a tecnologia de DNA recombinante.
Tolerância limitada ao etanol	Tolerância mais elevada ao etanol para a fermentação do mosto de alta densidade	Transferência do gene acetoacetil- CoA tiolase para levedura poder aumentar a tolerância ao etanol (Cantwell e McConnell, 1987) mas este traço é difícil de conferir devido a sua natureza poligênica
Limite estreito para fermentação de carboidratos	Utilização e fermentação das maltodextrinas para produzir a cerveja light (de baixo teor de carboidratos)	Conseguido por transferência de genes da glucoamilase da <i>S.cereviase</i> var. <i>diastaticus</i> ou de <i>Aspergillus</i> ssp.(Tubb, 1986; Perry e Meaden, 1988; Hammond, 1995)
Suscetível à contaminação	Propriedades antimicrobianas (junto a leveduras e bactérias selvagens) de modo que as cepas produtoras de cerveja pudessem agir esterilizando as fermentações contaminadas	Plasmídios de toxinas assassinas (assasinas de laboratório) transferidas pela citodução (Young, 1981) ou eletro-transformação (Salek <i>et al.</i> 1992) para cepas cervejeiras. Assassinas flocculantes encontram-se também disponíveis através da fusão de protoplasto (Javadekav <i>et al.</i> 1995)
Limite de tolerância ao stress	Osmo-, thermo-e barotolerancia requererem níveis acima daqueles encontrados na produção de cerveja	As mudanças fisiológicas da célula causada por nutrientes e por condições físicas são mais prováveis acontecer do que por tecnologia de clonagem.
Nenhuma hidrólise do β -glucan	A degradação do β -glucan viscoso que deriva do malte cevada é esperada para melhorar a filtração do mosto e eliminar a turbidez da cerveja	Os genes da β -Glucanase tem sido sucessivamente clonada de bactéria, fungo e cevada pra dentro da levedura cervejeira. (Cantwell <i>et al.</i> , 1985)
Hidrólise limitada de proteína	Proteolises para melhorar o mosto utilizando o nitrogênio e evitando a turbidez da cerveja	<i>S. cereviase</i> foi transformada para incorporar com sucesso uma protease
A cerveja produzida requer longa maturação	Os níveis reduzidos, ou o metabolismo de off-flavour (ex. diacetil e H_2S) que são indesejados, resultando num tempo reduzido de maturação	Os genes que codificam enzimas da via sintética da valina (que pode causar o aumento de diacetil) foram clonados de vários microrganismos dentro de leveduras cervejeiras (ex. Tada <i>et al.</i> , 1995). A produção reduzida do H_2S também é possível por transferência de genes na síntese da cistationina
Floculação descontrolada	Corrige a temporização da floculação da levedura para atender o processo de purificação da cerveja	Os genes da floculação (ex. FLO1) foram clonados na reprodução da levedura e apenas expressados no final da fermentação
Síntese limitada dos ésteres	Determinados ésteres fornecem os estabilizantes e os antioxidantes desejáveis ao flavour	O gene codificado do álcool acetil transferase (AFTI) é responsável pela síntese do éster do acetato clonado em uma espécie de <i>S.cereviase</i> (Fujii <i>et al.</i> ,1992)
Instabilidade do flavour da cerveja produzida	O aumento da produção de SO_2 age como o estabilizante e o antioxidante do flavour	Os genes do sulfito redutase foram suprimidos tendo por resultado os níveis SO_2 aumentados na cerveja
Utilização da maltose reprimida	A anulação da glicose de repressão melhoraria a fermentação e permitiria maior uso dos adjuntos baseados na glicose	Transferência de genes da maltose permease (MAL61) resulta na melhoria do uso da maltose (Kodama <i>et al.</i> , 1995)

Tabela 3. Aspectos que relacionam às aplicações práticas e potencial da levedura cervejeira recombinante (Walker, 2000)

Segundo Venturini Filho e Cereda (2001), em fermentações contínuas, têm-se observado a presença de assassinas (“Killer”). Essas produzem uma proteína letal para as leveduras (sensíveis) de cultivo. A manutenção do pH baixo, indefinidamente, durante a fermentação contínua, propicia o desenvolvimento da selvagem, que pode eliminar completamente a levedura de cultivo e produzir sabor desagradável, descrito como erva-fenólico.

As leveduras selvagens podem ser detectadas por exame microscópico, por provas de resistência térmica, esporulação, fermentação de açúcar, sorológicas etc.. No mais, a eliminação da levedura selvagem ou a manutenção da sua concentração em níveis mínimos na cervejaria, pode ser conseguida utilizando inóculo asséptico, o que é possível quando se faz propagação de cultura de laboratório a cada um ou dois meses (Venturini Filho e Cereda, 2001).

Bactérias contaminantes

Bactérias são agentes danificadores comuns da cerveja. São usualmente divididas nas categorias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas, que trazem os maiores problemas para a cerveja, são as bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, sendo que pelo menos 10 espécies de lactobacilos podem causar danos a este produto. Os lactobacilos cervejeiros são heterofermentativos e homofermentativos e produzem ácido láctico e acético, dióxido de carbono, etanol e glicerol como produtos finais, com algumas espécies produzindo também diacetil. Os pediococos são homofermentativos e possuem seis espécies identificadas, mas a espécie predominante encontrada na cerveja é *Pediococcus damnosus*, sendo sua infecção caracterizada pela formação de ácido láctico e diacetil. Entre as bactérias gram-negativas que causam danos à cerveja incluem-se as bactérias acéticas (*Acetobacter*, *Gluconobacter*), e certos membros da família das enterobactérias (*Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Obesumbacterium*), como também *Zymomonas*, *Pectinatus* e *Megasphaera* (Almeida e Silva, 2005).

Conclusão

Embora todas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* façam basicamente o mesmo trabalho de transformar carboidratos em etanol e gás carbônico, o sabor do produto obtido difere de uma cepa para outra, em função de pequenas diferenças bioquímicas de metabolismo e conseqüente formação de substâncias capazes de conferir aroma e sabor, mesmo estando presentes em quantidades muito pequenas. Assim, pode-se concluir que o amplo espectro de conhecimentos derivados do uso de leveduras, não só como sistemas bioquímicos e genéticos, estabelecendo as regras da ciência da hereditariedade, mas também os estudos clássicos sobre as leveduras e as fermentações, contribuíram e contribuem para a consolidação da biotecnologia como um todo. Esta integração da biotecnologia “velha” e moderna estabelece parâmetros desafiadores e aplicáveis do conhecimento das leveduras na busca da melhoria do processo fermentativo cervejeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Referências

1. ALMEIDA E SILVA, JB. **Cerveja**. In: Venturini Filho, G. W. Tecnologia de Bebidas, pp.347-380. Edgar Blucher, Brasil, 2005.
2. CARVALHO, GBM; DRAGONE, G, BENTO, CV; SANTOS, DT; SARROUH, BF; FELIPE, MGA; ALMEIDA E SILVA, JB. *Utilização da banana como adjunto na obtenção de mosto cervejeiro de alta densidade: um estudo para fim biotecnológico clássico inédito*. In: **Congresso Mineiro de Propriedade Intelectual**, Agosto 9-11, UFJF, Juiz de Fora-MG, 2006.
3. CARVALHO, W; CANILHA, L; SILVA, SS. *Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos*. **Revista Analytica**, n 23, pp. 60-70, 2006.
4. CASEY, GP. **Yeast selection in brewing**. In: *Yeast Strain Selection* (ed. C. J. Panchal), pp. 65-111. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1990.
5. HAMMOND, JRM. *Genetically modified brewing yeast for the 21st Century – progress to date*. **Yeast**, 11, pp. 1613-1627, 1995.
6. KIELLAND-BRANDT, MC; NILSSON-TILLGREN, T; GJERMANSEN, C; HOLMBERG, S; PEDERSEN, M. **Genetics of brewing yeasts**. In: *The yeasts*. 2nd edn. Vol. 6: *Yeast Genetics* (eds A.E. Wheals, A.H. Rose and J.S. Harrison), pp. 223-254. Academic Press, London, 1995.
7. MEADEN, PG. *DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives*. **Journal of the Institute of Brewing**, 96, pp. 195-200, 1990.
8. MEADEN, PG. *DNA fingerprinting of brewers' yeast*. **Ferment**, 9, pp. 267-272, 1996.
9. NAUMOV, GI; NAUMOVA, ES; LANTTO, RA; LOUIS, EJ; KORHOLA, M. *Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes*. **Yeast**, 8, pp. 599-612, 1992.
10. PEDERSEN, MB. *Molecular analyses of yeast DNA – tools for pure yeast maintenance in the brewery*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 52, pp. 23-37, 1994.
11. PELCZAR Jr. MJ; CHAM, ECS; KRIED, NR. *Os Principais Grupos de Microorganismos Eucarióticos: Fungos, Algas e Protozoários*. In: **Microbiologia** (vol.1), pp. 260-275. Makron Books, Brasil, 1997.
12. PELCZAR, MJ; REID, R; CHAM, ECS. *Fungos: As Leveduras*. In: **Microbiologia** (vol.1), pp. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 1981.
13. PRIEST, FG; CAMPBELL, I. (eds.) **Brewing Microbiology**. 2nd edn. Chapman & Hall, London, 1996.
14. SHOFIELDE, MA; ROWE, SM; HAMMOND, JRM; MOLZAHN, SW; QUAIN, DE. *Differentiation of brewery yeast strains by DNA fingerprinting*. **Journal of the Institute of Brewing**, 101, pp. 75-78, 1995.
15. STEWART, GG; RUSSELL, I. **An Introduction to Brewing Science & Technology**: series III: brewer's yeast. London: The Institute of Brewing, 108p, 1998.
16. STEWART, GG. *A brewer's delight*. **Chemistry and Industry**, London, n. 21, pp. 706-709, nov. 2000.
17. RUSSELL, I; STEWART, GG. **Brewing**. In: *Biotechnology*. Vol.9: *Enzymes, Biomass, Food and Feed* (eds G. Reed and T.W. nagodawithana), pp. 419-462. VCH, Weinheim, Germany, 1995.
18. VENTURINI FILHO, WG; CEREDA, MP. **Cerveja**. In: Almeida lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. **Biociencia Industrial** (Biotecnologia na produção de alimentos v.4), pp. 91-144. Edgar Blucher, Brasil, 2001.
19. WALKER, GM. **Yeast Technology**. In: *Yeast Physiology and Biotechnology* (ed. John Wiley & Sons), pp. 265-320, Wiley, Scotland, 2000.
20. WALMSLEY, RM. *DNA fingerprinting of yeast*. **Ferment**, 7, pp. 231-234, 1994.